



УДК 577.153 + 541.127 + 547.12

ГИДРОЛИЗ ДИХОЛИНОВЫХ ЭФИРОВ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

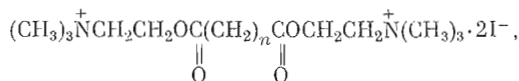
*Алебян Г. Ш., Григорян Н. А., Мнджоян О. Л.,
Самокиш В. А.*

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

*Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна
Академии наук АрмССР, Ереван*

Изучен ферментативный гидролиз ряда дихолиновых эфиров — динодметилатов диметиламиноэтиловых эфиров алифатических дикарбонновых кислот (от янтарной до пробковой) и соответствующих монохолиновых эфиров (кроме пимелиновой кислоты) под действием бутирилхолинэстеразы. Для дихолиновых эфиров разработана специальная методика определения параметров уравнения Михаэлиса — Ментен на основе конкурирующей реакции с α -нафтилацетатом. Показано, что величины константы Михаэлиса (K_m) постоянны в пределах каждого ряда и составляют 10^{-6} и 10^{-3} М для ди- и моноэфиров соответственно. Установлено, что во всем ряду веществ величина максимальной скорости монотонно возрастает (в 200 раз) с ростом расстояния между заряженными группами в молекуле субстрата. Предлагается модель, объясняющая наблюдаемые закономерности.

Дихолиновые эфиры алифатических дикарбонновых кислот являются биологически активными веществами; некоторые из них применяются в медицинской практике [1—4]. Важная особенность этих препаратов — временный характер их действия, связанный с гидролизом ДХЭ бутирилхолинэстеразой. Опубликованные до сих пор данные о кинетических параметрах этой реакции [2—6] относятся к разным членам ряда и получены в разных условиях. Целью настоящей работы было систематическое исследование катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза ряда ДХЭ с общей формулой



где $n = 2, 3, 4, 5$ и 6 .

При ферментативном гидролизе всех исследованных ДХЭ наблюдается характерная зависимость накопления кислотного продукта реакции от времени ($P(t)$). Эта зависимость представлена на рис. 1. Как видно из графика, первоначально под действием фермента происходит равномерный прирост продукта до количества, равного половине ожидаемого при условии полного гидролиза ДХЭ по обоим эфирным связям (участок 1, 2 на рис. 1). Значения скорости гидролиза ДХЭ различны для разных n .

Сокращения: ДХЭ — дихолиновые эфиры алифатических дикарбонновых кислот; НА — α -нафтилацетат.

Концентрацию фермента подбирали такой, чтобы скорость реакции находилась в удобном для измерений интервале. В точке 2 скорость реакции уменьшается практически до нуля. Если после этого в смесь добавить фермент в концентрации, значительно большей той, которая действует на начальном этапе, то наблюдается дальнейшее выделение кислоты (участок 3, 4 на рис. 1). В этой области скорость накопления продукта монотонно уменьшается по мере его прироста.

Эта кинетическая картина может быть интерпретирована следующим образом. На первом этапе идет гидролиз ДХЭ по одной из эфирных связей. Для этой стадии реакции при концентрациях ДХЭ вплоть до 10^{-5} М (предел чувствительности потенциометрического метода в данном интервале рН) реакция протекает в условиях полного насыщения фермента субстратом, т. е. значения K_m существенно меньше 10^{-5} М. Гидролиз второй эфирной связи (участок 3, 4 рис. 1) идет со значительно меньшей скоростью и в условиях промежуточных степеней насыщения фермента субстратом.

Из полученных данных можно определить параметры (V и K_m) уравнения Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}, \quad (1)$$

где v — скорость реакции, $[S]$ — концентрация субстрата для рассматриваемой реакции.

Для первой стадии может быть определено только значение V , равное скорости, наблюдаемой на первом этапе, для второй можно определить и V и K_m по зависимости начальных скоростей реакции от концентрации субстрата. Однако в описанных условиях вторая стадия идет в присутствии продукта первой стадии — холина, который может выступать в качестве обратимого ингибитора [7]. Поэтому измерения зависимости начальных скоростей второй стадии от концентрации субстрата были проведены на специально синтезированных моноэфирах. Типичный график Лайнуивера — Берка представлен на рис. 2.

