



УДК 577.152.311'14:547.1'118.5:541.6

© 1992 г. А. П. Бресткин, Ю. Г. Жуковский, С. Н. Моралев,
В. И. Розенгайт, Е. Е. Сочиллина, О. В. Ягодина,
Л. А. Вихрева*, Н. Н. Годовиков*, М. И. Кабачник*

О МЕХАНИЗМЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛЕНОВЫХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург;

* Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва

Показано, что ацетиленовые фосфорорганические ингибиторы (ФОИ) холинэстераз общей формулы $(C_2H_5O)_2P(O)SC\equiv CR$ обладают свойствами, характерными для типичных ФОИ. Фермент, ингибированный производными диэтилтиофосфорной кислоты с тройной связью и без нее, реактивируется под действием 1,3-триметилен-бис(4-пиридинальдоксим)дибромидом с равными скоростями. Константы скорости ингибирования (k_{11}) ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека для ацетиленовых ФОИ при воздействии тетраалкиламмониевых ионов и pH изменяются симбатно изменению k_{11} для типичных ФОИ. Найдено, что при ферментативном гидролизе эфиров тиоуксусной кислоты, содержащих ацетиленовую связь, отщепляется S-алкиниловый радикал. Эти соединения не обладают способностью необратимо ингибировать ацетилхолинэстеразу эритроцитов.

Ранее [1–4] мы нашли, что значительного увеличения антихолинэстеразной активности тиолфосфорорганических ингибиторов можно достичь введением тройной связи в тиозфирный радикал. В некоторых случаях такие S-алкиниловые эфиры тиокислот фосфора по ингибирующей активности превосходят свои насыщенные прототипы в тысячи и миллионы раз. Некоторые из них сильнее ингибируют «своеобразные» холинэстеразы членистоногих, чем «типичные» холинэстеразы млекопитающих (ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) эритроцитов человека и мозга мыши и холинэстеразу (КФ 3.1.1.8) сыворотки крови лошади), что является одной из причин их избирательной токсичности.

Можно предположить, что взаимодействие фермента с ацетиленовыми ФОИ, как и с типичными ФОИ, приводит к фосфорилированию активного центра фермента. Достаточно надежной мерой фосфорилирующей способности ФОИ является константа их щелочного гидролиза (k_{OH}). Проведенные опыты показали, что величины k_{OH} ацетиленовых ФОИ действительно выше, чем соответствующие величины для их насыщенных прототипов [1]. Однако усиление фосфорилирующей активности ФОИ количественно значительно ниже увеличения способности ингибировать фермент. Кроме того, наблюдается большое различие в величинах «ацетиленового» эффекта у одного и того же соединения в отношении холинэстераз различного происхождения, что также не может быть объяснено только изменением фосфорилирующей способности. Такое несоответствие позволяет предположить другой механизм необратимого ингибирования ферментов ацетиленовыми ФОИ — например, алкилирование активного центра. Хорошо известно [5], что производные α -пропинамина необратимо

Сокращения: ФОИ — фосфорорганические ингибиторы; ТМВ-4 — 1,3-триметилен-бис(4-пиридинальдоксим)дибромид.

Бимолекулярные константы скорости ингибирования (k_{II}) ацетилхолинэстеразы под действием ФОИ общей формулы $R_2P(O)R'$ и последующей реактивации ($k_{II, r}$) с помощью ТМВ-4 ($[TMB-4] = 2,1 \cdot 10^{-5} M$)

Ингибитор	R	R'	k_{II}	$k_{II, r}$
			$M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	
I	C_2H_5O	$-SC \equiv CC_6H_{11}$ -цикло	$3,1 \cdot 10^8$	$0,82 \cdot 10^4$
II	C_2H_5O	$-SC \equiv CC_2H_4SC_2H_5$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^4$
III	C_2H_5O	$-S(CH_2)_4SC_2H_5$	$8,0 \cdot 10^2$	$0,97 \cdot 10^4$
IV	C_2H_5O	$-SC_6H_4NO_2-n$	$1,5 \cdot 10^6$	$0,92 \cdot 10^4$
V	CH_3O	$-SC \equiv CC_6H_{11}$ -цикло	$2,0 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^4$
VI	CH_3O	$-SC \equiv CC_6H_5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^4$
VII	CH_3O	$-SC_6H_4NO_2-n$	$8,1 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$

ингибируют моноаминоксидазы именно в результате алкилирования этого фермента.

