



УДК 577.153.4

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В РЕАКЦИИ
С N-МЕТИЛКАРБАМАТАМИ*Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В.**Институт кибернетики Академии наук ЭССР, Таллин;**Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

Определены бимолекулярные константы ингибирования холинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) N-метилкарбатами $\text{CH}_3\text{NHC(O)OX}$, в которых X включает углеводородные, электроотрицательные и заряженные заместители. Установлены размеры участка связывания отщепляющейся группы карбаматов на активной поверхности бутирилхолинэстеразы. Показано, что зависимость скорости карбоилирования активного центра фермента от строения отщепляющейся группы незаряженных ингибиторов описывается уравнением

$$\lg k_{II}^X = C + \rho^* \sigma_X^* + \phi \pi_X,$$

где $\rho^* = 4,4$ и $\phi = 1,9$. Как отклонение от этого уравнения рассчитан эффект «анионного пункта» в специфичности действия бутирилхолинэстеразы, проявляющийся в ее реакции с катионными реагентами. Показано, что специфическое влияние анионного участка в точности компенсирует «антигидрофобное» влияние катионного заряда в отщепляющейся части карбаматов.

Известно, что структура отщепляющейся части карбаматов оказывает сильное влияние на скорость карбоилирования активных центров холинэстераз [1—3]. Можно думать, что при этом проявляются как электронные эффекты, так и гидрофобность заместителей, а в случае катионных групп играет роль также их взаимодействие со специфическим анионным пунктом на активной поверхности фермента.

Недавно было показано, что влияние неионной уходящей группы на бимолекулярные константы ацилирования [4] и фосфорилирования [5] активного центра ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) при постоянстве стерического эффекта описывается уравнением

$$\lg k_{II}^X = C + \rho^* \sigma_X^* + \phi \pi_X, \quad (1)$$

где $\rho^* \sigma_X^*$ и $\phi \pi_X$ — вклады индукционного влияния и гидрофобности заместителя X в уходящей группе. Вклад специфического влияния анионного центра в случае реагентов с катионной группировкой в заместителе X определялся как отклонение величин $\lg k_{II}^{X^+}$ от вычисленных по уравнению (1) [6, 7]:

$$\theta = \lg k_{II}^{X^+} - (C + \rho^* \sigma_X^* + \phi \pi_X). \quad (2)$$

С целью количественного определения роли указанных структурных факторов в специфичности бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) в настоящей работе определены бимолекулярные константы карбоилирования

Бимолекулярные константы ингибирования бутирилхоллинэстеразы
N-метилкарбаматами, $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$, при $25,0^\circ$ и pH 7,40 в 0,15 М КСl
Указаны средневзвешенные отклонения

№ соеди- нения	X	k_{II} , $\text{M}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$	σ_X^*	π_X
1	<i>n</i> -C ₃ H ₇	$(2,00 \pm 0,26) \cdot 10^{-2}$	0	1,50
2	<i>n</i> -C ₄ H ₉	$(8,76 \pm 0,79) \cdot 10^{-2}$	0	2,00
3	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	$(6,94 \pm 0,59) \cdot 10^{-1}$	0	2,50
4	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	$(8,63 \pm 0,84) \cdot 10^{-1}$	0	3,00
5	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	1,95±0,44	0	3,50
6	CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₃	$(1,66 \pm 0,32) \cdot 10$	0	2,98
7	C ₆ H ₅ *	$(9,50 \pm 0,82) \cdot 10$	0,60	2,13
8	CH ₂ C ₆ H ₅	7,03±0,50	0,25	2,26
9	CH ₂ CH=CH ₂	$(7,57 \pm 0,71) \cdot 10^{-2}$	0,23	1,23
10	CH ₂ C≡CH	$(7,67 \pm 0,69) \cdot 10^{-1}$	0,6	0,94
11	CH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₅	$(4,78 \pm 0,55) \cdot 10^{-1}$	0,22	1,95
12	CH ₂ CH ₂ Cl	$(1,39 \pm 0,17) \cdot 10^{-1}$	0,39	1,39
13	CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	$(2,33 \pm 0,19) \cdot 10^2$	0,45	-3,20

* В литературе [3] в близких условиях (25°, pH 7,4; 0,1 М фосфатный буфер) получено значение 90 М⁻¹·мин⁻¹.

