

УДК 577.153

БИОХИМИЯ

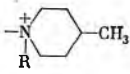
Б. С. ЖОРОВ, Е. В. РОЗЕНГАРТ, В. А. ГОВЫРИН, А. К. КАСЫМОВ,
А. А. АБДУВАХАБОВ, Ш. К. КАСЫМОВ, Х. А. АСЛАНОВ, академик А. С. САДЫКОВ

О СВЯЗИ МЕЖДУ СКОРОСТЬЮ ХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ГИДРОЛИЗА И КОНФОРМАЦИЕЙ ТРЕТИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЦЕТИЛХОЛИНА

Эфиры третичных аминоспиртов являются худшими субстратами холинэстераз, чем их метилированные аналоги (¹). В стандартных условиях (измерения проводятся при pH 7,3–7,5) степень протонирования третичных соединений выше 90% (pK_a диметиламиноэтилацетата 8,5 (¹)). Следовательно, неполное протонирование не может быть причиной существенного снижения скорости холинэстеразного гидролиза. В настоящей работе изучены субстратные свойства некоторых нециклических и циклических третичных производных ацетилхолина и методом теоретического конформационного анализа исследованы особенности их структуры.

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза ацетатов $CH_3C(O)OC_2H_4-X$ под действием БухЭ и АХЭ (pH 7,3; 25°)

№ соедин.	X	R	a_c , мин ⁻¹	
			БухЭ	АХЭ
I	$\begin{array}{c} + \\ \\ -N(CH_3)_2 \\ \\ R \end{array}$	CH ₃ (2)	$6,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^5$
II		H	$4,3 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$
III		CH ₃ (2)	$3,0 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^5$
IV		H	0	0
V		CH ₃	$1,2 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^5$
VI		H	0	0

В качестве ферментов использованы препараты ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эритроцитов человека (0,9 ед.) и бутилхолинэстеразы (БухЭ) сыворотки крови лошади (9,6 ед.) производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток. N-(β-ацетоксиэтил)-пиперидин (соединение IV, табл. 1) и N-(β-ацетоксиэтил)-γ-пипеколин (соединение VI, табл. 1) были получены при взаимодействии хлористого ацетила со смесью N-(β-оксиэтил)-пиперидина (или N-(β-оксиэтил)-γ-пипеколина) и триэтиламина в абсолютном бензоле. Субстратные свойства оценивались по величине активности каталитического центра (a_c) (²).

Из табл. 1 видно, что соединение II гидролизовалось в 1,5–3 раза медленнее своего метилированного аналога (соединение I, АХЭ), а производные третичных циклических аминоспиртов (IV и VI) совсем не подвергались гидролизу под действием АХЭ и БухЭ, в то время как соответствующие метилаты (III и V) были субстратами обоих ферментов.

С целью выяснения возможных причин уменьшения скорости ферментативного гидролиза третичных соединений по сравнению с соответствующими метилатами выполнен теоретический конформационный анализ молекул II и IV в приближении атомных потенциалов. Конформационная энергия складывалась из невалентных и электростатических взаимодействий, торсионной составляющей, энергии деформации валентных углов. Расчеты выполнены на ЭВМ «НАИРИ-3» с помощью универсальных конформационных программ ⁽³⁾. В качестве переменных геометрических параметров рассматривались семь углов внутреннего вращения и 13 независимых валентных углов при атомах C(1), O(2), C(3), C(4) (рис. 1). Валентные углы при остальных атомах приняты тетраэдрическими. Длины связей, параметры потенциальных функций и способы отсчета двугранных углов приняты такими же, как в работе ⁽⁴⁾. Электростатическая энергия оценивалась в монополярном приближении по закону Кулона. σ -Заряды на атомах рассчитаны нами по методу Дель Ре. Распределение π -электронной плотности на карбонильной группе учтено путем добавления зарядов +0,1e и -0,1e к σ -зарядам на атомах C(1) и O(2) соответственно. Для диэлектрической постоянной принято значение $\epsilon=2$. Водородные связи описывались потенциалом Морзе ⁽⁵⁾. Для обеих возможных Н-связей (C=O...H-N и O...H-N) постулированы одинаковые значения равновесной длины (1,8Å) и энергии диссоциации (3 ккал/моль).

