



УДК 577.156.3

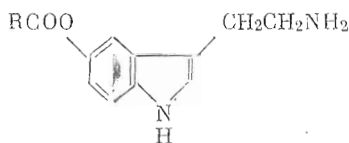
ГИДРОЛИЗ О-АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СЕРТОНИНА α-ХИМОТРИПСИНОМ И ТРИПСИНОМ

*Махаева Г. Ф., Суворов Н. Н., Гинодман Л. М.,
Антонов В. К.*

*Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева;
Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследовано 8 О-ацильных производных серотонина с точки зрения возможного использования их в качестве препаратов типа «депо серотонина». Глицид-, β-аланил-, γ-аминобутирилсеротонин непригодны для этой цели из-за быстрого спонтанного гидролиза. Определены кинетические параметры гидролиза эфиров серотонина химотрипсином и трипсином. Трипсин проявляет значительно большую каталитическую активность по отношению к исследованным субстратам, чем химотрипсин, причем с максимальной скоростью им гидролизуются ε-аминокапроилсеротонин. Анализ полученных данных указывает, что ε-аминокапроил- и ω-аминоэтанонилсеротонин могут эффективно гидролизироваться под действием ферментов крови, обладающих триптической активностью, что следует учитывать при рекомендации их в качестве препаратов пролонгированного действия. Эфиры уксусной, янтарной и терефталевой кислот относительно устойчивы как к спонтанному, так и к триптической гидролизу, что дает возможность рассматривать их как потенциальные препараты типа «депо серотонина». Изучение ингибирующего действия серотонина позволяет высказать предположение о существенной роли непродуктивного связывания при ферментативном гидролизе О-ацильных производных серотонина.

О-Ацильные производные серотонина [1 — 4], обладающие, как и сам серотонин, важными фармакологическими свойствами (изменение просвета кровеносных сосудов и др.) и радиозащитной активностью, содержат лабильную сложноэфирную связь, что позволяет рассматривать эти соединения как потенциальные препараты типа «депо серотонина». В связи с этим представляло интерес выяснить, в какой мере О-ацильные производные серотонина могут гидролизироваться ферментами крови, обладающими триптической и химотриптической активностью. Целью данной работы являлось изучение гидролиза под действием трипсина и химотрипсина ряда эфиров серотонина, содержащих остатки монокарбоновых и аминокислот:



(R = CH₃—(I), NH₂CH₂—(II), NH₂(CH₂)₂—(III), NH₂(CH₂)₃—(IV), NH₂(CH₂)₅—(V),
NH₂(CH₂)₆—(VI)),

Устойчивость О-ацильных производных серотонина

| Соединение | $\tau_{1/2}$, мин | |
|------------|----------------------------------|---|
| | спонтанный гидролиз, рН 7,4; 37° | гидролиз под действием ферментов крови, обладающих триптической активностью * |
| (I) | 2000 | 840 |
| (II) | 6 | 120 |
| (III) | 22 | 110 |
| (IV) | 1 | — |
| (V) | 140 | 2 |
| (VI) | 270 | 18 |
| (VII) | 1500 | 110 |
| (VIII) | 1000 | 5700 |

* Вычисляли по уравнению (1), считая концентрацию трипсина равной ~ 10 мкг/мл.