Таблица 2

Параметры корреляций по уравнению

$$\lg k_{II}^X = C + \rho^* \sigma_X^* + \pi_X$$

Соединения из табл. 1	Значения опре- деляемых пара- метров	Кoeffици- ент корреля- ции, <i>r</i>	Стандартное отклонение, <i>s</i>	Кoeffициент корреляции между σ_X^* и π_X , r_X
1-3 6-11	$\rho = 1,85 \pm 0,14$ $\rho^* = 4,43 \pm 0,37$ $C = -4,59 \pm 0,33$	0,986	0,22	0,459
1-3 6-12	$\rho = 1,92 \pm 0,18$ $\rho^* = 4,34 \pm 0,47$ $C = -4,74 \pm 0,41$	0,975	0,28	0,494

ее активного центра под действием серии N-метилкарбаматов $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$, где X включает различные углеводородные, электроотрицательные и катионные заместители (см. табл. 1).

Для учета индукционного влияния использовалась шкала, в которой в качестве стандартного заместителя с $\sigma^* = 0$ выступает бесконечно длинная полиметилевоная цепь [8]. В этой шкале индукционные постоянные для алкильных заместителей —CH₃ и —C₂H₅ имеют положительные значения, а для остальных нормальных углеводородных радикалов $\sigma^* = 0$ в пределах точности их определения. Индукционные постоянные для электроотрицательных заместителей в этой шкале эквивалентны константам Тафта σ^* , которые при удлинении углеводородной цепочки между электроотрицательной группировкой и реакционным центром уменьшаются, также приближаясь к нулю, согласно формуле $\sigma_{(\text{CH}_2)_n}^* = 0,384^n \cdot \sigma_X^*$ [8].

Для учета гидрофобности X использовались константы Ханша, π [9, 10]. Величины π для алкильных заместителей рассчитаны согласно аддитивной схеме с использованием для —CH₂— и —CH₃ значения $\pi = 0,5$. Отрицательная π для ониевого заместителя —CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃ связана с энергетической невыгодностью переноса заряженного атома из воды в гидрофобную фазу октанола, выражаемой через инкремент «антигидрофобности» положительного заряда, $\pi_+ = -5,7$ [6, 11].

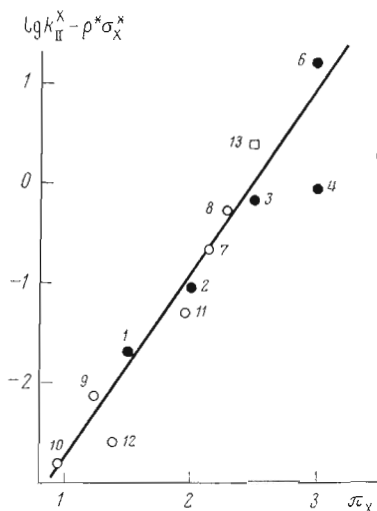
Анализ зависимости реакционной способности карбаматов $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$ от строения заместителя X был проведен методом двухпараметровой корреляции по уравнению (1), так как в данной реакционной серии отсутствует статистически значимая взаимная корреляция между параметрами σ_X^* и π_X (r_X не превышает значения 0,5, см. табл. 2). В корреляции не были учтены $\lg k_{\text{II}}^X$ для *n*-гексил- и *n*-гептилпроизводного, так как длина заместителя X в этих соединениях превышает протяженность гидрофобного участка для связывания отщепляющейся части карбаматов, что приводит к отклонениям от уравнения (1).

Результаты расчетов приведены в табл. 2. Для иллюстрации этих данных на рисунке показана зависимость $(\lg k_{\text{II}}^X - \rho^*\sigma_X^*)$ от π_X для всех исследованных соединений. Зачерненными точками отмечены карбаматы, имеющие в качестве заместителя X углеводородный радикал с $\sigma^* = 0$. Из рисунка видно, что при переходе от *n*-пропильного радикала к *n*-гептильному на графике зависимости $\lg k_{\text{II}}^X$ от π_X наблюдается излом при $\pi \sim 2,5$, что и указывает на ограниченные размеры гидрофобного участка, на котором связывается X. Отметим, что образование излома определяется предельной длиной заместителя (*n*-пентильный радикал), а не насыщенем гидрофобного взаимодействия: на общую прямую с алкильными и электроотрицательными заместителями, имеющими $\pi_X \leq 2,5$, попадает $\lg k_{\text{II}}^X$ для *трет*-бутилэтилпроизводного, величина $\pi_X = 2,98$ у которого значительно превышает 2,5 при «допустимой» протяженности X. Прямая линия на рисунке проведена исходя из значений $\rho^* = 4,4$, $\phi = 1,9$ и $C = -4,6$. От этой прямой отклоняется $\lg k_{\text{II}}^X$ для карбамата с $X = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$. Причина отклонения нам неясна, однако, как видно из табл. 2, включение этой точки не меняет существенно параметров корреляции, хотя и ухудшает ее качество.

