



УДК 577.152.143'14

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ

1-МЕТИЛ-4-АРИЛ-1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ

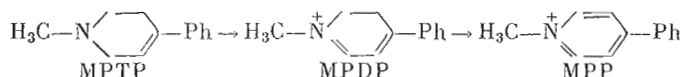
Бачурин С. О., Саблин С. О., Гришина Г. В.,
Гайдарова Е. Л.*, Дубова Л. Г., Зубов Н. Д.**

*Институт физиологически активных веществ Академии наук СССР,
Черноголовка;*

** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Исследованы кинетические закономерности катализируемого моноаминоксидазой дегидрирования 1-метил-4-арил-1,2,3,6-тетрагидропиринов — нейротропных циклических аналогов биогенных аминов. Показано, что присутствие метильного заместителя в фенильном фрагменте молекулы существенно улучшает связывание этих субстратов с ферментом, однако влияние этого заместителя на каталитическую стадию зависит от его положения в кольце. *о*- и *м*-Метильные производные окисляются преимущественно Б-формой фермента, тогда как *п*-метильное производное — как Б-, так и А-формой. В ходе окисления этих соединений (особенно метильных производных) моноаминоксидаза необратимо ингибируется дигидропиридиневыми продуктами реакции. Значительная и зависящая от структуры субстрата скорость ингибирования фермента, возможно, обуславливает различия в нейротропных свойствах гомологичных соединений данного рода.

Не так давно было установлено [1, 2], что моноаминоксидазы (МАО) помимо своей традиционной функции — катализа окислительного дезаминирования биогенных аминов — могут катализировать дегидрирование некоторых производных 1,2,3,6-тетрагидропиридина, которые можно рассматривать как циклические аналоги катехол- и фенилалкиламинов. Биотрансформация МРТР (I), протекающая под действием МАО, приводит к образованию нейроактивных метаболитов, которые вызывают в центральной нервной системе у лабораторных животных специфическую деградацию дофаминергических нейронов, подобную изменениям, наблюдаемым при паркинсонизме [3–5]. Установлено, что окисление МРТР протекает в два стадии: сначала образуется 2,3-дигидропиридиний (MPDP), который затем окисляется до пиридиния (MPP):



Первая из этих реакций, по данным ингибиторного анализа, катализируется преимущественно Б-формой МАО, тогда как вторая, по всей видимости, может осуществляться как ферментативным, так и неферментативным путем [2, 6, 7]. Как показали многочисленные эксперименты с препаратами фермента из разных источников, различия в видовой и региональной чувствительности к физиологическому действию МРТР обусловлены не различиями в природе МАО [7], а специфичностью транспортных процессов, в первую очередь системы обратного захвата дофамина [8]. Таким образом, роль МАО в действии МРТР и его аналогов заключается в обеспечении образования MPP-подобных метаболитов в соответствии с субстратной специфичностью фермента.

Принятые сокращения: МРТР — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; MPDP — 1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридиний; MPP — 1-метил-4-фенилпиридиний; МАО — моноаминоксидаза.

Кинетические параметры ферментативного окисления субстратов MAO

Соединение	$k_{кат}$, мин ⁻¹	K_m , мкМ	$k_{кат}/K_m$, мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_i , М ⁻¹ ·мин ⁻¹	v
Бензиламин	200±20	430±90	0,46±0,11	—	—
(I)	60±6	330±20	0,18±0,02	29±4	6300±350
(II)	270±30	60±3	4,5±0,5	205±30	22000±2000
(III)	55±6	50±3	1,1±0,1	610±100	1800±250
(IV)	5±0,2	25±2	0,2±0,04	125±30	1600±200

Несмотря на значительный интерес, связанный с изучением процессов биотрансформации МРТР под действием MAO, практически нет данных о структурной специфичности MAO в реакции дегидрирования тетрагидропиридинов. Целью настоящей работы явилось изучение основных кинетических закономерностей катализируемого MAO дегидрирования МРТР и его аналогов с учетом возможности инактивации фермента в ходе реакции. В качестве субстратов фермента исследованы соединения ряда 1-метил-4-толилтетрагидропиридинов. МРТР-подобная активность этих веществ зависит от положения метильной группы в фенильном фрагменте: *n*- и *m*-толильные производные совершенно неактивны, тогда как *o*-толильное производное превосходит МРТР по специфическому действию на дофаминергические нейроны [9].