Для проверки правомочности такого предположения необходимо было прежде всего выяснить возможность восстановления активности фермента, ингибированного в результате взаимодействия с ацетиленовыми ФОИ, с помощью известных реактиваторов холинэстераз.

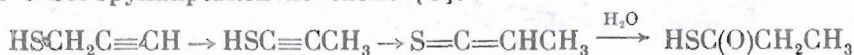
Из табл. 1 видно, что ацетилхолинэстераза, ингибированная различными производными диэтилтиофосфорной кислоты — ацетиленовыми ингибиторами (соединения I и II), насыщенным прототипом (III) или параксоном (IV), реактивируется под действием ТМВ-4 с одинаковыми скоростями. Это свидетельствует о том, что образуется фосфорилированный фермент одинакового строения: $E-OP(O)(C_2H_5O)_2$. Аналогичные результаты получились и в опытах с ацетиленовыми производными диметилтиофосфорной кислоты (соединения V и VI) и метилпараоксоном (VII).

Полученные данные позволяют считать, что инактивация фермента и при действии ацетиленовых ФОИ наступает вследствие фосфорилирования гидроксила серина. Однако они не дают ответа на вопрос, что происходит с S-алкиниловым радикалом после разрыва тиоэфирной связи: остается ли он связанным с ферментом или переходит в реакционную среду.

Максимальная концентрация S-алкинилового радикала, образующегося в процессе ингибирования, не может превысить концентрацию активных центров холинэстераз и в тысячи раз меньше той концентрации SH-групп, которая может быть определена современными химическими методами, например методом Элмана. Поэтому нами было исследовано взаимодействие холинэстераз с субстратами — S-алкиниловыми эфирами тиоуксусной кислоты: $CH_3C(O)SCH_2C \equiv CH$ (соединение VIII) и $CH_3C(O) \cdot SC \equiv CC_6H_5$ (соединение IX).

Проведенные опыты показали, что оба эфира хотя и медленно, но гидролизуются под действием как ацетилхолинэстеразы, так и бутирилхолинэстеразы. Использование реактива Элмана доказывает, что продукт реакции, имеющий SH-группировку, переходит в реакционную среду. Этим соединением мог быть или нестабильный ацетиленовый меркаптан, который взаимодействует с реактивом Элмана в момент отщепления от молекулы субстрата, или продукт его превращения. Опыты, в которых реактив Элмана прибавляли только после окончания ферментативной реакции, также показали наличие продукта с сульфгидрильной группой.

Возможно, что S-алкинилмеркаптан, отщепляемый от молекулы субстрата или от молекулы ацетиленового ФОИ, превращается в прочный продукт с SH-группировкой по схеме [6]:



или



По-видимому, такие продукты превращения S-алкинилового радикала могут образовываться и при щелочном гидролизе как ацетиленовых ФОИ, так и ацетиленовых субстратов. Было установлено, что при щелочном гидролизе ацетиленовых ФОИ и субстратов количество щелочи (моль), израсходованной на нейтрализацию образующихся продуктов, почти в 2 раза превышает количество исходных соединений. В аналогичных опытах с ацетилтиохолином такое превышение составляло всего 1,4 раза, т. е. в случае с ацетиленовыми соединениями щелочь связывалась не только соответствующей фосфорной и уксусной кислотой, но и ацетиленовым меркаптаном или продуктом превращения этого меркаптана. По кислотным свойствам этот продукт значительно превосходит обычные меркаптаны (тиохолин), что подтверждает справедливость приведенной схемы.