Обращает на себя внимание высокая чувствительность реакции карбамолирования холинэстеразы к индукционному влиянию. Найденная величина $\rho^* = 4,4$ значительно превышает все полученные до сих пор значения ρ^* для реакций сериновых гидролаз, в том числе и $\rho^* = 3,0$ для ацетилхолинэстеразного гидролиза ацетатов [4].

В соответствии с представлениями, развитыми в [12, 13], это может быть связано либо с тем, что переходное состояние определяющей стадии процесса карбамолирования холинэстеразы является очень «поздним» (продуктоподобным), либо с тем, что оно находится в микроокружении, существенно отличающемся по сольватирующим свойствам от воды. С другой стороны, чувствительность реакции к изменению гидрофобности заместителя ($\phi = 1,9 \pm 0,1$) мало отличается от $\phi = 1,6 \pm 0,2$, найденного для реакции ацетилхолинэстеразы с ацетатами [4]. Это указывает на близкую аналогию в свойствах участков связывания уходящих групп субстратов для этих ферментов.

Найденные в настоящей работе для реакционной серии $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$ значения C , ϕ и ρ^* допускают количественное определение эффекта ани-



Зависимость $(\lg k_{\text{II}}^X - \rho^*\sigma_X^*)$ от π -константы гидрофобности заместителя X в карбаматах $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$ в их реакции с бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади. Нумерация соединений и условия опытов см. табл. 1. Для $X = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)$ (№ 13) использована π_R , рассчитанная по уравнению (3) с учетом лишь незаряженных атомов

онного пункта в активном центре холинэстеразы на фоне гидрофобного и индукционного влияний. Расчет величины θ для N-метилкарбамоилхолина, согласно уравнению (2), дает значение 11 ± 1 . С другой стороны, отрицательный инкремент в $\lg k_{II}$ для карбаматов с катионной группой в заместителе X, связанный с невыгодностью введения ионного заряда в гидрофобную фазу активного центра фермента, должен составлять ϕ_{\pm} , т. е. в данном случае $1,9 \cdot (-5,7) = -10,8$. Сооставление этих величин показывает, что специфический эффект анионного пункта холинэстеразы θ полностью компенсирует «антигидрофобное» влияние катионного заряда в заместителе. В результате реакционная способность катионных и незаряженных реагентов по отношению к ферменту становится сравнимой. Это обстоятельство проиллюстрировано на рисунке. Видно, что, если в качестве π для $-\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ использовать лишь аддитивный вклад неионизованных атомов, согласно выражению (3) [6, 11],

$$\pi_{X+(R)_i} + 5,7 = \sum_i (\pi_R)_i, \quad (3)$$

то величина $\lg k_{II} - \rho^* \sigma^*$ для N-метилкарбамоилхолина практически попадает на общую прямую с незаряженными электроотрицательными и алкильными заместителями.

Аналогичные результаты были ранее получены в реакциях ацетилхолинэстеразы с катионными субстратами [7] и фосфорорганическими ингибиторами [6]. Для реакции с субстратами было специально показано, что катионные и незаряженные уходящие группы связываются в одном и том же гидрофобном участке на активной поверхности ацетилхолинэстеразы [4]. Исходя из этих данных был сделан вывод, что компенсация эффекта «антигидрофобности» катионного заряда в молекуле субстрата является основной функцией анионного пункта в активном центре этого фермента. Из результатов настоящей работы вытекает, что этот вывод распространяется и на реакцию карбамоилирования бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади. Фермент при этом может использовать гидрофобность субстрата как основу селективности действия и одновременно сохраняет способность эффективно взаимодействовать с реагентами, содержащими ониевые группировки в заместителе.

Экспериментальная часть

Незаряженные N-метилкарбаматы $\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OX}$ (табл. 1) синтезированы из N-метилизоцианата и соответствующего спирта в пиридине [14—16]. Соединение $[\text{CH}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3]\text{I}^-$ получали действием иодистого метила на $\text{ClI}_3\text{NHC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ в абсолютном спирте [17]. Данные анализа ранее не описанных соединений приведены в табл. 3.

Использовали ацетилхолин иодистый марки ч. (Chemapol, Чехословакия), KCl, ос. ч., Na_2HPO_4 , х. ч., KH_2PO_4 , ос. ч., и KOH, х. ч.; лиофильно высушенный препарат холинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производств НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (Москва) с уд. акт. 6,7 Е/мг.