Мы установили, что кинетика дегидрирования МРТР и его *o*- и *m*-метильных производных (II) и (III) хорошо описывается уравнением Михаэлиса — Менген (таблица). В случае *n*-метильного производного (IV) наблюдается более сложная кинетика — излом на кривой в координатах Лайнуивера — Берка. Формально такая зависимость может быть охарактеризована двумя парами кинетических параметров K_m и V для низких (<2,0 мМ) и высоких (>2,0 мМ) концентраций субстрата. Учитывая возможность участия в реакции двух форм фермента, различающихся субстратной специфичностью, мы исследовали конкурентное ингибирование [10] окисления МРТР и его аналогов такими специфическими субстратами А- и В-форм MAO, как серотонин и бензиламин. Оказалось, что бензиламин конкурентно и обратимо ингибирует образование дигидропиридиниев из соединений (I) — (III) во всем исследованном диапазоне концентраций субстрата, а из соединения (IV) — только в области низких (<2,0 мМ) концентраций (рис. 1). Значения констант ингибирования K_i бензиламином были близки для всех соединений (0,34±0,15 мМ) и практически совпадали со значением K_m для бензиламина (0,43±0,1 мМ). Серотонин не влияет на дегидрирование соединений (I) — (III), но ингибирует дегидрирование соединения (IV) в области высоких концентраций последнего. Эти результаты дают основание предположить, что дегидрирование соединений (I) — (III) осуществляется почти исключительно той формой MAO, которая специфична к бензиламину. Такой вывод хорошо согласуется с данными о преимущественном окислении МРТР В-формой фермента, полученными при изучении ингибирования MAO хлоргидрином и депренилом [7]. Окисление *n*-толильного производного (IV), очевидно, может происходить под действием обеих форм фермента. Кинетика процесса в этом случае описывается уравнением

$$v = v_A + v_B = \frac{V^A [S]_0}{K_m^A + [S]_0} + \frac{V^B [S]_0}{K_m^B + [S]_0} \quad (1)$$

Известно, что при $K_m^A > K_m^B$, $V^A > V^B$ и $K_m^A/V^A \gg K_m^B/V^B$ зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в координатах $1/v$ от $1/[S]$ представляет собой кривую, линейные асимптоты которой при $[S]_0 > K_m^A$ и $[S]_0 < K_m^B$ позволяют определить кинетические параметры обеих реакций [11]. На рис. 2 показано, что экспериментальные данные о фермен-

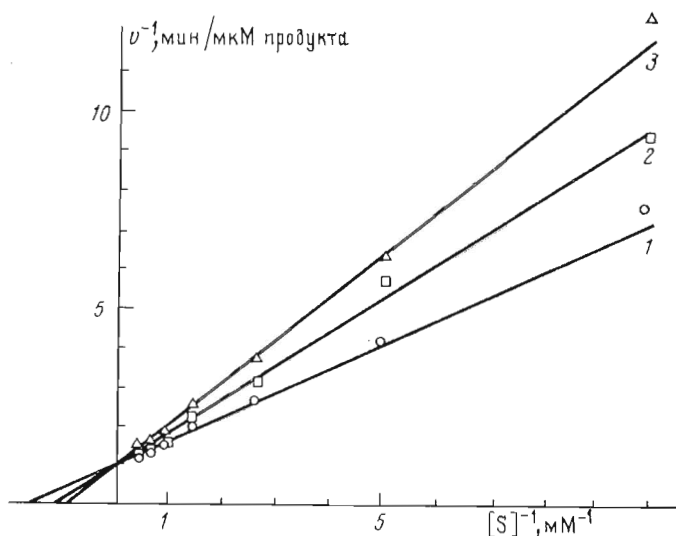


Рис. 1. Конкурентное ингибирование бензиламином катализируемого MAO дегидрирования МРТР (концентрации бензиламина в мМ): 1 - 0; 2 - 0,2; 3 - 0,4 (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,5; 25° С). Аналогичные зависимости получены для соединения (II), (III) и (IV) при низких (<0,2 мМ) концентрациях последнего