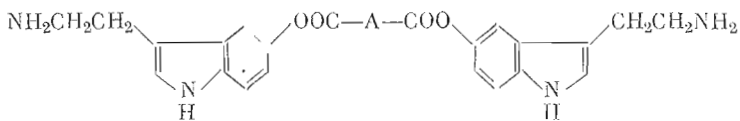
Таблица 2

Кинетические параметры гидролиза трипсином О-ацильных производных серотонина

| Субстрат | K_m , мМ | $k_{кат}$, мин ⁻¹ | $\frac{k_{кат}}{K_m}$, М ⁻¹ ·мин ⁻¹ | Относительная устойчивость * |
|------------|---------------|-------------------------------|--|------------------------------|
| (I) | 0,519 ± 0,053 | 1,03 ± 0,08 | 1 990 | 1,22 · 10 ⁴ |
| (II) | 1,030 ± 0,008 | 15,48 ± 0,11 | 14 160 | 1,71 · 10 ³ |
| (III) | 0,528 ± 0,023 | 8,02 ± 0,28 | 15 160 | 1,60 · 10 ³ |
| (V) | 0,101 ± 0,008 | 85,80 ± 5,30 | 848 000 | 2,85 · 10 ¹ |
| (VI) | 0,075 ± 0,006 | 6,80 ± 0,37 | 91 200 | 2,65 · 10 ² |
| (VII) | 0,321 ± 0,050 | 4,95 ± 0,60 | 15 400 | 1,57 · 10 ³ |
| (VIII) | 1,78 ± 0,18 | 0,52 ± 0,05 | 290 | 8,28 · 10 ⁵ |
| Bz-Arg-OEt | 0,061 ± 0,003 | 1 490 ± 8 | 2,42 · 10 ⁷ | 1,00 |

* Относительная устойчивость = $\frac{(k_{кат}/K_m)_{Bz-Arg-OEt}}{(k_{кат}/K_m)_{иссл. эфира}}$.

а также остатки дикарбоновых кислот:



где A = —CH₂CH₂—(VII), —C₆H₄—(VIII).

Вначале нами была исследована устойчивость О-ацильных производных серотонина в физиологических условиях (рН 7,4; 37°). Показано, что эфиры значительно различаются по своей стабильности (табл. 1). Наиболее лабильно производное γ -аминоасляной кислоты (IV) ($\tau_{1/2}$ 1 мин), ввиду чего ферментативный гидролиз этого соединения не изучался.

Нами установлено, что изучаемые эфиры гидролизуются трипсином и химотрипсином и кинетика их гидролиза подчиняется уравнению Михаэлиса — Менгеп. Сравнение кинетических параметров триптической гидролиза соединений (I) — (III), (V) — (VIII) и специфического субстрата трипсина, этилового эфира N-бензил-L-аргина (Bz-Arg-OEt), свидетельствует о том (табл. 2), что последний гидролизуется значительно эффективнее. Наиболее устойчив к действию трипсина эфир терефталевой кислоты, наименее устойчив — эфир ϵ -аминокапроновой кислоты.

Аналогичный анализ химотриптического гидролиза эфиров серотонина (табл. 3) показывает, что исследованные соединения, за исключени-

Кинетические параметры гидролиза α -химотрипсином O-ацильных производных серотонина

| Субстрат | K_m , мМ | $k_{кат}$, мин ⁻¹ | $k_{кат}/K_m$, М ⁻¹ мин ⁻¹ | Относительная устойчивость * |
|------------|------------|-------------------------------|---|------------------------------|
| (I) | 11,4±1,29 | 0,55±0,06 | 48 | 7,94·10 ⁴ |
| (II) | 6,27±1,03 | 12,6±2,0 | 2010 | 1,90·10 ³ |
| (III) | 2,50±0,36 | 0,3±0,04 | 120 | 3,18·10 ⁴ |
| (V) | 0,95±0,03 | 0,6±0,02 | 630 | 6,05·10 ³ |
| (VI) | 2,11±0,17 | 1,28±0,09 | 610 | 6,25·10 ³ |
| (VII) | 1,38±0,21 | 0,55±0,04 | 400 | 19,53·10 ³ |
| (VIII) | 0,82±0,09 | 0,22±0,02 | 270 | 1,41·10 ⁴ |
| Ac-Tyr-OEt | 4,37±0,57 | 16 700±2 000 | 3,81·10 ⁶ | 1,00 |

* Относительная устойчивость = $\frac{(k_{кат}/K_m) \text{ Ac-Tyr-OEt}}{(k_{кат}/K_m) \text{ исслед. эфира}}$

ем эфира (VIII), гидролизуются химотрипсином на 1—3 порядка медленнее чем трипсином.

Поскольку химотриптическая активность сыворотки крови значительно ниже триптической и эффективность гидролиза исследованных соединений химотрипсином существенно ниже, чем трипсином, гидролиз эфиров серотонина под действием ферментов крови, обладающих химотриптической активностью, можно не принимать во внимание. Поэтому мы более подробно остановимся на полученных данных по триптическому гидролизу.