Нами установлено также, что в процессе холинэстеразного гидролиза этих ацетиленовых субстратов каталитическая активность обоих ферментов полностью сохраняется. Типичный опыт представлен на рис. 1. Видно, что под действием высоких концентраций фермента гидролиз идет до конца, причем при добавлении новой порции субстрата до исходной концентрации скорость гидролиза остается прежней, о чем свидетельствует одинаковый тангенс угла наклона начального участка кривых. Следовательно, продукты холинэстеразного гидролиза ацетиленовых субстратов не вызывают необратимого ингибирования, т. е. не связываются необратимо с каталитическим центром фермента.

Таким образом, по отношению к холинэстеразам S-алкиниловые эфиры тиоуксусной кислоты ведут себя только как субстраты.

Большое сходство между ацетиленовыми и обычными ФОИ наблюдалось также в характере зависимости величин k_{H} от pH (рис. 2) и от присутствия в реакционной среде тетраалкиламмониевых ионов (табл. 2). Оба фактора, влияющие на изменение конформации и степень ионизации функциональных групп фермента, одинаково воздействовали на скорость ингибирования ацетилхолинэстеразы ацетиленовыми ФОИ и их насыщенными прототипами.

Таблица 2

Константы обратимого ингибирования тетраалкиламмониевыми ионами реакции взаимодействия ацетилхолинэстеразы с ФОИ общей формулы $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P(O)R}$

Ингибитор	R	K_i, M		
		$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+\text{I}^-$	$(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+\text{I}^-$	$(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+\text{I}^-$
II	$-\text{SC}\equiv\text{CC}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_5$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$
III	$-\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{SC}_2\text{H}_5$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$
XI	$-\text{SC}\equiv\text{CC}_6\text{H}_5$	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-5}$
XII	$-\text{SC}_2\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$	$6,1 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-5}$

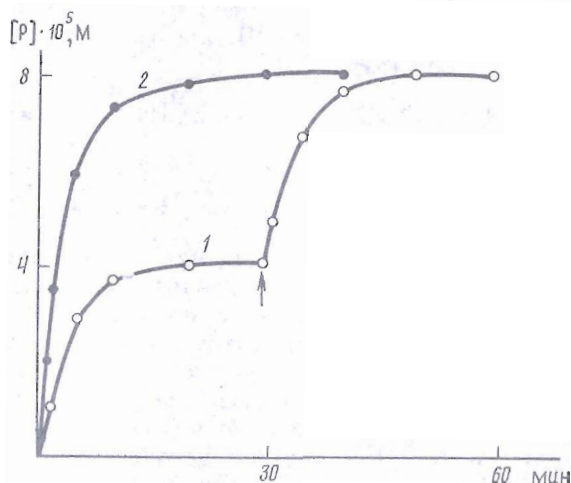


Рис. 1

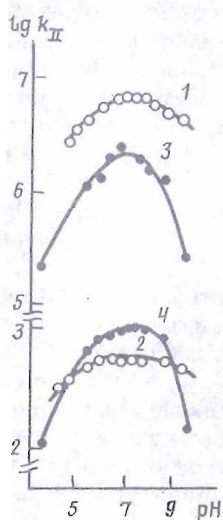


Рис. 2

Рис. 1. Гидролиз $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{SC}\equiv\text{CC}_4\text{H}_9$ (IX) под действием холинэстеразы лошади. $[\text{E}] = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, $[\text{S}] = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (1); $8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (2). Стрелкой показан момент добавления новой порции субстрата

Рис. 2. Зависимость скорости взаимодействия ацетилхолинэстеразы с ФОИ от pH. ФОИ: II (1), III (2), I (3), X $((\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_{11}\text{-цикло})$ (4). Структуру ФОИ см. в табл. 1

На основании полученных данных можно сказать, что взаимодействие холинэстераз с ацетиленовыми ФОИ в основном протекает по тому же механизму, что и с обычными ФОИ. Роль же ацетиленовой группировки заключается, по-видимому, в значительном ускорении образования фермент-ингибиторного комплекса и в значительном ускорении элементарного акта фосфорилирования, приводящего к образованию фосфорилированного фермента.