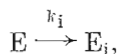
тативном окислении соединения (IV) хорошо описываются уравнением (1) при значениях $K_m^A = 10,0 \pm 5,0$ мМ; $V^A = 140 \pm 50$ мкМ·мин⁻¹; $K_m^B = 25 \pm 2$ мкМ; $V^B = 11,5 \pm 0,5$ мкМ·мин⁻¹. Очевидно, что при конкурентном ингибировании серотонином дегидрирования соединения (IV) величина K_m должна зависеть от концентрации серотонина:

$$K_m^{A(\text{каж})} = K_m^A \left(1 + \frac{[\text{серотонин}]}{K_i^C} \right).$$

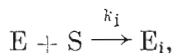
Константа ингибирования K_i^C при этом должна быть равна величине K_m для серотонина. На графике Лайнуивера — Берка конкурентное ингибирование серотонином должно отражаться в увеличении наклона линейного участка в области $[S]_0 > K_m^{A(\text{каж})}$ при сохранении точки пересечения с осью ординат. Такой эффект действительно наблюдается (рис. 2). Определить значение K_i^C , однако, не удалось ввиду значительной ошибки в оценках $K_m^{A(\text{каж})}$ при разных концентрациях серотонина (линейный участок кривой при этом смещается в область очень высоких концентраций субстрата).

Как отмечалось в работах [7, 12], в ходе окисления 4-арил-1,2,3,6-тетрагидропиридинов происходит инактивация MAO. Проводя реакцию в условиях, когда образуются исключительно 2,3-дигидропиридиновые продукты, можно подробно исследовать механизм инактивации фермента. Известно, что инактивация ферментов в ходе реакции может протекать по различным механизмам [13]:

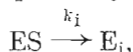
1) реакция, не зависящая от субстрата:



2) бимолекулярная реакция ингибирования субстратом:



3) инактивация фермента в фермент-субстратном комплексе:



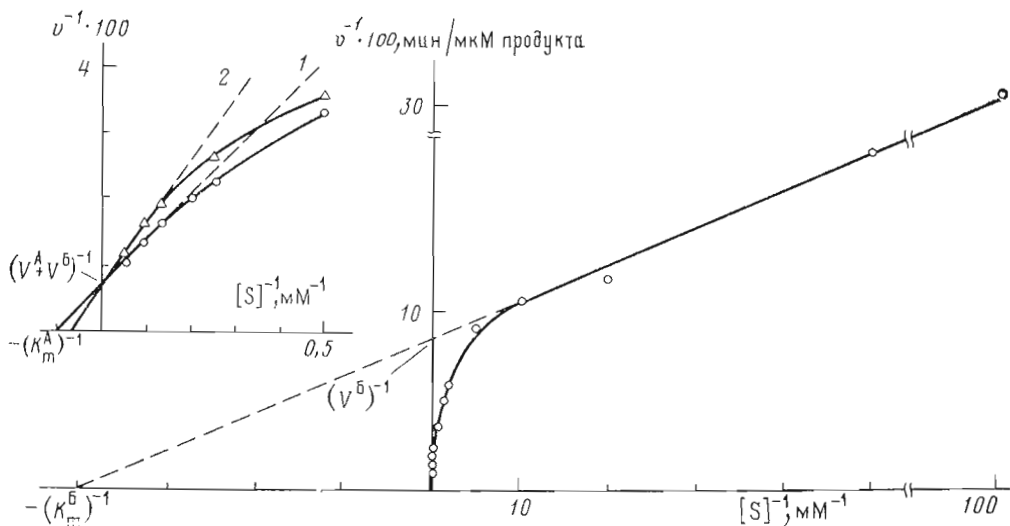


Рис. 2

Рис. 2. Кинетика окисления А- и В-формами МАО соединения (IV) в отсутствие (1) и в присутствии 2 мМ серотонина (2)

Рис. 3. Зависимость параметра β от степени конверсии субстрата (α) (условия см. «Экспериментальную часть»)