В табл. 1 приводятся полученные в описанных прямых экспериментах значения V^I для первой стадии реакции, K_m^{II} и V^{II} — для второй,

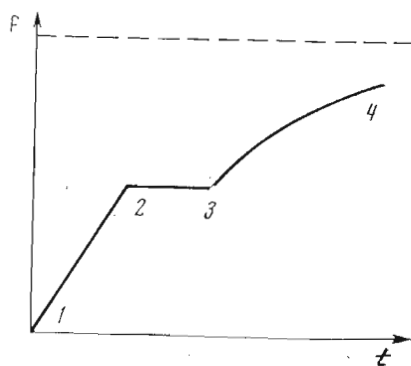


Рис. 1. Зависимость накопления продукта ферментативного гидролиза ДХЭ от времени. Пунктирной линией указано ожидаемое количество дикислоты

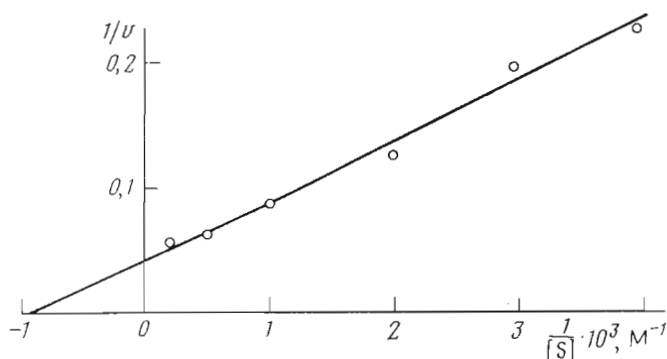


Рис. 2. График Лайнуивера — Берка для соединения с $n = 4$ (моноэфир адипиновой кислоты)

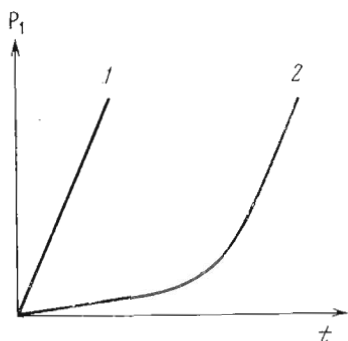


Рис. 3. Накопление продукта гидролиза α -нафтилацетата во времени: 1 — контрольный опыт, 2 — в присутствии ДХЭ

а также значения $K_{m, \phi}^I$ и V_{ϕ}^I для первой стадии реакции, определенные специально разработанным косвенным методом. Суть метода состоит в следующем: в реакционную смесь добавляется конкурирующий с ДХЭ субстрат — α -нафтилацетат в концентрации 10^{-5} М, т. е. значительно меньшей, чем его K_m в реакции гидролиза бутирилхолинэстеразой ($3 \cdot 10^{-4}$ М [8]). В таких условиях можно полагать, что влияние НА на реакцию ферментативного гидролиза ДХЭ пренебрежимо мало. В этих экспериментах гидролиз НА изучался только при низких (до 10%) степенях превращения НА, т. е. при сохранении постоянства концентрации НА. В реакционной смеси флуориметрически измеряли накопление продукта гидролиза НА ($P_1(t)$) во времени.

Типичный график $P_1(t)$ для системы ДХЭ + НА + фермент представлен на рис. 3. При $[ДХЭ] = 0$ $P_1(t)$ представляет собой прямую, а в присутствии достаточных концентраций ДХЭ — кривую (1 и 2 на рис. 3 соответственно). В начале реакции после добавления фермента наблюдается гидролиз НА с постоянной скоростью, но гораздо более низкой, чем в контроле. Затем, в некотором временном интервале, скорость гидролиза НА возрастает до значения контроля. Эта зависимость, очевидно, определяется исчерпанием ДХЭ за счет гидролиза его бутирилхолинэстеразой. Следовательно, из нее можно рассчитать значения K_m и V для ДХЭ.