Известно [5], что триптическая активность крови (по расщеплению этилового эфира N-бензоил-L-аргинина) соответствует содержанию трипсина ~10 мкг/мл. Учитывая эти данные и основываясь на приведенных в табл. 2 кинетических константах триптического гидролиза, мы рассчитали периоды полураспада исследуемых соединений, вызываемого ферментами крови, обладающими триптической активностью (табл. 1). Для расчета было использовано интегрированное уравнение Михаэлиса:

$$\frac{2,303}{t} \lg \frac{[S]_0}{[S]_0 - y} = \frac{V}{K_m} - \frac{1}{K_m} \cdot \frac{y}{t}, \quad (1)$$

где $([S]_0 - y)$ — концентрация субстрата в момент времени t .

При оценке полученных данных с точки зрения возможности использования O-ацильных производных серотонина в качестве препаратов пролонгированного действия следует руководствоваться принципом, согласно которому соединения, претерпевающие быстрый спонтанный гидролиз либо быстро гидролизующиеся трипсином, вряд ли будут отвечать предъявляемым требованиям. В эту группу попадают соединения (II) — (VI). Соединения же (I), (VIII) и в меньшей степени (VII) относительно устойчивы как к спонтанному, так и к триптическому гидролизу и могут быть рекомендованы для использования в качестве препаратов типа «депо серотонина».

Соединения (VII) и (VIII) входят в число уже испытанных на противолучевое действие производных серотонина. При введении мышам в дозе 0,07 ммоль/кг веса за 1 ч до облучения [6] соединение (VIII) оказалось весьма эффективным; некоторым защитным эффектом обладало соединение (VII). В то же время сам серотонин оказывал защитное действие при введении только непосредственно перед облучением и был неэффективен при

предварительном введении уже за 20 мин до облучения. Наблюдаемое противолучевое действие соединений (VII) и (VIII) при введении их за 4 ч до облучения коррелирует с обнаруженной нами устойчивостью этих соединений к гидролизу под действием ферментов крови, обладающих триптической активностью.

Исследование ферментативного гидролиза *O*-ацильных производных серотонина представляет также определенный интерес с энзимологической точки зрения, в частности, для получения дополнительных данных о связи между структурой субстратов и их атакуемостью сериновыми протеиназами. Гидролиз эфиров, содержащих в качестве спиртовой части серотониновый остаток, до настоящего времени не исследован.

Нами была изучена зависимость от pH скорости ферментативного гидролиза соединений (I) — (III) и (V) — (VI). Результаты опытов показали, что для химотриптического гидролиза соединений (I), (III), (V), (VI) оптимум pH равен 7,8—8,3, а для триптического — 7,8—8,5, что согласуется с оптимумами pH гидролиза специфических синтетических субстратов. Для соединения (II), имеющего в ацильной части свободную α -аминогруппу, оптимум pH гидролиза химотрипсина находится, как и для других субстратов, при 7,8—8,5, но выражен более резко. В случае триптического гидролиза соединения (II) оптимум смещен в более кислую область и находится при pH 7,0. Это, по-видимому, обусловлено действием по крайней мере двух факторов: а) близостью аминогруппы к реакционному центру и б) участием в ферментативном гидролизе двух форм вещества — протонированной и непротонированной (можно считать, что pK_a аминогруппы кислотной части субстрата примерно равно pK_a этилового эфира глицина [7], т. е. 7,7 (25°)). Такого рода сдвиг оптимума pH для ферментативного гидролиза субстратов, имеющих незащищенную α -аминогруппу в ацильной части, наблюдался в ряде работ [8—12].