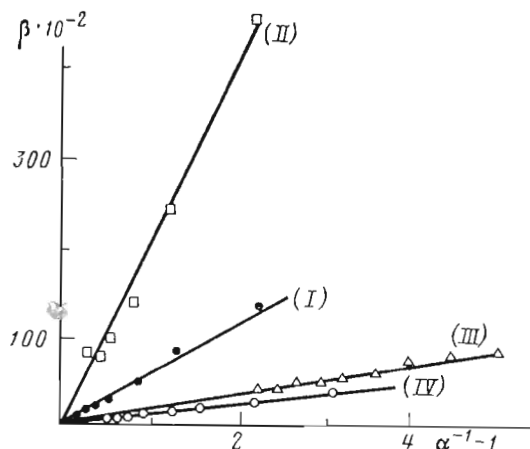


Рис. 3

4) ингибирование фермента продуктом в бимолекулярной реакции



или в комплексе фермент — продукт



Эксперименты по инактивации МАО в отсутствие субстратов, а также изучение влияния субстратов на начальные скорости реакции показали, что первые два из приведенных выше механизмов инактивации фермента не реализуются. Для дискриминации остальных механизмов в работе [13] предложено исследовать зависимость степени превращения субстрата (α) от начальной концентрации фермента при низких степенях конверсии субстрата. В настоящей работе этот метод, однако, не применим, поскольку спонтанное образование соединений типа MPP из 2,3-дигидропиридиниев не позволяет достаточно точно оценить предельную конверсию субстрата на первой стадии дегидрирования. Поэтому мы разработали иной метод дискриминации механизмов, основанный на изучении зависимости отношения скоростей накопления продукта и инактивации фермента (β) от концентрации субстрата и продукта реакции. При этом в случае механиз-

ма (3) получаем

$$\beta_3 \equiv \frac{d[P]/dt}{d[E]/dt} = \frac{k_{\text{кат}}}{k_i} = \text{const},$$

тогда как для механизма (4)

$$\beta_4 = \frac{k_{\text{кат}}/K_m(\text{как})}{k_i} \left(\frac{[S]_0 - [P]}{[P]} \right) - 1,$$

где k_i — эффективная константа инактивации второго порядка, равная k_i^0 при механизме (4а) и k_i'/K_1 при механизме (4б). Таким образом, изучая зависимость β от отношения $\frac{[S]_0 - [P]}{[P]} \equiv \alpha^{-1} - 1$, можно дискриминировать

указанные механизмы инактивации фермента. Заметим, что при инактивации фермента по механизмам (1) и (2) значения параметра β определяются следующими выражениями:

$$\beta_1 = \frac{k_{\text{кат}}/K_m(\text{как})}{k_i} ([S]_0 - [P])$$

и

$$\beta_2 = \frac{k_{\text{кат}}/K_m(\text{как})}{k_i}$$

Данные рис. 3 приводят к выводу, что инактивация MAO в ходе дегидрирования исследованных арилтетрагидропиридинов осуществляется как ингибирование фермента дигидропиридиновым продуктом реакции (4а) или (4б). Из тангенса угла наклона прямых (γ) в координатах $\beta - (\alpha^{-1} - 1)$ можно вычислить отношение скоростей дегидрирования и инактивации, а также рассчитать эффективную константу инактивации k_i . Анализ кинетических параметров, приведенных в таблице, позволяет сделать ряд выводов об основных кинетических закономерностях катализируемого MAO дегидрирования арилтетрагидропиридинов.

1. Метильный заместитель в фенильном фрагменте молекулы МРТР существенно улучшает связывание субстрата с ферментом, однако его влияние на каталитическую стадию зависит от положения этого заместителя в кольце. В целом все метильные производные МРТР характеризуются более высокими значениями эффективной константы скорости второго порядка ($k_{\text{кат}}/K_m$) по сравнению с МРТР. Возможно, что взаимное расположение фенильного и тетрагидропиридинового фрагментов в метильных производных МРТР (особенно в соединении (II)) таково, что эти соединения конформационно подобны эндогенным субстратам MAO: β -фенилэтиламину, дофамину, тирамину и др. (в этих субстратах плоскость этиламинного фрагмента повернута относительно плоскости фенильного кольца на $70-90^\circ$ [14]).

2. Соединения (I)–(III) — специфичные субстраты Б-формы MAO. Соединение (IV) в низких концентрациях окисляется преимущественно Б-формой, а при высоких концентрациях (>1 мМ) — преимущественно А-формой MAO.

