



УДК 577.153.04

О НЕКОТОРЫХ ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ТОРМОЖЕНИЯ АЦЕТИЛ- И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ

*Ионов С. П., Годовиков Н. Н., Любимов В. С.,
Кабачник М. И.*

Институт элементорганических соединений Академии наук СССР, Москва

В работе проводится сравнительный анализ кинетических схем для описания процесса комбинированного торможения ацетил- и бутирилхолинэстераз фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ). На основе анализа свыше 200 экспериментально определенных констант ингибирования обнаружена линейная зависимость между константами, характеризующими обратимое и необратимое действие ФОИ.

Особенностью процесса комбинированного торможения [1] ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы является зависимость квазибимолекулярной константы ингибирования $k_{II}^{экс}$ от концентрации ингибитора [I] и отличие от нуля экстраполяционного предела $\ln v/v_l$ в точке $t = 0$ (v — скорость гидролиза субстрата в отсутствие ингибитора, v_l — скорость гидролиза после инкубации фермента с ингибитором в течение t мин). Экспериментальная зависимость $k_{II}^{экс}$ от [I] аппроксимируется уравнением (1)

$$k_{II}^{экс} = k_a^{экс} \left(1 + \frac{[I]}{K_{II}^{экс}} \right)^{-1}, \quad (1)$$

на основе которого определяются константы $k_a^{экс}$ и $K_{II}^{экс}$, характеризующие необратимый и обратимый компоненты ингибирования соответственно.

В настоящее время существуют два подхода к описанию процесса комбинированного торможения [2—4]. Первый основан на предположении, что обратимый компонент может быть следствием неправильной сорбции ингибитора на ферменте. В соответствии с этим процесс рассматривается на основе схемы А [2]



где EI — фермент-ингибиторный комплекс, аналогичный комплексу Михаэлиса, EI' — стабильный фосфорилированный фермент, EI_r — непродуктивный комплекс фермента с ингибитором.

В основе подхода, развитого Мейном [3], лежит предположение, что

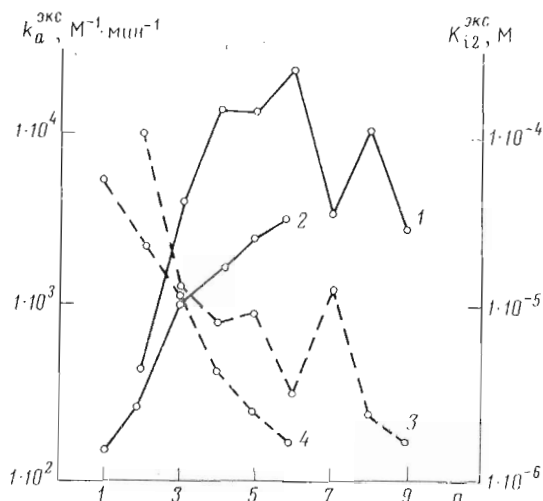
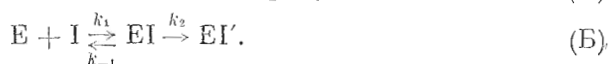
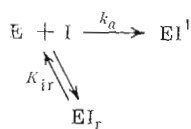


Рис. 1. Антибатная корреляция между $k_a^{\text{экс}}$ (1, 2) и $K_{\text{ir}}^{\text{экс}}$ (3, 4) для двух рядов фосфорорганических ингибиторов: 1, 3 — (*cislo*- C_6H_{11}) $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(n)}$ (бутирилхолинэстераза), 2, 4 — $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$ (ацетилхолинэстераза)

обратимый компонент обусловлен самим существованием комплекса Михаэлиса. Это соответствует схеме без непродуктивного канала (Б)



С кинетической схемой А тесно связана схема В [4]



Так как из экспериментальных данных следует преимущественно конкурентный характер образования обратимого компонента, то предполагается, что непродуктивная сорбция происходит в активном центре фермента.

