



УДК 577.156.3

ГИДРОЛИЗ О-АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СЕРТОНИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

*Махаева Г. Ф., Суворов Н. Н., Гинодман Л. М.,
Антонов В. К.*

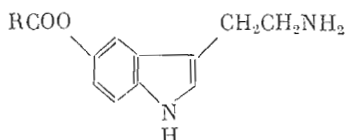
Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева;

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва*

Изучен гидролиз ряда О-ацильных производных серотонина, содержащих остатки монокарбоновых, дикарбоновых и аминокислот, под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади и ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов. Установлено, что ацетилхолинэстераза гидролизует только О-ацетилсеротонин; бутирилхолинэстераза гидролизует все исследованные соединения, за исключением 5,5'-терефталонлднокситриптамина. Определены кинетические параметры гидролиза. О-Ацильные производные серотонина оказались хорошими субстратами бутирилхолинэстеразы, серотонин и 5,5'-терефталонлднокситриптамин являются эффективными конкурентными ингибиторами фермента. Оценка устойчивости О-ацильных производных серотонина к действию холинэстераз крови в физиологических условиях показывает, что исследованные соединения, за исключением 5,5'-терефталонлднокситриптамина, должны быстро гидролизоваться под действием бутирилхолинэстеразы. 5,5'-Терефталонлднокситриптамин предложен в качестве радиозащитного препарата пролонгированного действия, что согласуется с результатами биологических испытаний.

Ранее [1—3] нами была изучена кинетика щелочного, хомотриптического и триптического гидролиза ряда О-ацильных производных серотонина. На основании полученных кинетических данных была охарактеризована устойчивость исследованных соединений в физиологических условиях к спонтанному гидролизу и к действию трипсиноподобных ферментов. Это позволило дать предварительную оценку возможности использования исследованных эфиров серотонина в качестве лекарственных препаратов пролонгированного действия [3]. Для получения более полной картины необходимы данные о гидролизуемости О-ацильных производных серотонина под действием других ферментов крови, обладающих эстеразной активностью.

В настоящей работе изучена кинетика гидролиза ряда О-ацильных производных серотонина, содержащих остатки монокарбоновых и аминокислот:



(R = CH₃—, NH₂CH₂—, NH₂(CH₂)₂—,
NH₂(CH₂)₅, NH₂(CH₂)₆—)

Рис. 1. Зависимость от pH скорости гидролиза CH_3COOT (1), $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOT}$ (2) и $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{COOT}$ (3) под действием бутирилхолинэстеразы

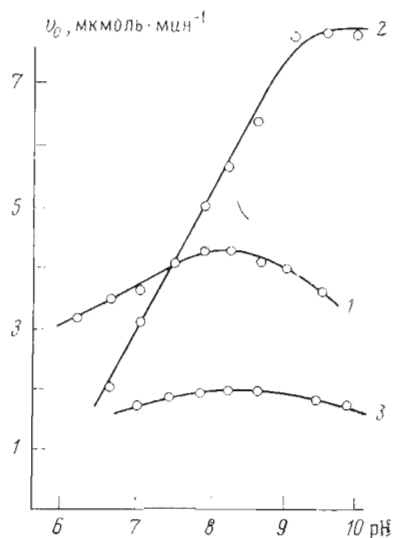


Рис. 1

Рис. 2. Ингибирование 5,5'-терефталойлдикситринптамином (1 — 0; 2 — 30 мкМ; 3 — 75 мкМ) гидролиза ацетилхолина под действием бутирилхолинэстеразы

Рис. 3. Ингибирование серотонином (1 — 0,02; 2 — 0,25; 3 — 0,46 мМ) гидролиза ацетилхолина под действием бутирилхолинэстеразы