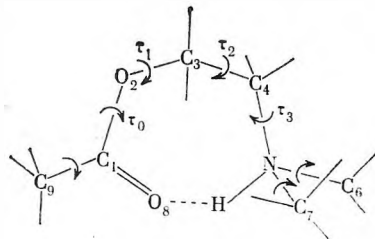


Рис. 1. Молекула диметиламиноэтилацетата (II) в наиболее выгодной конформации

Конформационные возможности соединения II отражены на конформационных картах τ_1 - τ_2 , построенных при различных значениях угла τ_3 . Карта при $\tau_3=180^\circ$ близка к конформационным картам АХ ^(6, 7), поскольку при любых значениях углов τ_1 , τ_2 ацетоксиэтильная часть молекулы не вступает в контакты с атомом водорода Н-Н. Конформационная карта, построенная при гош-конформации фрагмента C-C-N-H ($\tau_3=300^\circ$), имеет одно существенное отличие от карты с транс-конформацией C-C-N-H: в области $\tau_1=290^\circ$, $\tau_2=90^\circ$ появляется дополнительный минимум, обусловленный образованием Н-связи C=O...H-N. Кроме того, за счет образования Н-связей O...H-N минимумы, соответствующие одной из гош-конформаций фрагмента O-C-C-N смещаются в сторону меньших значений угла τ_2 . Конформационная карта, построенная при $\tau_3=60^\circ$, симметрична карте с $\tau_3=300^\circ$ (рис. 2).

Энергетические и геометрические параметры ряда устойчивых конформаций соединения II, найденные путем минимизации энергии по всем степеням свободы, приведены в табл. 2. В группе с $\tau_3=180^\circ$ оптимальны структуры с гош-конформацией фрагмента O-C-C-N, которая наблюдается у АХ как в кристаллах ^(8, 9), так и в водном растворе ⁽¹⁰⁾. Однако самыми выгодными по энтальпии являются конформации с Н-связью C=O...H-N (рис. 1). Именно наличие этих форм в популяции устойчивых конформеров может, на наш взгляд, объяснить уменьшение скорости ферментативного гидролиза соединения II по сравнению с АХ. Действительно, поскольку, согласно современным представлениям ⁽¹¹⁾, образование Н-связи между карбонильным кислородом АХ и имидазольным кольцом гистидина, находящегося в активном центре фермента, играет важную роль в процессе холинэстеразного гидролиза, можно предположить, что конформеры с Н-связью C=O...H-N не будут подвергаться гидролизу, хотя их сорбция на активном центре не исключена.

Описанный выше механизм, вероятно, играет существенную роль также и в снижении скорости ферментативного гидролиза третичных циклических производных АХ по сравнению с их метилатами. Однако, если исходить из предположения о том, что вследствие появления конформеров с внутримолекулярной Н-связью $\text{C}=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}$ скорости гидролиза соединений II, IV, VI по сравнению с их аналогами I, III, V снижаются пропорционально, только с помощью этого механизма нельзя объяснить

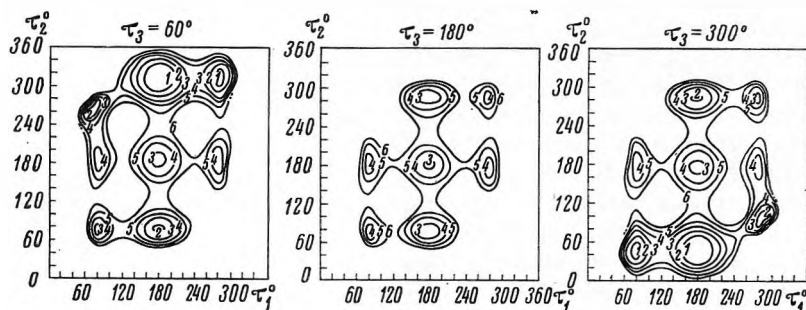


Рис. 2. Семейство конформационных карт τ_1 — τ_2 соединения II. $\tau_3=180^\circ$. Валентные углы фиксированы при значениях, оптимальных для конформации 6 (табл. 2). Уровни энергии (ккал/моль) отсчитываются от глобального минимума

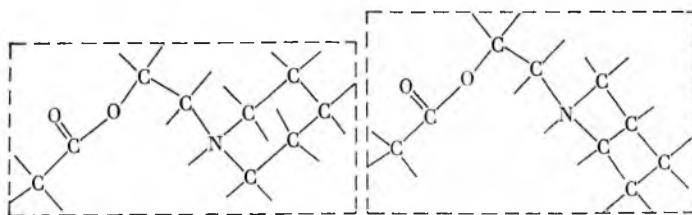


Рис. 3. Эскизы устойчивых конформаций соединения IV с ацетоксиэтильным фрагментом в аксиальном (слева) и экваториальном положениях пиперидинового кольца. Площадь описанного прямоугольника для экваториальной формы на 15% больше, чем для аксиальной