Процесс торможения обычно исследуется в условиях псевдомономолекулярной реакции, когда концентрация ингибитора существенно превышает концентрацию фермента. Для определения наблюдаемой константы скорости реакций первого порядка приходится пользоваться тестирующей реакцией гидролиза ацетилхолина либо другого субстрата. Такая методика позволяет описать кинетику ингибирования лишь при больших временах взаимодействия фермента с ФОИ, когда текущие концентрации реагентов определяются одноэкспоненциальными функциями времени.

При исследовании роли гидрофобных взаимодействий в процессе торможения каталитической активности холинэстераз был накоплен обширный экспериментальный материал по ингибиторам комбинированного действия [1, 5], кинетика реакций которых с ферментом часто интерпретировалась на основе схемы В. При этом предполагалось, что константы $k_a^{\text{экс}}$ и $K_{\text{ir}}^{\text{экс}}$ являются независимыми константами, определяемыми структурой ингибитора. Проведенное нами сопоставление опытных данных для различных рядов ингибиторов позволило выявить две закономерности.

1. Существует антибатная корреляция между константами $k_a^{\text{экс}}$ и $K_{\text{ir}}^{\text{экс}}$. В качестве примера на рис. 1 приведены указанные зависимости для двух

рядов ингибиторов: $(C_6H_5)_2P(O)SR$ [7], (*cyclo*- C_6H_{11}) $(C_2H_5O)P(O)SCH_2 \cdot CH_2SR^n$ [8].

2. Наблюдается общая для всех комбинированных ингибиторов и не зависящая от фермента линейная корреляция между $\ln k_a^{экс}$ и $\ln K_{ir}^{экс}$ (рис. 2). Обработка 229 экспериментальных точек методом наименьших квадратов приводит к следующему корреляционному уравнению:

$$\ln k_a^{экс} = -\ln K_{ir}^{экс} - 2,24 \quad (2)$$

с коэффициентом корреляции $q = 0,91$.

Существование взаимосвязи между $k_a^{экс}$ и $K_{ir}^{экс}$ не имеет формального объяснения в рамках схемы В и требует привлечения дополнительных предположений о механизме взаимодействия фермента с ингибитором. Из анализа решений кинетических уравнений при условии избытка концентрации ингибитора ($[I] \gg [E]$) следует, что все три кинетические схемы приводят к эквивалентной зависимости квазибимолекулярной константы ингибирования от $[I]$, совпадающей с экспериментальной (4), а параметры $k_a^{экс}$ и $K_{ir}^{экс}$ определяются следующими выражениями:

$$K_{im} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad K_{ir} = \frac{\bar{k}_{-1}}{\bar{k}_1} \quad (9)$$

С х е м а	А	Б	В
$k_a^{экс}$	$k_2 K_{im}^{-1}$	$k_2 K_{im}^{-1}$	k_a
$K_{ir}^{экс}$	$(K_{ir}^{-1} + K_{im}^{-1})^{-1}$	K_{im}	K_{ir}

Сопоставляя полученные результаты, мы приходим к уравнению

$$\ln k_a^{экс} = -\ln K_{ir}^{экс} + \ln \frac{k_2}{1 + \lambda}, \quad \left(\lambda = \frac{K_{im}}{K_{ir}} \right), \quad (3)$$

которое качественно согласуется с эмпирически найденным уравнением (2). Второе слагаемое в правой части (3) является относительно мало меняющейся функцией структуры ингибитора по сравнению с $\ln K_{ir}^{экс}$ и определяет «статистический» разброс экспериментальных точек относительно корреляционной прямой. Действительно, $K_{ir}^{экс}$ характеризует обратимое взаимодействие фермента с ФОИ и изменяется в целом на 5–6 порядков при переходе, например, от $(Ph)_2P(O)SR$ к $(C_4H_9O)_2P(O)SCH_2CH_2N^+(CH_3)_2PhR$ вследствие изменения сорбционных свойств ингибитора. В то же время величина $k_2/1 + \lambda$, характеризующая процесс фосфорилирования фермента и в значительной степени определяемая барьером для разрыва P–S- или P–Z-связи (Z – уходящая группа), изменяется в пределах 2–3 порядков. Если $K_{ir}^{экс}$ определяется непродуктивной сорбцией, то $\lambda \gg 1$ и из уравнения (3) следует нарушение корреляции между экспериментально определяемыми параметрами. Отметим, что условие $\lambda \gg 1$ может реализовываться в том случае, если центры продуктивного и непродуктивного связывания существенно различны, что трудно увязать с конкурентным характером обратимого компонента.