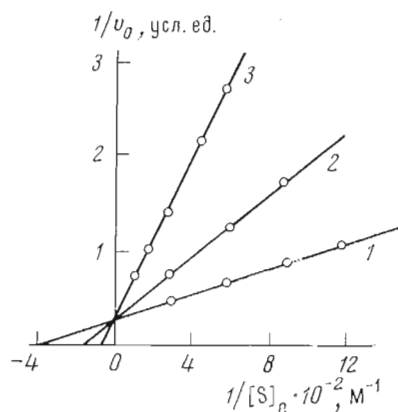


Рис. 2

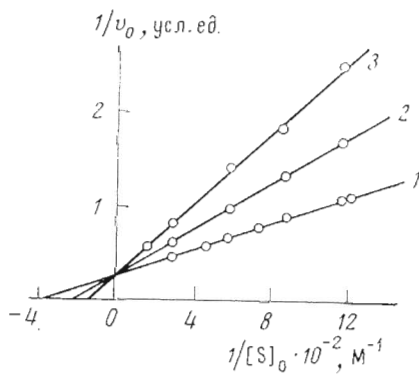
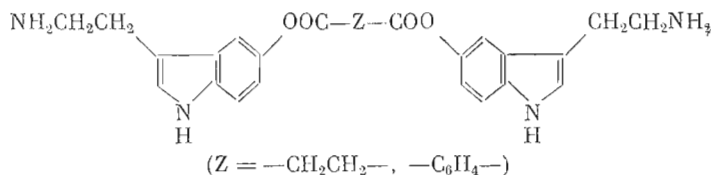


Рис. 3

а также остатки дикарбоновых кислот:



под действием бутирилхолинэстеразы лошадиной сыворотки (КФ 3.1.1.8) и ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов (КФ 3.1.1.7).

Нами установлено, что ацетилхолинэстераза гидролизует лишь *O*-ацетилсеротонин, в то время как бутирилхолинэстераза — все исследуемые соединения, за исключением 5,5'-терефталойлдикситринптамина.

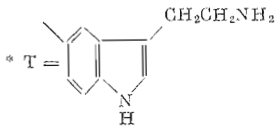
Исследование зависимости начальной скорости гидролиза *O*-ацильных производных серотонина под действием бутирилхолинэстеразы от pH показало (рис. 1, 1, 3), что оптимум pH гидролиза этих соединений несколько шире (pH 7,0—9,5), чем оптимум pH гидролиза специфических субстратов (pH 7,5—8,3). Исключение составляет *O*-глицилсеротонин, по отношению к которому оптимальная каталитическая активность фермента проявляется при $\text{pH} \geq 9$ (рис. 1, 2).

Кинетические параметры гидролиза О-ацильных производных серотонина под действием бутирилхолинэстеразы и ацетилхолинэстеразы

Субстрат	Концентрация субстрата, мМ	Концентрация фермента, мг/мл	K_m , мМ	V , ммоль/мин·мг	Относительная эффективность V/K_m
Бутирилхолинэстераза					
CH ₃ COOT *	0,089–0,770	0,238	0,12±0,006	(1,38±0,04) · 10 ⁻⁴	1,78
NH ₂ CH ₂ COOT	0,835–1,670	0,0475	2,29±0,05	(1,21±0,11) · 10 ⁻³	0,835
NH ₂ (CH ₂) ₂ COOT	0,118–0,667	0,238	0,268±0,027	(8,7±0,73) · 10 ⁻⁶	0,051
NH ₂ (CH ₂) ₃ COOT	0,0747–0,227	0,238	0,148±0,013	(3,25±0,23) · 10 ⁻⁵	0,345
NH ₂ (CH ₂) ₆ COOT	0,102–0,385	0,238	0,090±0,008	(4,83±0,2) · 10 ⁻⁵	0,800
TOOC(CH ₂) ₂ COOT	0,0715–0,250	0,150	0,076±0,03	(1,05±0,2) · 10 ⁻⁴	2,16
CH ₃ COOCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ (ацетилхолин)	0,80–3,40	0,050	2,56±0,33	(1,64±0,19) · 10 ⁻³	1
TOOCC ₆ H ₄ COOT	0,03 п 0,075 **				

Ацетилхолинэстераза

CH ₃ COOT	0,770–3,340	0,357	5,35±0,55	(1,40±0,15) · 10 ⁻⁴	0,078
CH ₃ COOCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	0,20–0,80	0,200	0,704±0,12	(2,34±0,39) · 10 ⁻⁴	1



$$** K_i = (1,80 \pm 0,08) \cdot 10^{-5} \text{ M.}$$

Кинетика гидролиза эфиров серотонина под действием обеих эстераз подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. В изученном интервале концентраций не наблюдается ингибирования субстратом.

Сопоставление величин V/K_m , являющихся мерой кинетической специфичности фермента, О-ацильных производных серотонина и ацетилхолина (табл. 1), показывает, что исследуемые соединения — хорошие субстраты бутирилхолинэстеразы. Наибольшую специфичность фермент проявляет к эфирам уксусной и янтарной кислот.

При холинэстеразном гидролизе эфиров серотонина сохраняются закономерности, наблюдаемые при гидролизе холиновых эфиров. О-Аминоацильные производные серотонина гидролизуются под действием бутирилхолинэстеразы менее эффективно, чем О-ацетилсеротонин. Эффективность гидролиза растет с увеличением расстояния между аминогруппой и сложноэфирной связью, что согласуется с данными Фулдса [4] по гидролизу аминокислотных производных холина: в ряду холиновых эфиров общей формулы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ с максимальной скоростью гидролизуется соединение с $n = 6$. Эти соединения, а также дихолиновые эфиры дикарбоновых кислот под действием ацетилхолинэстеразы не гидролизуются и являются ее ингибиторами [4–8].