того экспериментального факта, что соединения IV и VI практически не гидролизуются холинэстеразами (табл. 1). Следовательно, для соединений IV и VI должен действовать дополнительный фактор, препятствующий их холинэстеразному гидролизу. У производных АХ, подобных соединениям III—VI, ацетоксиэтильная часть молекулы может находиться по отношению к пиперидиновому (или пипеколиновому) кольцу как в экваториальном, так и в аксиальном положениях. Когда вторым заместителем у азота является метильная группа, эти положения с энергетической точки зрения являются равновероятными. Если же метильную группу заменить водородом, энергетически выгодной становится структура с ацетоксиэтильной частью в экваториальном положении. Согласно нашим расчетам, выполненным при жестком пиперидиновом кольце, разница энтальпии между экваториальной и аксиальной формами соединения IV составляет 4 ккал/моль. На рис. 3 приведены полученные с помощью ЭВМ ⁽³⁾ эскизы двух устойчивых конформаций соединения IV, отличающиеся лишь положением ацетоксиэтильной части молекулы в пиперидиновом кольце. Сравнение этих структур, равно как и эскизов экваториально-аксиальных пар других конформеров, показывает, что аксиальная конформация является более компактной и, вероятно, в меньшей мере испытывает стерические препятствия со стороны гидрофобного окружения анионного центра

Некоторые устойчивые конформации диметиламиноэтилацетата (II)

Параметры	Конформеры							
	$\tau_3 \approx 300^\circ$			$\tau_3 \approx 180^\circ$			$\tau_3 \approx 60^\circ$	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Энергия, ккал/моль	8,1	8,7	9,6	11,7	11,8	13,0	11,5	11,5
в том числе:								
невалентная	0,5	2,0	0,8	1,5	0,6	1,8	0,7	1,6
электростатическая	1,1	0,9	1,7	2,7	2,9	4,1	2,8	2,6
Н-связей	-3,0	-1,6	-1,2	0	0	0	-0,1	0
угловых напряжений	8,4	6,5	7,2	7,3	8,0	7,0	7,6	6,9
торсионная	1,1	0,9	1,1	0,2	0,3	0,1	0,5	0,4
Торсионные углы, град.								
τ_0 [C(9)-C-O-C]	187	181	175	181	178	180	179	181
τ_1 [C-O-C-C-(4)]	285	180	79	180	74	180	74	180
τ_2 [O-C-C-N]	78	41	44	65	60	180	65	70
τ_3 [C-C-N-H]	311	312	311	179	176	180	52	54
Валентные углы, град.								
O(8)-C(1)-O(2)	122	123	123	123	123	123	123	123
O(8)-C(1)-C(9)	121	121	121	121	121	121	121	121
C(1)-O(2)-C(3)	114	111	112	111	112	111	112	111
O(2)-C(3)-C(4)	115	107	110	111	114	109	115	111
C(3)-C(4)-N	117	110	111	120	120	119	116	117

фермента, чем экваториальная конформация. Именно тот факт, что большинство молекул IV и VI находятся в энергетически выгодной, но менее компактной экваториальной форме, является, на наш взгляд, той дополнительной причиной, которая препятствует их гидролизу холинэстеразами.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
16 II 1976

Отдел биоорганической химии
Академии наук УзССР
Ташкент

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, G. B. Koelle, Ed., Handb. Exp. Pharmacol., v. 15, 1963.
- ² Е. В. Розенгарт, И. Н. Соболева и др., ДАН, т. 209, 482 (1973).
- ³ Б. С. Жоров, Автотметрия, 1975, стр. 23.
- ⁴ Б. С. Жоров, Е. В. Розенгарт и др., Мол. биол., т. 9, 820 (1975).
- ⁵ Е. М. Попов, В. Г. Дашевский и др., Мол. биол., т. 2, 612 (1968).
- ⁶ A. M. Liquori, A. Damiani, I. L. De Coen, J. Mol. Biol., v. 33, 445 (1968).
- ⁷ B. Pullman, P. Courriere, Mol. Pharmacol., v. 8, 612 (1972).
- ⁸ F. G. Canepa, P. I. Pauling, H. Sörm, Nature, v. 210, 907 (1966).
- ⁹ I. K. Herdtklotz, R. L. Sass, Biochim. et biophys. Res. Commun., v. 40, 583 (1970).
- ¹⁰ P. Partington, J. Feeney, A. S. V. Burgen, Mol. Pharmacol., v. 8, 269 (1972).
- ¹¹ A. P. Brestkin, E. V. Rozengart, Nature, v. 205, 388 (1965).