Важно отметить, что начальная скорость гидролиза НА в указанных условиях не уменьшается с увеличением $[ДХЭ]$, — при этом возрастает только длительность начального периода реакции, т. е. длина начального прямолинейного участка. Наличие этого участка можно объяснить тем, что гидролиз НА происходит не только под действием свободного фермента, но и какого-либо из промежуточных нековалентных соединений реакции ДХЭ с бутирилхолинэстеразой.

Если гидролиз ДХЭ идет в соответствии с уравнением (1), а выражение для скорости гидролиза НА имеет вид

$$v_{НА} = \alpha [E] + \beta [\widetilde{ES}] \quad (2)$$

(α — скорость реакции в контроле, β — значение $v_{НА}$ при насыщающих фермент концентрациях ДХЭ, \widetilde{ES} — промежуточный комплекс реакции ДХЭ с бутирилхолинэстеразой, способный гидролизовать НА) и $[\widetilde{ES}]$ считаем пропорциональной степени насыщения фермента $[S]/(K_m + [S])$,

Таблица 1

Кинетические параметры * гидролиза моно- и дихолиновых эфиров, катализируемого бутирилхолинэстеразой

n	$K_m^I \cdot 10^7$, М	V_{ϕ}^I	$K_m^{II} \cdot 10^3$, М	V^{II}	V^I
2	$5,1 \pm 0,4$	—	$1,49 \pm 0,04$	$(60,7 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$	$0,0094 \pm 0,0003$
3	$4,3 \pm 0,3$	$0,20 \pm 0,09$	$2,3 \pm 0,2$	$0,0119 \pm 0,0004$	$0,25 \pm 0,01$
4	$3,3 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,05$	$0,0203 \pm 0,0005$	$0,30 \pm 0,02$
5	$6,6 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2^{**}$	$0,074 \pm 0,003^{**}$	$0,84 \pm 0,03$
6	$8,9 \pm 0,4$	$0,97 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,1$	$0,22 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,06$

* V для гидролиза ацетилхолина принята за 1.

** Рассчитаны из данных гидролиза ДХЭ.

то для $v_{\text{НА}}$ имеем

$$v_{\text{НА}} = \alpha \frac{K_m}{K_m + [S]} + \beta \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Из уравнения (3) получаем

$$\kappa \equiv \frac{[S]}{K_m} = \frac{\alpha - v_{\text{НА}}}{v_{\text{НА}} - \beta} \quad (4)$$

Если возможно определение $v_{\text{НА}}$ при постоянном $[S]$, то из уравнения (3) можно определить K_m . Однако скорости гидролиза ДХЭ достаточно велики, и такое определение осуществимо только для ДХЭ с $n = 2$. Использование же зависимости $P_1(t)$ во всем временном интервале позволяет определить и V , и K_m . Действительно, берем уравнение Анри [9] в виде

$$K_m \ln \frac{[\text{ДХЭ}]}{[\text{ДХЭ}]_0} + [\text{ДХЭ}] = -tV + [\text{ДХЭ}]_0, \quad (5)$$

где $[\text{ДХЭ}]_0$ — начальная концентрация ДХЭ. Подставим уравнение (4) в (5):

$$K_m \ln \frac{\kappa K_m}{[\text{ДХЭ}]_0} + \kappa K_m = -tV + [\text{ДХЭ}]_0, \quad (6)$$

отсюда

$$X \equiv \ln \kappa e^{\kappa} = -\frac{V}{K_m} t + \ln \frac{[\text{ДХЭ}]_0}{K_m} + \frac{[\text{ДХЭ}]_0}{K_m}. \quad (7)$$

Из зависимости X от t можно определить значение V/K_m , из отсечки при $t = 0$ находим $[\text{ДХЭ}]_0/K_m$, т. е. K_m .