Известно, что бутирилхолинэстераза с большей скоростью гидролизует дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот, чем диэфиры ароматических кислот [7–9]. Исследование взаимодействия этой эстеразы с дисеротониновыми эфирами дикарбоновых кислот показало, что 5,5'-сукциноилдиокситриптамин хорошо гидролизуется под действием бутирилхолинэстеразы, а 5,5'-терефгалоилдиокситриптамин устойчив к действию фермента и является его конкурентным ингибитором (рис. 2; $K_i = (1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ M}$, 37°, рН 7,8). Таким образом, различие в специфичности фермента по отношению к диэфирам ароматических и алифати-

ческих дикарбоновых кислот оказывается еще более резко выраженным в случае дисеротониновых производных.

Согласно данным Геде [10], при гидролизе под действием бутирилхолинэстеразы моно- ($K_m = 8,3 \cdot 10^{-3}$ М) и дихолинного ($K_m = 3,8 \cdot 10^{-5}$ М) эфиров янтарной кислоты величины K_m различаются более чем в 200 раз. Учитывая эти данные, а также хорошее подчинение кинетики холинэстеразного гидролиза 5,5'-сукциноилнокситриптамина уравнению Михаэлиса — Ментен, можно полагать, что за время определения скорости реакции фермент расщепляет соединение преимущественно по одной сложной эфирной связи, а образующийся при этом моноэфир гидролизуется хуже, чем исходное соединение.

Полученные данные позволяют оценить эффективность связывания О-ацетилсеротонина бутирилхолинэстеразой. О-Ацетилсеротонин и ацетилхолин — субстраты, имеющие одинаковую ацильную часть и, следовательно, одинаковые величины k_3 — константы скорости распада ацетилфермента в трехстадийной схеме катализа. Как показано в работе [11], лимитирующей стадией при гидролизе ацетилхолина под действием бутирилхолинэстеразы является ацилирование фермента. Поскольку величина удельной максимальной скорости гидролиза О-ацетилсеротонина меньше этой величины для ацетилхолина (табл. 1), реально предположить, что при гидролизе О-ацетилсеротонина лимитирующей стадией также будет ацилирование ацилфермента. При этом K_m (как) = $K_m = K_s$, т. е. низкое значение K_m ($1,25 \cdot 10^{-4}$ М) при гидролизе О-ацетилсеротонина под действием бутирилхолинэстеразы свидетельствует, по-видимому, о хорошем связывании субстрата.

Для оценки вклада серотонинового фрагмента в связывание молекулы субстрата исследовано ингибирующее действие серотонина на гидролиз ацетилхолина под действием бутирилхолинэстеразы. Тип ингибирования, как и в случае 5,5'-терефталоилднокситриптамина, определяли по методу Лайнуивера — Берка (рис. 3).

Пересечение прямых на оси ординат свидетельствует о конкурентном ингибировании. Константу ингибирования (K_i) вычисляли из уравнения

$$K'_m = K_m(1 + [I]/K_i), \quad (1)$$

где K_m и K'_m — константы Михаэлиса в отсутствие и в присутствии серотонина. Полученное значение $K_i = (2,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$ М указывает на хорошее связывание серотонина в активном центре фермента. Сопоставление величин $K_m = K_s$ ($1,25 \cdot 10^{-4}$ М) ацетилсеротонина и K_i серотонина показывает, что серотониновый фрагмент вносит главный вклад в связывание субстрата.

На основании полученных кинетических данных оценена устойчивость О-ацильных производных серотонина к действию холинэстераз в физиологических условиях. При этом использованы условные концентрации ферментов, рассчитанные из величин холинэстеразной активности плазмы и эритроцитов ($\sim 2,4$ и ~ 5 мкмоль ацетилхолина/мл·мин соответственно [12]) и активностей используемых в работе препаратов этих ферментов (табл. 1). Периоды полураспада вычисляли по уравнению [3]

$$\tau_{1/2} = \frac{0,69 + [S]_0/2K_m}{(k_{кат}/K_m)[E]_0}, \quad (2)$$

где $k_{кат}$ и K_m — кинетические параметры ферментативного гидролиза эфиров серотонина; $[E]_0$ и $[S]_0$ — концентрации в крови фермента и лекарственного препарата соответственно; $[S]_0 \sim 7 \cdot 10^{-5}$ М [13]. Как видно из табл. 2, все исследованные соединения, за исключением терефталата, при введении в организм, т. е. в условиях, существующих в крови, бу-