Результаты опытов по триптическому гидролизу исследованных соединений, содержащих аминогруппу на разном удалении от атакуемой связи (к их числу можно также отнести соединения (VII) и (VIII), у которых аминогруппа находится на расстоянии, примерно соответствующем цепочке из 10 и 12 CH_2 -групп), согласуются с известными данными по специфичности фермента, который наиболее эффективно атакует связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина [13]. В этих субстратах заряженная аминогруппа находится на расстоянии пяти метиленовых групп от карбоксильной группы. Действительно, среди исследованных *O*-ацильных производных серотонина наиболее эффективно гидролизовалось соединение (V), ацильной группой которого является ϵ -аминокапроновая кислота. Оно характеризуется примерно такой же величиной K_m , как и специфический субстрат трипсина — этиловый эфир *N*-бензил-*L*-аргинина, однако $k_{кат}$ примерно в 15 раз меньше — по-видимому, из-за недостаточно строгой ориентации субстрата в фермент-субстратном комплексе. При удлинении и укорочении углеводородной цепочки в ацильной части эффективность триптического гидролиза значительно снижается, причем при увеличении длины цепи на одну метиленовую группу уменьшается на порядок $k_{кат}$, а при уменьшении длины цепи ухудшаются обе кинетические константы. Следует подчеркнуть, что среди исследованных соединений наибольшей константой Михаэлиса и наименьшей каталитической константой характеризуется диафир терефталевой кислоты.

Относительная эффективность химотриптического гидролиза эфиров серотонина (табл. 2, 3) значительно ниже, чем в случае трипсина. Это вероятно, связано с тем, что структура ацильной части этих соединений не отвечает специфичности фермента и, кроме того, большое значение может иметь непродуктивное связывание, обусловленное тем, что именно уходящая, а не ацильная группа обладает структурой, специфичной для химотрипсина.

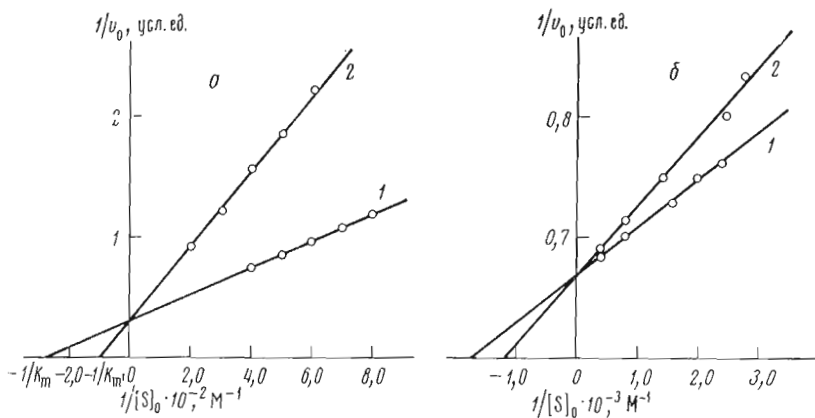


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование серотонином химотриптического гидролиза Ас-Тур-ОЕт (а) и триптического гидролиза Вз-Арг-ОЕт (б): 1 — без серотонина, 2 — в присутствии серотонина (а — $1 \cdot 10^{-2}$ М, б — $2,5 \cdot 10^{-3}$ М)

Рис. 2. Разностный спектр поглощения комплекса химотрипсина с акрифлавином относительно свободного красителя (1), в присутствии 5% DMSO (по объему) (2) и в присутствии $8 \cdot 10^{-3}$ М серотонина (3)