Исходные растворы холинэстеразы с концентрацией белка 13—60 мг/мл готовили в 0,005 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М KCl, и хранили при 4°. Активность фермента в этих условиях в течение месяца практически не менялась.

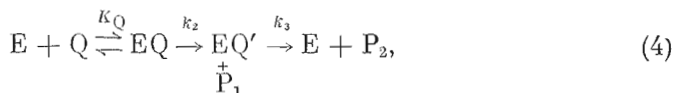
Карбамоилирование фермента проводили при 25° и pH 7,4 в 0,005 М фосфатном буфере, содержащем 0,15 М KCl. После термостатирования 4,8 мл раствора карбамата известной концентрации к нему прибавляли 0,2 мл запасного раствора фермента. Через различные промежутки вре-

Ранее не описанные N-метилкарбаматы, $\text{CH}_3\text{NHC(O)OX}$

X	Выход, %	Т. кипения, мм рт. ст.	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
			C	H	N		C	H	N
n-C ₅ H ₁₁	71,5	77/2	58,1	10,55	9,9	C ₇ H ₁₅ O ₂ N	57,9	10,3	9,7
n-C ₆ H ₁₃	71,0	79-80/1	60,1	10,8	8,8	C ₈ H ₁₇ O ₂ N	60,4	10,7	8,8
n-C ₇ H ₁₅	70,3	100,5-101/1	63,1	11,3	8,1	C ₉ H ₁₉ O ₂ N	62,4	11,0	8,1
CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₃	82,0	127,5-129/28	60,8	10,7	9,1	C ₈ H ₁₇ O ₂ N	60,4	10,7	8,8
CH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₅	59,0	146-147/14	44,1	8,1	8,2	C ₆ H ₁₃ O ₂ NS	44,1	8,0	8,6

мени из этой смеси отбирали пробы по 0,2 мл в термостатированную ячейку рН-стата с 15 мл $2 \cdot 10^{-2}$ М водного раствора ацетилхолина, содержащего 0,15 М KCl (разбавление реакционной смеси в 75 раз). Остаточную активность холинэстеразы в пробе оценивали по начальной скорости ферментативного гидролиза ацетилхолина, которую определяли титрованием выделяющейся кислоты 0,05 М раствором KOH.

Реакцию карбамоилирования проводили до достижения стационарного состояния, $d[EQ']/dt = 0$, когда $\frac{k_2}{K_Q}[E][Q] = k_3[EQ']$, согласно реакционной схеме [1-3]



где E — фермент, Q — карбамат, EQ' — карбамоилфермент, P₁ и P₂ — продукты реакции. Бимолекулярную константу карбамоилирования, $k_{II} = k_2/K_Q$, вычисляли из наклона прямой в координатах $v_0/(v_0 - v_s)$ от $1/[Q]_0$, согласно уравнению

$$\frac{[E]_0}{[EQ']} = \frac{v_0}{v_0 - v_s} = 1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_{II}} \frac{1}{[Q]_0}, \quad (5)$$

где v_0 — скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина при отсутствии карбамата; v_s — скорость гидролиза ацетилхолина в присутствии карбамата в концентрации $[Q]_0$ после достижения стационарного состояния. Поскольку в реакции карбаматов с холинэстеразами k_3 обычно намного меньше, чем k_2 , то соответствующие уравнению (5) прямые должны отсекают отрезок, равный единице на оси ординат. В ряде случаев (соединения 4, 5 и 11 из табл. 1), однако, экспериментальные прямые в координатах $v_0/(v_0 - v_s)$ от $1/[Q]_0$ отсекают на оси ординат отрезок, несколько больший единицы. Возможно, это говорит о сравнимости величин k_2 и k_3 в случае этих карбаматов. Погрешность определения отличия величины отрезка от 1, однако, не позволяет проверить правильность этого предположения и определить соотношение k_3/k_2 и тем самым k_2 и K_Q отдельно.

Для определения k_3 фермент ($[E] = 13-60$ мг/мл) инкубировали в течение 2 ч при 25° в $1 \cdot 10^{-2}$ М растворе N-метилкарбамоилхолина в 0,005 М фосфатном буфере при pH 7,4 и концентрациях KCl 0,15; 0,5; 1,0 и 1,5 М. За это время угнетение активности составляло 90-95%. Затем реакционную смесь пропускали через колонку с сефадексом G-25, чтобы отделить карбамат, и определяли скорость спонтанной реактивации карбамоилфермента методом отбора проб, как описано выше. Константу скорости декарбамоилирования определяли как тангенс угла наклона прямой в координатах $\lg(v_\infty - v_t)$ от t , где v_∞ — скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина под действием полностью реактивировавшегося фермента и v_t — скорость ферментативного гидролиза субстрата в момент времени

t. Было найдено, что при 25° и рН 7,4 $k_3 = (3,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹ и не зависит от концентрации КСl в указанных пределах. В литературе [2] в близких условиях (25°, рН 7,4; 0,1 М фосфатный буфер) было получено значение $4,3 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹.