Таблица 2

Величины полупериодов ($\tau_{1/2}$, мин) гидролиза О-ацильных производных серотонина

Соединение	Спонтанный гидролиз, рН 7,4; 37° [3]	Гидролиз под действием ферментов крови, обладающих триптической активностью [3]	Гидролиз под действием холинэстераз крови	
			бутирилхолинэстераза	ацетилхолинэстераза
CH ₃ COOT	2000	840	0,6	1,1
NH ₂ CH ₂ COOT	6	120	0,9	
NH ₂ (CH ₂) ₂ COOT	22	110	17,4	
NH ₂ (CH ₂) ₃ COOT	4	—	—	
NH ₂ (CH ₂) ₅ COOT	140	2	2,9	
NH ₂ (CH ₂) ₆ COOT	270	18	1,45	
TOOC(CH ₂) ₂ COOT	1500	110	0,57	
TOOCC ₆ H ₄ COOT	1000	5700	Не гидролизуется	

дут быстро гидролизоваться холинэстеразой плазмы (бутирилхолинэстеразой), а О-ацетилсеротонин — также и ацетилхолинэстеразой эритроцитов.

При оценке возможности использования О-ацильных производных серотонина в качестве препаратов пролонгированного действия мы руководствовались принципом, согласно которому соединения, подвергающиеся в физиологических условиях быстрому гидролизу, не будут отвечать предъявляемым требованиям [3]. Сравнение данных по устойчивости О-ацильных производных серотонина в физиологических условиях к спонтанному гидролизу и к действию некоторых ферментов крови, обладающих эстеразной активностью (холинэстераз и трипсиноподобных ферментов) (табл. 2), показывает, что 5,5'-терефталойлднокситриптамин очень медленно гидролизуется как спонтанно, так и под влиянием трипсиноподобных ферментов крови и устойчив к действию холинэстераз. Таким образом, можно считать, что это соединение может обладать пролонгированным действием при использовании его в качестве радиопротектора.

Полученные данные о гидролизуемости (устойчивости) О-ацильных производных серотонина в физиологических условиях позволяют рационально объяснить результаты испытаний этих соединений на противолучевую активность. При биологических испытаниях обнаружен значительный эффект пролонгированного действия у 5,5'-терефталойлднокситриптамина и небольшой эффект у 5,5'-сукциноилднокситриптамина [13]. Пролонгированное действие последнего соединения может быть связано с медленным расщеплением моноэфира, образующегося на первой стадии гидролиза. Таким образом, наблюдаемое пролонгирование противолучевого действия эфиров серотонина коррелирует с относительной устойчивостью этих соединений к спонтанному и ферментативному гидролизу.

Серотониновые эфиры монокарбоновых и аминокислот оказывают защитное действие только при введении непосредственно перед облучением (за 5—10 мин) [14, 15]. Отсутствие пролонгированного действия у этих соединений согласуется с их быстрым гидролизом. Можно предположить, что радиозащитное действие в случае О-ацетилсеротонина (и вероятно, О-бутирилсеротонина), а также О-амфиоацильных производных серотонина в значительной степени связано с предвараемым гидролизом этих соединений до серотонина. В случае 5,5'-терефталойлднокситриптамина радиозащитный эффект обусловлен, по-видимому, структурой соединения в целом. С этим согласуется более высокая, чем у серотонина, радиозащитная активность при введении препарата непосредственно перед облучением.

Экспериментальная часть

Использовали бутирилхолинэстеразу — препарат холинэстеразы из сыворотки крови лошади производства Московского НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (активность фермента по ацетилхолину 1,64 мкмоль/мин·мг), препарат ацетилхолинэстеразы из эритроцитов крови быка производства Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова (активность по ацетилхолину 0,23 мкмоль/мин·мг).

O-Ацильные производные серотонина и серотонин синтезированы описанными методами [3].

Ацетилхолинхлорид (препарат марки ч.д.а., производство VEB Berlin Chemie) дважды переосаждали из смеси абс. этанол — абс. эфир.