Графики X от t для разных $[\text{ДХЭ}]_0$ представляют собой параллельные прямые. Из значений сдвига прямых по оси t можно найти V :

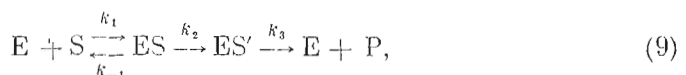
$$\Delta t|_{X=\text{const}} = \frac{K_m}{V} \ln \frac{[\text{ДХЭ}]_0'}{[\text{ДХЭ}]_0''} + \frac{\Delta [\text{ДХЭ}]}{V}, \quad (8)$$

где $[\text{ДХЭ}]_0'$, $[\text{ДХЭ}]_0''$ и $\Delta [\text{ДХЭ}]$ — разные начальные концентрации ДХЭ и их разность соответственно. Таким образом с помощью уравнений (7) и (8) определяются значения V и K_m . Пример графика X от t для разных $[\text{ДХЭ}]_0$ представлен на рис. 4. Сопоставление данных, полученных рассмотренным методом, с данными метода прямого определения (табл. 4) показывает хорошее совпадение определяемых величин.

Прежде чем перейти к интерпретации основных данных, отметим, что гидролиз НА при высоких концентрациях ДХЭ, объясняемый нами как реакция НА с комплексом Михаэлиса или иным нековалентным соединением реакции ДХЭ + бутирилхолинэстераза, может объясняться и наличием в препарате бутирилхолинэстеразы примеси фермента, гидролизующего НА и не реагирующего с ДХЭ. В пользу предпологаемого механизма гидролиза НА свидетельствуют данные о неконкурентных соотношениях в реакциях, катализируемых бутирилхолинэстеразой [10]. Если же в препарате содержится другой фермент, то поправка в значениях V и K_m незначительна — менее 10%.

По данным табл. 1 можно построить общую схему гидролиза ДХЭ как по первой, так и по второй стадии.

Предлагаемая модель основана на общепринятой схеме гидролиза сложных эфиров холинэстеразами:



где ES — комплекс Михаэлиса, ES' — ацилированный фермент.

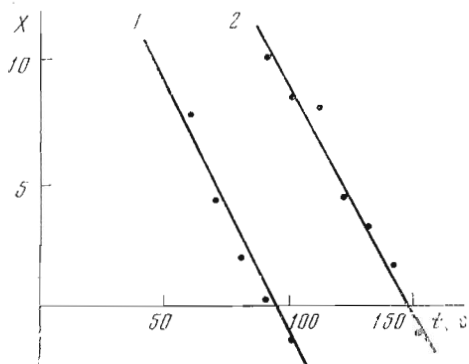


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость X от t для диэтилового эфира глутаровой кислоты при разных начальных концентрациях: 1 — $[DХЭ] = 5$ мкМ, 2 — $[DХЭ] = 10$ мкМ

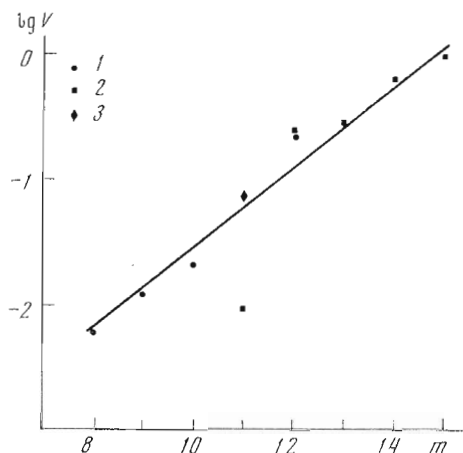


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость $\lg V$ для обеих стадий от числа связей между зарядами (m): 1 — моноэфиры; 2 — ДХЭ; 3 — моноэфир пимелиновой кислоты, значение рассчитано с учетом торможения продуктом из данных, полученных при измерении скорости гидролиза ДХЭ на второй стадии реакции

Для построения модели используем следующие факты: 1) постоянство значений K_m в рядах как у диэфиров, так и у моноэфиров, 2) зависимость V от расстояния между заряженными группами в молекуле субстрата. Последний факт отчетливо иллюстрируется рис. 5, на котором изображена зависимость V от расстояния между зарядами в молекуле субстрата (расстояние в числе межатомных связей). Как видно из рис. 5, знак заряда в удаленной от гидролизуемой связи части молекулы субстрата не имеет значения; V зависит только от расстояния между зарядами и уменьшается при уменьшении его. Эффект соблюдается при изменении V в 200 раз.