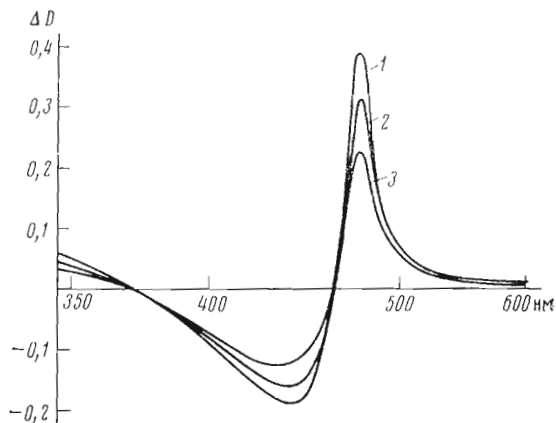


Рис. 2

Результаты по химотриптическому гидролизу ацетилсеротонина можно сопоставить с известными данными для *n*-нитрофенилацетата [14]. Ацильная часть у этих субстратов одинакова; значит, одинаковы и величины k_3 — константы скорости распада ацилфермента. Для *n*-нитрофенилацетата, как известно, лимитирующей стадией является дезацилирование, т. е. $k_{кат} \approx k_3$. Сопоставление величин k_3 и $k_{кат}$ для ацетилсеротонина показывает, что они близки ($0,574$ и $0,519$ мин $^{-1}$); следовательно, в случае химотриптического гидролиза ацетилсеротонина лимитирующей стадией также является дезацилирование ацилфермента.

Как было отмечено выше, существенную роль при ферментативном гидролизе О-ацилпроизводных серотонина может играть непродуктивное взаимодействие, обусловленное связыванием уходящей группы в сорбционном участке фермента. В связи с этим представляло интерес исследовать ингибирующее действие серотонина на изучаемые ферменты. Было изучено ингибирование серотонином химотриптического гидролиза Ас-Тур-ОЕт и триптического гидролиза Вз-Арг-ОЕт. Тип ингибирования определяли по методу двойных обратных величин (метод Лайнунвера — Берка) (рис. 1). Пересечение прямых на оси ординат свидетельствует о конкурентном типе ингибирования. Константу ингибирования (K_i) вычисляли из уравнения

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right), \quad (2)$$

где K_m и K_m' — константы Михаэлиса в отсутствие и в присутствии серотонина. Константа ингибирования оказалась равной $(5,80 \pm 1,39)$ мМ для химотрипсина и $(5,97 \pm 1,39)$ мМ для трипсина.

Связывание серотонина химотрипсином изучалось нами также спектрофотометрически [15, 16] с использованием красителя акрифлавина. Ранее было показано, что акрифлавин является конкурентным ингибитором химотрипсина [17].

На основании данных разностных спектров поглощения комплекса химотрипсина с акрифлавином относительно свободного красителя и спектров, полученных в присутствии 5% DMSO (рис. 2), были определены константа диссоциации комплекса химотрипсина — акрифлавин [$K_{\text{дис}} = 2,02 \cdot 10^{-4}$ М (37°)], его молярный коэффициент экстинкции в максимуме разностного спектра ($\Delta \epsilon_{476} 13\,700 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и кажущаяся константа диссоциации в 5% DMSO.

Кажущиеся константы диссоциации комплекса химотрипсин — акрифлавин при постоянной концентрации DMSO и различных концентрациях серотонина ($K_{\text{дис}(i)}$) получали из зависимости $1/\Delta D_{476}$ от $1/[E]_0$, согласно уравнению (3) [18, 19], справедливому при условии $[E]_0 \gg [C]_0$

$$\frac{1}{\Delta D_{476}} = \frac{1}{\Delta \epsilon_{476} l [C]_0} + \frac{K_{\text{дис}(i)}}{\Delta \epsilon_{476} l [C]_0} \cdot \frac{1}{[E]_0}, \quad (3)$$

где ΔD_{476} — разностная оптическая плотность, $l = 1$ см, E — фермент, C — краситель.

Величину константы диссоциации комплекса химотрипсин — акрифлавин в 5% DMSO (K_i) вычисляли из уравнения

$$K_{\text{дис}(i)} = K_{\text{дис}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right), \quad (4)$$

где I — серотонин.

Найденная величина $(9,0 \pm 1,8)$ мМ близка к значению K_i , определенному кинетическим методом.

Полученные для серотонина значения K_i свидетельствуют о том, что он является эффективным конкурентным ингибитором химотрипсина и трипсина.

Это подтверждает предположение о существенной роли непродуктивного связывания при ферментативном гидролизе O-ацильных производных серотонина.

Экспериментальная часть

α -Химотрипсин и трипсин — кристаллические препараты производства Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова.

Концентрации активных центров, определенные спектрофотометрическим титрованием N-трансцинамоилимидазолом для химотрипсина [20] и *n*-нитрофенил-*n'*-гуанидинбензоатом для трипсина [21], — (80 ± 3) и $(50 \pm 2)\%$ соответственно.