Кинетические измерения активности холинэстеразы проводили на рН-стате фирмы Radiometer (Дания), комплект ТТТ2/АВU1/SBR3. Вычисления кинетических констант и статистическую обработку экспериментальных данных по методу наименьших квадратов осуществляли на ЭВМ в вычислительных центрах МИТХТ им. М. В. Ломоносова и Института кибернетики АН ЭССР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aldridge W. N., Reiner E. (1972) Enzyme Inhibitors as Substrates: Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids, *Frontiers of Biology*, vol. 26, pp. 130—134, North-Holland, Amsterdam.
2. Simeon V., Reiner E., Vernon C. A. (1972) *Biochem. J.*, **130**, 515—524.
3. Simeon V., Reiner E. (1973) *Arh. hig. rada*, **24**, 199—206.
4. Järv J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 315—322.
5. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов Д. И. (1976) *Биоорганич. химия*, **2**, 978—985.
6. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов Д. И. (1977) *Биоорганич. химия*, **3**, 268—272.
7. Ярв Я. Л., Кесватера Т. А., Аавиксаар А. А. (1976) *Реакц. способн. орг. соедн.*, **13**, 509—514.
8. Пальм В. А., Юсса Т. О., Нуммерт В. М., Тальвик И. В. (1973) *Реакц. способн. орг. соедн.*, **10**, 243—267.
9. Fujita T., Iwasa J., Hansch C. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 5175—5178.
10. Hansch C., Leo A., Unger S. H., Kim K. H., Nikitiani D., Lien E. J. (1973) *J. Med. Chem.*, **16**, 1207—1216.
11. Сякк П. Ф., Аавиксаар А. А., Абдувахабов А. А. (1977) *Изв. АН ЭССР. Серия «Химия — геология»*, № 3, 270—273.
12. Hine J. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 1126—1129.
13. Коппель И. А., Карельсон М. М., Пальм В. А. (1973) *Реакц. способн. орг. соедн.*, **10**, 497—514.
14. Brintzinger H., Pfannstiel K. (1948) *Chem. Ber.*, **81**, 378—380.
15. Childs A. J., Goldsworthy L. J., Harding G. F., Plant S. G. P., Weeks G. A. (1948) *J. Chem. Soc.*, 2320—2322.
16. Ben-Ishai D., Katchalski E. (1951) *J. Org. Chem.*, **16**, 1025—1030.
17. Haworth R. D., Lamberton A. H., Woodcock D. (1947) *J. Chem. Soc.*, 176—182.

Поступила в редакцию
4.IV.1977

BUTYRYLCHOLINESTERASE SPECIFICITY IN REACTION WITH N-METHYLCARBAMATES

IGUMNOVA N. D., AAVIKSAAR A. A., BOGATKOV S. V.

*Institute of Cybernetics, Academy of Sciences
of the Estonian SSR, Tallinn; M. V. Lomonosov Institute
of Fine Chemical Technology, Moscow*

The second-order rate constants of the inhibition of horse serum cholinesterase (EC 3.1.1.8, ChE) by N-methylcarbamates of the general formula $\text{CH}_3\text{NH}(\text{C})(\text{O})\text{OX}$, where X comprises alkyl, electronegative or charged substituents, have been determined at 25° and рН 7.4 in 0.15 М КСl. The ChE-inhibiting activity of the compounds has been described by means of the correlation equation $\lg k_{\text{II}}^{\text{X}} = C + \rho^* \sigma_{\text{X}}^* + \varphi \pi_{\text{X}}$, where $\rho^* = 4,4$ and $\varphi = 1,9$, $\rho^* \sigma_{\text{X}}^*$ and $\varphi \pi_{\text{X}}$ are the contributions of inductive effect and hydrophobicity of a substituent X, respectively. A specific effect of the enzyme «anionic» site in the reaction with cationic substrates has been calculated as the deviation of $\lg k_{\text{II}}^{\text{X}^+}$ for N-methylcarbamylcholine from the correlation equation. It has been shown that the anionic site compensates for «antihydrophobic» influence of cationic charge in the carbamate leaving group, assisting the inhibitor binding to a hydrophobic region of the enzyme active center.