Аналогичный вывод следует из рассмотрения условия антибатности констант $k_a^{экс}$ и $K_{ir}^{экс}$ в отдельных рядах ФОИ: $k_a^{экс} K_{ir}^{экс} = \text{const}$. Величина k_2 в схеме А является относительно мало меняющимся параметром, и разумно предположить, что для ингибиторов с идентичным строением основных функциональных групп она будет приблизительно постоянной. Тогда антибатная зависимость существует, если $\lambda \approx \text{const}$. Это условие не требует значительного различия продуктивного и непродуктивного комплексов. Поскольку связывание ингибитора в обоих типах комплек-

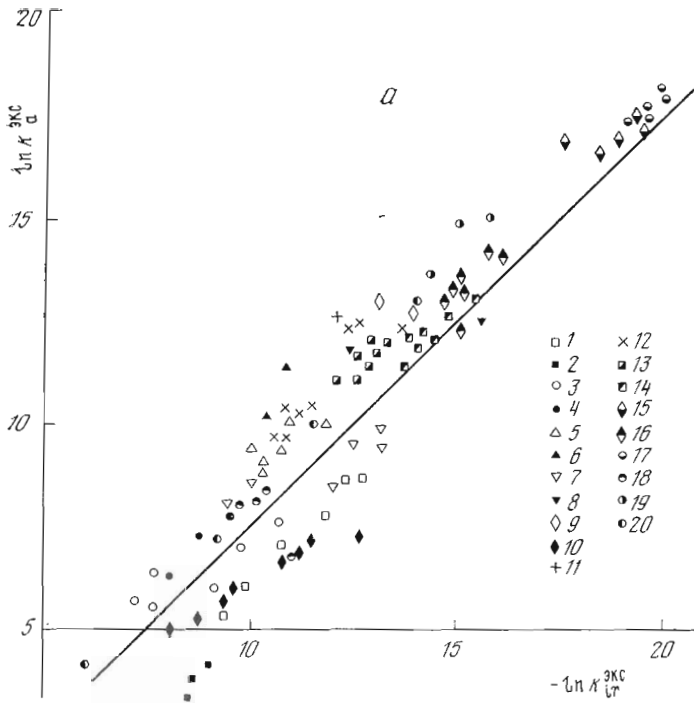


Рис. 2. Корреляционная зависимость между $\ln k_a^{\text{ЭКС}}$ и $\ln K_{\text{ir}}^{\text{ЭКС}}$ для ацетихолинэстеразы (а) и бутирилхолинэстеразы (б). Прямая на обоих рисунках соответствует уравнению (2) в тексте

- а: 1 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [7], з — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 3-5$ [7],
 2 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [10], 4 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [10],
 3 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [10], 5 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [11],
 6 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [11],
 7 — $(\text{R}^{(6)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [12], 8 — $(\text{R}^{(6)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [12],
 9 — $\text{Ph}(\text{R}^{(n)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(1)}$, $n = 5,6$ [15],
 10 — $(c\text{-C}_6\text{H}_{11})(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(n)}$, $n = 2-9$ [8],
 11 — $(c\text{-C}_6\text{H}_{11})(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}^{\ddagger}(\text{R}^{(1)})\text{R}^{(n)}$, $n = 9$ [8],
 12 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{PhCH}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(n)}$, $n = 2-9$ [16],
 13 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^{\ddagger}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [1, 17],
 14 — $(\text{R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [6],
 15 — $(\text{R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^{\ddagger}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [6],
 16 — $(\text{R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [18],
 17 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^{\ddagger}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [18],
 18 — $(i\text{-R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [19],
 19 — $(i\text{-R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}^{\ddagger}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 3-5$ [19],
 20 — $(\text{AB})\text{P}(\text{O})\text{SCH}(\text{Ph})_2$ [20]