Модель содержит четыре основных положения:

1) величина V определяется константой скорости ацилирования для всех соединений, так как только в этом случае возможна независимость K_m от V , если $V = k_2 [E]$, $K_m = k_{-1}/k_1$;

2) молекула субстрата в комплексе Михаэлиса взаимодействует с ферментом в основном одним концом с холинным остатком; при наличии заряда любого знака на другом конце молекулы этот конец предпочтительно взаимодействует с водой — в этом случае возможно постоянство K_m ;

3) зависимость скорости ацилирования фермента от расстояния между зарядами в молекуле субстрата определяется «напряжением» комплекса Михаэлиса вследствие того, что разные части молекулы субстрата взаимодействуют с разными компонентами системы (активным центром фермента и растворителем);

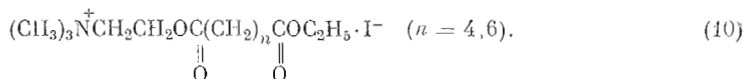
4) различие значений K_m для диэфира и моноэфира связано с различием в константах скоростей образования комплекса Михаэлиса k_1 . Предполагается, что для моноэфиров эти величины значительно меньше тех предельных значений, которые определяются диффузией; возрастание k_1 для диэфиров связано с присутствием в молекуле двух положительно заряженных групп с суммарным зарядом $+2$, тогда как у моноэфира суммарный заряд молекулы равен нулю.

Описанная модель является пока во всех пунктах гипотетической, однако объясняет всю совокупность полученных результатов. Отметим, что в соответствии с этой моделью моноэфиры, не несущие заряда в ацильной

части молекулы, должны гидролизироваться со скоростями, бóльшими, чем у диэфира с $n = 6$. Это предсказание подтверждается значениями максимальных скоростей ферментативного гидролиза субстратов с одним положительным зарядом:

субстрат V	ацетилхолин 1	бутирилхолин 2,5	МХОEt ($n=4$) 1,6	МХОEt ($n=6$) 1,9
-----------------	------------------	---------------------	------------------------	------------------------

Согласно этим данным, ацетилхолин, бутирилхолин и соединения (МХОEt) с формулами



действительно имеют такие значения V , которые согласуются с предлагаемой моделью.

Экспериментальная часть

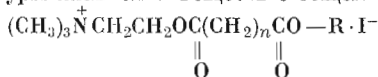
Ферментативный гидролиз сложных эфиров измеряли методом прямого потенциометрического титрования кислотного продукта на приборе рН-262 с записью на ЭПП 09 МЗ и косвенным методом с использованием α -нафтилацетата в качестве конкурирующего реагента с регистрацией с помощью флуориметра [8]. Все эксперименты проводились при 25° в 0,002 М фосфатном буфере, рН 7,6.

Бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) — препарат Пермского НИИ вакцины и сывороток с активностью 13,6 Е/мг.

Ацетилхолинхлорид — препарат производства VEB — Chemie — Berlin — Aldershof, α -нафтилацетат синтезирован и очищен ранее [8], бутирилхолин — марки ч., отечественного производства. Иодметилаты этилдиметиламиноэтиловых эфиров адипиновой и пробковой кислот, а также дихолиновые эфиры дикарбоновых кислот описаны в работе [1]. Синтез моноэфиров — иодметилатов диметиламиноэтиловых эфиров дикарбоновых кислот был проведен следующим путем. Смесь дикарбоновой кислоты с диметиламиноэтанолом (в мольных соотношениях 4 : 1) выдерживали 12—15 ч при 130—140°. За ходом реакции следили с помощью ТСХ — пластинки «Silufol UV₂₅₄», подвижная фаза диоксан — бутанол — водный аммиак (9 : 9 : 4), проявитель — пары иода. Об окончании реакции судили по исчезновению пятна диметиламиноэтанолола. Образовавшуюся массу (15—20 г) растворяли в 70 мл абсолютного этанола при 60—65° и осаждали непрореагировавшую дикарбоновую кислоту охлаждением раствора. Осадок отделяли фильтрованием. Из элюата, в котором оставался моноэфир, частично испаряли этанол и вновь осаждали охлаждением. Такую процедуру повторяли несколько раз. Остаток раствора разбавляли в 500—700 мл абсолютного эфира и охлаждали до 0°. К раствору добавляли свежеперегнанный иодистый метил в количестве, пре-