3. При окислении МРТР и особенно его метильных производных MAO необратимо ингибируется дигидропиридиновыми продуктами. Значительный вклад ингибирования фермента в процессе дегидрирования субстратов приводит к тому, что окисление соединений, имеющих равные (IV) и более высокие (III) значения каталитических параметров ($k_{\text{кат}}/K_m$) по сравнению с МРТР, будет происходить с меньшими предельными степенями конверсии. Этот эффект может объяснить отмеченные ранее различия в нейротропных свойствах гомологов МРТР.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты MAO из печени свиньи, выделенные из митохондриальной фракции мембран по модифицированной методике

[15]. При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препарат фермента давал одну основную полосу, соответствующую субъединице MAO (60 кДа). Активность MAO определяли спектрофотометрически [16] и полярографически [17], используя в качестве субстратов бензиламин и серотонин. Соотношение активностей по данным субстратам (3 мМ) составляло 3:1. За окислением МРТР и его производных следили спектрофотометрически по скорости накопления 2,3-дигидропиридиновых продуктов реакции в условиях, когда образование МРР-подобных соединений практически не происходило (поглощение при 280–310 нм не изменялось). Экспериментально определяли молярные коэффициенты поглощения 2,3-дигидропиридиновых продуктов (в $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, в скобках длина волны в нм), полученных из МРТР — 13,0 (343); соединения (II) — 7,0 (330); соединения (III) — 9,5 (350) и соединения (IV) — 9,6 (360). Скорость инактивации MAO в процессе дегидрирования оценивали по падению скорости окисления бензиламина ферментом, предварительно инкубированным определенное время с препаратами МРТР и его аналогами. Отношение концентраций этих субстратов и бензиламина составляло не менее 1:20. Ошибки рассчитанных значений кинетических параметров определяли по методу, описанному в [18].

1-Метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (I). Раствор 10,6 г (55,5 ммоль) 1-метил-4-гидрокси-4-фенилпиперидина (V) в 30 мл смеси уксусной и соляной кислот (2:1) кипятили в течение 6 ч, а затем упарили его досуха. Выход хлоргидрата 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина 8,5 г (73%), т. пл. 241–242°С (из этанола).

Аналогично из соединений (VI)–(VIII) получали хлоргидраты соединения (II), выход 85%, т. пл. 205–206°С (из этанола), соединения (III), выход 60%, т. пл. 212–213°С (из этанола), соединения (IV), выход 80%, т. пл. 202–203°С (из смеси изопропанол — ацетон; ср. [19, 20]).

1-Метил-4-гидрокси-4-фенилпиперидин (V). К 2,7 г (0,38 моль) лития и 50 мл абсолютного эфира, помещенным в трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, при перемешивании прибавляли несколько капель раствора бромбензола в абсолютном эфире и нагревали колбу до начала реакции. Не охлаждая смесь, в течение 30 мин прибавляли 30,1 г (0,19 моль) бромбензола. После 3 ч перемешивания реакционную смесь охлаждали до 0–5°С и при этой температуре прибавляли раствор 15,5 г (0,14 моль) 1-метилпиперидона-4 в абсолютном эфире. После 2 ч перемешивания при комнатной температуре медленно прибавляли 50 мл воды, охлаждая колбу в ледяной бане. Эфирный слой, объединенный с эфирными вытяжками (8×50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 . Раствор упарили. Остаток после упаривания перекристаллизовали из этанола. Выход 13,4 г (51%), т. пл. 114–115°С (из ацетона) [19, 20].

1-Метил-4-гидрокси-4-(о-толил)пиперидин (VI) получали аналогично соединению (V) из 0,4 г (59,9 ммоль) лития, 5,1 г (29,9 ммоль) *о*-бромтолуола и 2,4 г (31,4 ммоль) 1-метилпиперидона-4. Выход 3,0 г (68%), т. пл. 135–136°С (из гептана).

1-Метил-4-гидрокси-4-(м-толил)пиперидин (VII) получали аналогично соединению (V) из 0,2 г (29,9 ммоль) лития, 2,6 г (14,9 ммоль) *м*-бромтолуола и 1,2 г (10,7 ммоль) 1-метилпиперидона-4. Выход 1,8 г (82%), т. пл. 85–86°С (из гептана).