сов может происходить по одним и тем же центрам, пропорциональность между $K_{\text{ин}}$ и K_{ir} объяснима. Очевидно, что среди многообразия комбинированных ФОИ можно найти и такой, в котором обратимый компонент обусловлен непродуктивной сорбцией. Однако нецелесообразно априори приписывать экспериментальному параметру $K_{\text{ir}}^{\text{ЭКС}}$ физический смысл константы, характеризующей непродуктивное связывание, без достаточной опытной проверки. По-видимому, можно считать, что $K_{\text{ir}}^{\text{ЭКС}}$ характеризует концентрацию фермент-ингибиторного комплекса с адсорбированным на активном центре ингибитором. Тогда параметр $\tau = (k_a^{\text{ЭКС}} \times K_{\text{ir}}^{\text{ЭКС}})^{-1}$ определяет среднее время превращения такого комплекса в

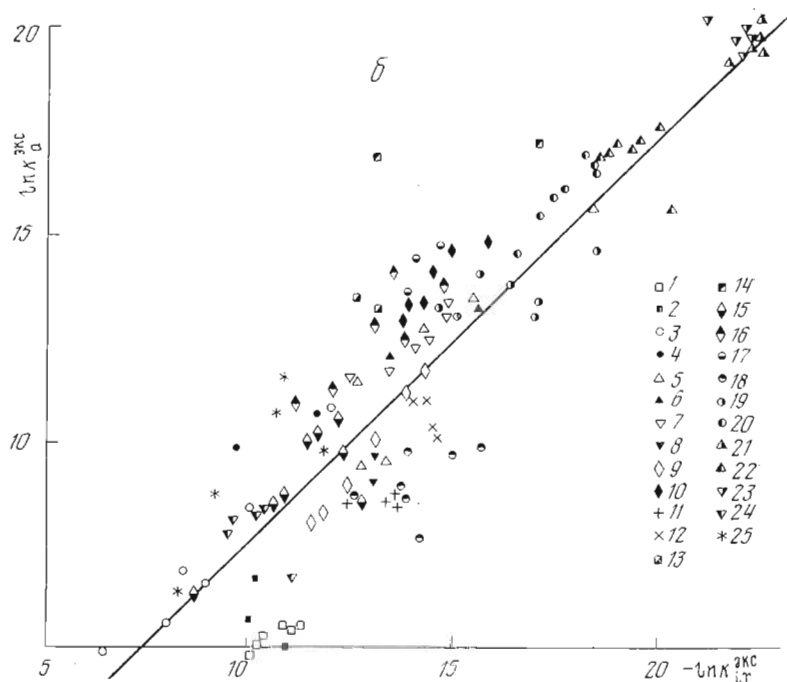
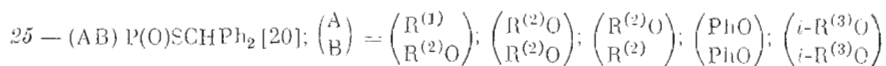


Рис. 26: 1 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [9], 2 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 3-5$ [9],
 3 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [10], 4 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [10],
 5 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [11], 6 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [11],
 7 — $(\text{R}^{(6)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [12], 8 — $(\text{R}^{(6)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(i\text{-R}^{(n)})$, $n = 4,5$ [12],

- 9 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{-CH}_2\text{SR}^{(n)}$, $n = 1-6$ [13],
 10 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{R}^{(1)})\text{R}^{(n)}$, $n = 1-6$ [13],
 11 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{SR}^{(2)}$, $n = 3-6$ [14],
 12 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{S}(\text{CH}_2)_n\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{R}^{(1)})\text{R}^{(2)}$, $n = 3-6$ [14],
 13 — $\text{Ph}(\text{R}^{(n)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(1)}$, $n = 5,6$ [15],
 14 — $\text{Ph}(\text{R}^{(n)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{R}^{(1)})_2$, $n = 5,6$ [15],
 15 — $(c\text{-C}_6\text{H}_{11})(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(n)}$, $n = 2-9$ [18],
 16 — $(c\text{-C}_6\text{H}_{11})(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{R}^{(1)})\text{R}^{(n)}$, $n = 2-5, 8, 9$ [8],
 17 — $(\text{R}^{(2)}\text{O})\text{PhCH}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SR}^{(n)}$, $n = 4, 6, 7$ [16],
 18 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [1, 17],
 19 — $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [1, 17],
 20 — $(\text{R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [6],
 21 — $(\text{R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [6],
 22 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-7$ [18],
 23 — $(\text{R}^{(4)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{\oplus}{\text{N}}(\text{R}^{(1)})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [18],
 24 — $(i\text{-R}^{(3)}\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{(1)}\text{C}_6\text{H}_4\text{X}^{(l)}$, $l = 1-5$ [19],