Экспериментальная часть

Исследованные ферменты: частично очищенные препараты ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства Пермского НИИ вакцин и сывороток с удельной активностью соответственно 2,2 и 20 МЕ/мг белка.

Исследованные ФОИ (соединения I—III, V, VI, X—XII) были синтезированы по методике, описанной в работах [3, 4], а S-алкиниловые эфиры тиюксусной кислоты (VIII) и (IX) (см. выше) — согласно [7, 8].

Скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолина и ацетиленовых эфиров тиюксусной кислоты определяли при 25°С и рН 7,5 методом Элмана [9] в среде 0,05 М Na-фосфатного буфера, если не указано иначе.

Бимолекулярную константу k_{II} ($M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) скорости взаимодействия холинэстераз с ФОИ определяли известным методом [10] и вычисляли по формуле

$$k_{II} = \frac{2,303}{t \cdot [I]} \lg \frac{v_0}{v_i},$$

где v_i — скорость ферментативного гидролиза ацетилтиохолина после t мин инкубации фермента с ФОИ в концентрации $[I]$, во много раз превышающей концентрацию активных центров фермента $\{(1-4) \cdot 10^{-11} \text{ М}\}$; v_0 — скорость ферментативного гидролиза субстрата в отсутствие ФОИ. Концентрацию ингибитора подбирали экспериментально так, чтобы активность фермента снижалась на 20–80%. Значения концентраций варьировали от $(0,3-1) \cdot 10^{-9} \text{ М}$ для наиболее сильных соединений (I и V) до $(0,5-1,5) \cdot 10^{-4} \text{ М}$ для наиболее слабых (III и X). 0,2 мл смеси растворов фермента и ФОИ инкубировали 1–5 мин, затем добавляли 1,5 мл 0,001 М раствора субстрата и реактива Элмана ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$) и через 15 мин определяли величину v_i . При определении v_0 раствор субстрата добавляли к 0,2 мл раствора фермента.

Влияние тетраалкиламмониевых ионов на бимолекулярную константу скорости взаимодействия ацетилхолинэстеразы с ФОИ оценивали по величине константы обратимого ингибирования K_i (М), определяемой по изменению константы скорости инактивации фермента под действием ФОИ в присутствии обратимого ингибитора. Величину K_i находили, согласно [11], по уравнению

$$k_{II, i} = k_{II} \frac{1}{(1 + [I]/K_i)},$$

где $[I]$ — концентрация обратимого ингибитора. График этой зависимости в координатах $1/k_{II} - [I]$ представляет собой прямую, отсекающую на оси абсцисс отрезок, равный $(-K_i)$.

Влияние рН на скорость взаимодействия холинэстераз с ФОИ исследовали в области значений рН 3–11 в среде 0,01 М буфера. Через 10 мин инкубации фермента с ФОИ при исследуемом рН в реакционную среду добавляли раствор субстрата и реактива Элмана в 0,2 М буфере, рН 7,5, и определяли каталитическую активность фермента (v_i). Для определения v_0 проводили параллельный опыт без ФОИ.

Бимолекулярную константу скорости реактивации $k_{II, r}$ ($M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) рассчитывали по формуле

$$k_{II, r} = \frac{2,303}{\tau[R]} \lg \frac{(v_0 - v_i)}{(v_0 - v_r)},$$

где v_0 — исходная скорость ферментативного гидролиза субстрата, v_i — остаточная скорость гидролиза после взаимодействия фермента с ФОИ, v_r — скорость гидролиза субстрата после τ мин взаимодействия ингибированного фермента с реактиватором в концентрации $[R]$. Величина $(v_0 - v_i)$ прямо пропорциональна исходному количеству фосфорилированного фермента, а $(v_0 - v_r)$ — количеству фосфорилированного фермента после частичной реактивации за время τ .