Таблица 2

Температуры плавления веществ с общей формулой



R	Температура плавления (град) при n , равном				
	2	3	4	5	6
R=H	156–157	114–117	125–129	—	134–137
R=[(CH ₂) ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃] ⁺ I ⁻	249–250	216–217	126–127	159–160	157–159

вышающем количество третичного азота в 2—5 раз, для кватернизации аминоэфира. Смесь хранили в холодильнике в темноте. Продукт выпадал в виде бледно-желтоватых кристаллов, которые отделяли фильтрованием. Выход составлял 60—70%. Кватернизированные моноэфиры идентифицировали ИК-спектрами, титрованием свободной кислотной группы, щелочным гидролизом сложноэфирной связи и элементным анализом. Температура плавления приведена в табл. 2.

Авторы глубоко признательны проф. А. П. Бресткину за участие в обсуждении результатов и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дитилин и опыт его клинического применения, под ред. А. Л. Миджояна (1957) с. 7—28, Изд-во АН АрмССР, Ереван.
2. Brücke F. (1956) *Pharmacological reviews*, 8, 256—335.
3. Рыболовлев Р. С. (1953) Канд. дис. «Фармакологическая характеристика дихолиновых эфиров дикарбоновых кислот и курареподобное действие дитилина», Л.
4. Дардымов Р. И. (1960) Канд. дис. «Фармакологические свойства коркония», Л.— Владивосток.
5. Goedde H. W., Held K. R., Allland K. (1968) *Mol. Pharm.*, 4, 274—287.
6. Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н. (1976) *Биохимия*, 30, 137—140.
7. Бресткин А. П., Иванова А. А., Свечникова В. В. (1965) *Биохимия*, 41, 264—275.
8. Бресткин А. П., Лапицкий К. В., Самокиш В. А., Смирнов О. И. (1974) Докл. АН СССР, 219, 999—1002.
9. Диксон М., Уэбб Э. (1966) Ферменты, с. 105, «Мир», М.
10. Алебян Г. П., Бресткин А. П., Самокиш В. А., Соболева И. П. (1976) III Всесоюзный симпозиум «Структура и функции активных центров ферментов», тезисы стеновых сообщений, с. 9, «Наука», М.

Поступила в редакцию
31.1.1977

BUTYRYLCHOLINESTERASE CATALYZED HYDROLYSIS OF DICARBOXYLIC ACID DICHOLINE ESTERS

ALEBYAN G. P., GRIGORYAN N. A., MNJOYAN O. L.,
SAMOKISH V. A.

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad;
Institute of Fine Organic Chemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan*

The hydrolysis of di- and monocholine iodide esters of a series of dicarboxylic acids (from succinic to suberic) catalyzed by horse serum butyrylcholinesterase has been studied. A new procedure was developed for determining the parameters in Michaelis-Menten equation for substrates having $K_m < 10^{-5}$ M. At 25°, pH 7,6, $2 \cdot 10^{-3}$ M phosphate buffer, the K_m values $(4-10) \cdot 10^{-7}$ M and $(0.9-2.3) \cdot 10^{-3}$ M were found for dicholine and monocholine esters, respectively. The maximal reaction rates for both types of esters monotonously increase (up to 200-fold) on enlargement of the distance between charged groups in the substrate molecule. The model was proposed which rationalizes the observed changes in V_{max} in the examined series.