$\text{R}^{(n)} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $\text{X}^{(1)} = p\text{-OR}^{(1)}$, $\text{X}^{(2)} = p\text{-R}^{(1)}$, $\text{X}^{(3)} = m\text{-R}^{(1)}$, $\text{X}^{(4)} = \text{H}$, $\text{X}^{(5)} = m\text{-OR}^{(1)}$, $\text{X}^{(6)} = p\text{-Cl}$, $\text{X}^{(7)} = m\text{-Cl}$; Ph = C_6H_5 , i — изо, c — цикло

Фосфорилированный фермент, а его относительное постоянство для данной серии ингибиторов обуславливает антибатную зависимость между $k_a^{\text{акс}}$ и $K_{ir}^{\text{акс}}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалнев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. (1971) Докл. АН СССР, **200**, 103—105.
2. Aldridge W. N., Reiner E. (1969) *Biochem. J.*, **115**, 147—158.
3. Main A. R. (1964) *Science*, **144**, 992—993.
4. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В. (1966) Реакционная способность органических соединений, **3**, 231—243.
5. Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Агабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В. (1970) Успехи химии, **34**, 1050—1079.
6. Бресткин А. П., Брик И. Л., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Свидрицкая Н. Н., Смусни Я. С., Трифонова С. А. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., № 12, 2811—2815.
7. Агабекян Р. С., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Ольховая Г. Г. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1369—1372.
8. Кузамышев В. М., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Агабекян Р. С., Киреева Е. Г., Пегова З. К., Кабачник М. И. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1600—1605.
9. Агабекян Р. С., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Ольховая Г. Г. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 450—453.
10. Ольховая Г. Г., Берхамов М. Х., Агабекян Р. С., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1837—1839.
11. Ольховая Г. Г., Агабекян Р. С., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1840—1843.
12. Ольховая Г. Г. (1975) Кандидатская диссертация «Синтез и взаимодействие с холинэстеразами некоторых тиоэфиров кислот пентавалентного фосфора», М.
13. Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Карданов Н. А. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 622—627.
14. Волкова Р. И., Карданов Н. А., Бресткин А. П., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И. (1973) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2114—2119.
15. Беканов М. Х., Бресткин А. П., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Смирнов О. И., Ольховая Г. Г. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2573—2576.
16. Агабекян Р. С., Берхамов М. Х., Годовиков Н. Н., Кузамышев В. М., Музыкашова В. Н., Беканов М. Х., Кабачник М. И. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1868—1872.
17. Гурдалнев Х. Х. (1972) Кандидатская диссертация «Синтез и антихолинэстеразные свойства некоторых азотсодержащих эфиров дифенилфосфиновой и дифенилтиофосфиновой кислот», М.
18. Бресткин А. П., Брик И. Л., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Свидрицкая Н. Н., Смусни Я. С., Трифонова С. А. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2805—2808.
19. Бресткин А. П., Брик И. Л., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Киреева Е. Г., Трифонова С. А. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 429—431.
20. Матрьюкова Т. А., Агабекян Р. С., Урюпин А. Б., Кабачник М. И. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2317—2324.

Поступила в редакцию
22.VI.1978

ON SOME REGULARITIES OF THE COMBINED INHIBITION OF ACETYL- AND BUTYRYLCHOLINESTERASES BY ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

I. IONOV S. P., GODOVIKOV N. N., LYUBIMOV V. S., KABACHNIK M. I.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A comparative analysis of kinetic schemes describing the combined inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterases by organophosphorus inhibitors has been done. Examination of above 200 experimentally determined inhibition constants revealed the linear relationship between the constants relevant to the reversible and irreversible action of these compounds.