Хлоридрат ацетилсеротонина (I) синтезировали по методу [1] взаимодействием N-третилсеротонина с хлористым ацетилом в бензоле в присутствии триэтиламина. Тритильную защиту снимали кипячением в 50% уксусной кислоте. Т. пл. (I) — 213,5—214°.

5,5'-Сукциноил- (VII) и 5,5'-терефталойл- (VIII) диокситриптамины (диацетаты) получали по методике [4] взаимодействием N-третилсеротонина с хлорангиридами fumarовой и терефталевой кислот. 5,5'-Фумаройлдиокситриптамин подвергали каталитическому гидрированию. Тритильную защиту удаляли кипячением в 50% уксусной кислоте. Соединения (VII) и (VIII) выделяли в виде диацетатов. Т. пл. (VII) — 145—147°, (VIII) — 188—189°.

| Субстрат | [Трипсин]·10 ⁴ , мМ | [S], мМ | [Химотрипсин]· 10 ² , мМ | [S], мМ |
|------------|-----------------------------------|------------|--|------------|
| (I) | 5,0 | 0,286—1,00 | 6,40 | 1,43—5,00 |
| (II) | 5,0 | 0,358—2,50 | 1,60 | 1,00—2,50 |
| (III) | 4,94 | 0,250—2,50 | 6,40 | 1,00—1,89 |
| (V) | 0,434 | 0,516—2,86 | 1,60 | 0,358—1,00 |
| (VI) | 2,5 | 0,571—2,86 | 1,60 | 0,445—2,50 |
| (VII) | 10,0 | 1,67—5,00 | 3,20 | 0,333—1,00 |
| (VIII) | 10,0 | 1,67—3,33 | 3,20 | 0,111—0,33 |
| Bz-Arg-OEt | 0,02 | 0,43—2,50 | | |
| Ac-Tyr-OEt | | | 8,9·10 ⁻⁴ | 1,25—2,50 |

O-Аминоацильные производные серотонина (II) — (VI) получали в виде хлоргидратов по методикам [2, 3] путем конденсации N-трипсилсеротонина с соответствующими N-карбобензоксиаминокислотами (в абс. ацетонитриле) в присутствии дициклогексилкарбодимиде с последующим удалением трипильной и карбобензоксизащит. Т. пл. соединений: (II) — 228—229°, (III) — 215—216°, (IV) — 195—197°, (V) — 123—125°, (VI) — 98—99°.

Этиловый эфир N-ацетил-L-тирозина синтезирован по методике [22], т. пл. 79—80°. Этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина, хлоргидрат, — препарат фирмы Reanal (Венгрия), х. ч.

Акрифлавин — препарат фирмы Sigma (Англия).

Гидролиз O-ацильных производных серотонина проводили в фосфатном буфере (μ 0,2) при 37°. Запасные растворы субстратов готовили в DMSO, запасные растворы ферментов — в 0,001 М HCl. Реакционная смесь содержала 1,8 мл буфера, 0,1 мл раствора фермента, 0,04—0,1 мл раствора субстрата. Объемная доля DMSO для (I) — (III), (V), (VI) — 5%, для (VII) — 20% и для (VIII) — 30%. Опыты проводили при концентрации ферментов и субстратов, указанных в табл. 4. За ходом ферментативного гидролиза соединений (I) — (III) и (V) — (VII) следили спектрофотометрически при λ 309 нм по выделению серотонина (λ 309 нм — изобестическая точка серотонина, ϵ_{309} 3000 M⁻¹ см⁻¹). Для O-ацильных производных серотонина получены следующие значения $\Delta\epsilon_{309}$: (I) — 2780, (II) — 2630, (III) — 2720, (V) — 2720, (VI) — 2670, (VII) — 1750.

За гидролизом эфира терефталевой кислоты следили по уменьшению оптической плотности при λ 322 нм, $\Delta\epsilon_{322} = 1500$.

Регистрацию проводили против контрольной кюветы, в которую вместо раствора фермента вносили соответствующее количество бидистиллята. В ней проходил спонтанный гидролиз субстратов.