1-Метил-4-гидрокси-4-(п-толил)пиперидин (VIII) получали аналогично соединению (V) из 2,1 г (0,3 ммоль) лития, 25,7 г (0,15 ммоль) *п*-бромтолуола и 10,0 г (0,09 ммоль) 1-метилпиперидона-4. Выход 12,3 г (67%), т. пл. 124–126°С (из гептана) [19, 20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chiba K., Trevor A., Castagnoli N. Jr. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 120. № 2. P. 574–578.
2. Heikkila R. E., Manzino L., Cabbat F. S., Duvoisin R. C. // Nature. 1984. V. 311. P. 467–469.
3. Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I. // Science. 1983. V. 219. P. 979–980.

4. Burns R. S., Chiueh C. C., Markey S. P., Ebert M. H., Jakobowitz D. M., Kopin I. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 4546-4550.
5. Jenner P., Marsden C. D. // J. Neural Transmission. Suppl. XX. 1986. V. 11-39.
6. Chiba K., Peterson L. A., Castagnoli K. P., Trevor A. J., Castagnoli N. Jr. // Drug Metabol. Disp. 1985. V. 13. № 3. P. 342-347.
7. Glover V., Gibb C., Sandler M. // J. Neural Transmission. Suppl. XX. 1986. P. 65-67.
8. Javitch J. D., D'Amato R. S., Strittmater S. M., Snyder S. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. 1985. V. 82. № 7. P. 2173-2177.
9. Youngster S. K., Sonsalla P. K., Heikkila R. E. // J. Neurochem. 1987. V. 48. № 3. P. 929-934.
10. Housley M. D., Tipton K. F. // Biochem. J. 1973. V. 135. P. 173-186.
11. Segel I. H. // Enzyme Kinetics. New York - London - Sydney - Toronto; John Wiley & Sons, 1976. P. 64-71.
12. Singer T. P., Salach J. I., Crabtree D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. № 2. P. 707-712.
13. Варфоломеев С. Д. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 3. С. 343-354.
14. Tollenaere J. P., Moereels H., Raumaekers L. A. // Atlas of the Three - Dimensional Structure of Drugs. Amsterdam - New York - Oxford: Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1979. P. 63-65.
15. Minamiura N., Yasunobu K. T. // Arch. Biochem. and Biophys. 1978. V. 189. P. 481-489.
16. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M. // J. Biol. Chem. 1954. V. 208. P. 645-661.
17. Lasbennes F., Sercombe R., Verrecchia C., Seylaz J. // Life Sci. 1985. V. 36. № 23. P. 2263-2268.
18. Корниш-Бойден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. С. 232-266.
19. Ziering A., Berger L., Heineman S. D., Lee J. // J. Org. Chem. 1947. V. 12. № 6. P. 894-903.
20. McElvain S. M., Sajranski J. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1950. V. 72. № 7. P. 3134-3138.

Поступила в редакцию
22.VI.1988

После доработки
15.IX.1988

**MONOAMINE OXIDASE CATALYSIS OF BIOCONVERSION
OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE 1-METHYL-4-ARYL-
1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINES**

BACHURIN S. O., SABLIN S. O., GRISHINA G. V.*, GAYDAROVA E. L.*,
DUBOVA L. G., ZUBOV N. D.*

*Institute of Physiologically Active Substances, Academy of Sciences
of the USSR, Chernogolovka, Moscow Region;*

* M. V. Lomonosov Moscow State University

Kinetics of monoamine oxidase (MAO) catalyzed dehydrogenation of neurotropic analogues of biogenic monoamines in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine series were studied. It is shown that methyl substitution in the phenyl ring increases significantly the enzyme-substrate affinity, but the substituent's effect on the catalytic stage largely depends upon its position in the ring. *o*- and *m*-Methyl derivatives were preferably oxidized by B type of MAO, whereas *p*-total derivative was oxidized by B type as well as by A type of the enzyme. In the course of the oxidation reactions MAO is irreversibly inhibited by the dihydropyridinium product of the reaction, particularly in case of methyl derivatives. The significant and structure-dependent inhibition of the enzyme might be responsible for the differences in neurotropic properties of the above substrate homologues.