Гидролиз O-ацильных производных серотонина проводили в фосфатном буфере (μ 0,2) при 37°. Запасные растворы субстратов готовили в DMSO, запасные растворы ферментов — в бидистилляте. Реакционная смесь содержала 1,6 или 1,8 мл буфера, 0,1 мл раствора фермента, 0,04—0,1 мл раствора субстрата. Объемная доля DMSO при гидролизе 5,5'-сукциноилдиокситриптамина составляла 20%, при гидролизе остальных субстратов — 5%. Опыты проводили при концентрациях ферментов и субстратов, указанных в табл. 1, соблюдая условие $[S]_0 \gg [E]_0$. За ходом гидролиза эфиров серотонина следили спектрофотометрически по возрастанию оптической плотности, пропорциональной концентрации выделяющегося серотонина [3].

Регистрацию проводили против контрольной кюветы, в которую вместо раствора фермента вносили соответствующее количество бидистиллята.

Начальные скорости ферментативного гидролиза ацетилхолина измеряли потенциометрическим методом при постоянном pH на самопишущем pH-стате Radiometer TTT-1c (Дания). Условия: 37°, 0,2 М KCl, объемная доля DMSO — 5%; pH 7,5 (ацетилхолинэстераза) или 7,8 (бутирилхолинэстераза). Исследование ингибирования бутирилхолинэстеразы серотонином и 5,5'-терефталондиокситриптамином проводили в аналогичных условиях.

Результаты кинетических исследований обрабатывали по методу Лайнуивера — Берка и обсчитывали на ЭЦВМ «Электроника» с использованием метода наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Махаева Г. Ф., Генкина Н. К., Суворов Н. Н. (1975) Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 20, 472—474.
2. Махаева Г. Ф., Ильина Г. Н., Генкина Н. К., Финякин Л. Н., Морозовская Л. М., Неклюдов А. Д., Суворов Н. Н. (1975) Ж. орган. химии, 11, 1489—1498.
3. Махасва Г. Ф., Суворов Н. П., Гинопдан Л. М., Антонов В. К. (1976) Биоорганическая химия, 2, 1381—1388.
4. Foldes F. F., Foldes V. M. (1965) J. Pharmacol. and Exp. Ther., 150, 220—230.
5. Kitz R. J., Karis J. H., Ginsburg S. (1969) Biochem. Pharmacol., 18, 871—881.
6. Hobbiger F., Peck A. W. (1970) Brit. J. Pharm., 40, 745—789.
7. Bovet-Nitti F., Bovet D. (1953) Arch. Pathol. and Pharmacol., 220, 52—58.
8. Foldes F. F. (1955) Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 83, 187—192.
9. Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н. (1976) Биохимия, 41, 264—275.
10. Goedde H. W., Held K. R., Altland K. (1968) Mol. Pharmacol., 4, 274—287.
11. Яковлев В. А., Агабеян Р. С. (1967) Биохимия, 32, 293—301.
12. Покровский А. А. (1962) Актуальные вопросы современной биохимии, с. 233—234, Медгиз, М.
13. Васин М. В., Антипов В. В., Морозовская Л. М., Суворов Н. Н., Ильина Г. Н. (1974) Радиобиология, 14, 242—246.
14. Горелова Н. Н., Шашков В. С., Васин М. В., Суворов Н. Н., Антипов В. В., Саксонов П. П. (1970) Радиобиология, 10, 758—762.
15. Суворов Н. Н., Шашков В. С. (1975) Химия и фармакология средств профилактики радиационных поражений, с. 108—166, Атомиздат, М.

Поступила в редакцию
29.III.1977

CHOLINESTERASE CATALYZED HYDROLYSIS OF O-ACYL DERIVATIVES OF SEROTONIN

MAKHAEVA G. F., SUVOROV N. N., GINODMAN L. M., ANTONOV V. K.

*D. I. Mendeleev Institute of Chemical Technology, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The hydrolysis has been studied of a series of serotonin O-acyl derivatives, containing monocarboxylic and dicarboxylic amino acid residues, catalysed by horse serum butyrylcholinesterase (BuChE) and acetylcholinesterase from bovine erythrocytes (AChE). It was found that AChE cleaves only O-acetylserotonin, whereas BuChE hydrolyzes all the investigated compounds with the exception of 5,5'-terephthaloyldihydroxytryptamine. The kinetic parameters of the hydrolysis were determined. Serotonin O-acyl derivatives were shown to be suitable substrates, while serotonin itself and 5,5'-terephthaloyldihydroxytryptamine were effective competitive inhibitors of BuChE. The estimation of the resistance of serotonin O-acyl derivatives towards blood cholinesterases under physiological conditions shows that the compounds under study, except 5,5'-terephthaloyldihydroxytryptamine, should be rapidly hydrolyzed by BuChE. 5,5'-terephthaloyldihydroxytryptamine was proposed to be used as a radioprotector of prolonged action, which found a support in the results of biological tests.