Через 5 мин инкубации ацетилхолинэстеразы с ФОИ добавляли рас-

твор реактива Элмана и субстрата. Часть этой реакционной смеси (0,5 мл) помещали в термостатированную кювету спектрофотометра Spectol-211, измеряли оптическое поглощение раствора при 412 нм через каждые 10 с и рассчитывали среднее значение v_1 , выраженное в нарастании оптического поглощения (ΔE) за 10 с. К оставшейся реакционной смеси (1,2 мл) добавляли 0,05 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора ТМВ-4, затем через каждые 10 с в течение 5 мин измеряли оптическое поглощение и рассчитывали величину v_2 по формуле

$$v_2 = E_{\tau+0,083} - E_{\tau-0,083},$$

где τ — среднее время (в мин), прошедшее с момента приливания раствора ТМВ-4, а $E_{\tau+0,083}$ и $E_{\tau-0,083}$ — оптическое поглощение раствора при двух соседних измерениях, больших или меньших τ на 5 с (0,083 мин). Исходную скорость ферментативного гидролиза субстрата (v_0) определяли в аналогичных опытах без ФОИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балашова Е. К., Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Вихрева Л. А., Годовиков Н. Н., Бабашева К. К., Кабачник М. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 2. С. 503–506.
2. Балашова Е. К., Бресткин А. П., Вихрева Л. А., Годовиков Н. Н., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Кабачник М. И. // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1982. Т. 18. № 4. С. 325–329.
3. Годовиков Н. Н., Вихрева Л. А., Балашова Е. К., Бресткин А. П., Моралев С. Н., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Кабачник М. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 6. С. 1863–1868.
4. Годовиков Н. Н., Вихрева Л. А., Даришева А. М., Балашова Е. К., Моралев С. Н., Бресткин А. П., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е., Кабачник М. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1987. № 1. С. 170–176.
5. Горкин В. З. Аминоксидазы и их значение в медицине. М.: Наука, 1981. С. 175.
6. Pourcelot M. G. // Comptes Rendu. 1965. V. 260. P. 2847–2855.
7. Старшинова Л. А., Шелковников С. А., Вихрева Л. А., Пудова Т. А., Гуляжов М., Абдувахабов А. А., Годовиков Н. Н. // Хим.-фармацевт. журн. 1989. № 10. С. 1306–1309.
8. Brandsma L. // Preparative Acetylenic Chemistry. Amsterdam; London; New York: Elsevier Sci. Publ. Co., 1971. P. 69–70.
9. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. № 1. P. 88–95.
10. Бресткин А. П., Вихрева Л. А., Годовиков Н. Н., Горбатько В. С., Моралев С. Н., Кабачник М. И. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1988. № 9. С. 2118–2123.
11. Григорьева Г. М. // Биохимия. 1965. Т. 30. № 2. С. 415–422.

Поступила в редакцию 6.V.1991

После доработки 30.I.1992

A. P. BRESTKIN, Yu. G. ZHUKOVSKIY, S. N. MORALEV, V. I. ROZENGART,
E. E. SOCHILINA, O. V. YAGODINA, L. A. VIKHREVA*, N. N. GODOVIKOV*,
M. I. KABACHNIK*

ON THE MECHANISM OF ANTICHOLINESTERASE ACTION OF ACETYLENIC ORGANOPHOSPHORUS INHIBITORS

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg;

** A. N. Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Introduction of the triple bond in the leaving group of the organophosphorus inhibitor molecule gives a sharp raise of the inhibitor activity but does not change principal characteristics of the cholinesterase inhibition mechanism. The reactivation experiments suggest that inactivation of cholinesterases by these compounds occurs due to phosphorylation of the serine hydroxyl by the corresponding phosphoric acid. A close similarity was shown between acetylenic and saturated organophosphorus inhibitors in altering k_2 upon change of pH and tetraalkylammonium ions action. It is demonstrated that S-alkynyl esters of thioacetic acid are slowly hydrolyzed by acetylcholinesterase and cholinesterase without irreversible inhibition of the enzymes.