Начальные стационарные скорости ферментативного гидролиза Ac-Tyr-OEt и Bz-Arg-OEt измеряли потенциометрическим методом при постоянном pH на самопишущем pH-стате Radiometer TTT-1c (Дания). Условия: 37°, объемная доля DMSO — 5%; при гидролизе Ac-Tyr-OEt — pH 7,8, μ 0,01, концентрация химотрипсина $8,9 \cdot 10^{-9}$ М; при гидролизе Bz-Arg-OEt — pH 8,0, μ 0,2 (KCl), концентрация трипсина $2,0 \cdot 10^{-8}$ М. Характер ингибирования серотонином химотрипсина и трипсина определяли в аналогичных условиях (рис. 1).

Результаты кинетических измерений обрабатывали по методу Лайпуивера — Берка и обчитывали по методу наименьших квадратов на ЭВМ «Электроника».

Связывание серотонина методом разностной спектрофотометрии изучали в следующих условиях: 37°, pH 8,0 (0,02 М трис-HCl), μ 0,1, объемная доля DMSO — 5%. Концентрацию химотрипсина изменяли в пределах $(1,42—3,44) \cdot 10^{-4}$ М, концентрация красителя $[C]_0 = 5,4 \cdot 10^{-5}$ М, концентрация серотонина $[I]_0 = (1,8—5,39) \cdot 10^{-3}$ М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозовская Л. М., Ильина Г. Н., Камияка М. Э., Машковский М. Д., Суворов Н. Н. (1968) Хим. фармацевт. ж., 2, 11—16.
2. Ильина Г. Н., Попова Г. В., Панфилова В. Б., Морозовская Л. М., Тульчинский В. М., Турчин К. Ф., Неклюдов А. Д., Суворов Н. Н. (1974) Ж. общ. химии, 44, 924—929.
3. Неклюдов А. Д., Ильина Г. Н., Попова Г. В., Розынов Б. В., Богданова И. А., Суворов Н. Н. (1974) Ж. общ. химии, 44, 2076—2084.
4. Махаева Г. Ф., Ильина Г. Н., Генкина Н. К., Финякин Л. И., Морозовская Л. М., Неклюдов А. Д., Суворов Н. Н. (1975) Ж. орган. химии, 11, 1489—1498.
5. Пасхина Т. С., Яровая Г. А., Лауфер А. Л., Чуликова О. М., Трапезникова С. С., Морозова Н. А., Макарова О. В., Тихомиров И. Б., Сысоев В. Ф., Мач Э. С. (1970) Вопр. мед. химии, 16, 152—161.
6. Васин М. В., Ангилов В. В., Суворов Н. Н., Морозовская Л. М., Ильина Г. Н. (1975) Радиобиология, 14, 242—246.
7. Wright M. R. (1967) J. Chem. Soc. B, 1265—1267.
8. Del Castillo L. M., Davila G., Dorantes L., Oliver C., Ibarra R., Castaneda-Agullo M. (1969) Biochim. et biophys. acta, 191, 354—361.
9. Seydoux F. (1970) Eur. J. Biochem., 17, 209—217.
10. Del Castillo L. M., Nieto Z., Arce E., Inei-Shizukawa G., Gruz M. T., Castaneda-Agullo M. (1971) Biochim. et biophys. acta, 235, 358—369.
11. Stewart J. A., Anderson J. K., Tseng J. K., Hallada R. M. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 42, 1220—1227.
12. Johnson P. E., Stewart J. A. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 149, 295—306.
13. Keil V. (1971) in the Enzymes, III ed. (Boyer P. D., ed.), vol. 3, pp. 263—265.
14. Доровска В. Н., Варфоломеев С. Д., Мартинек К. (1973) Биохимия, 38, 381—392.
15. Klotz I. M., Burkhard R. K., Urgulhart J. M. (1952) J. Amer. Chem. Soc., 74, 202—208.
16. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 339—347.
17. Wallace R. A., Kurtz A. N., Niemann C. (1963) Biochemistry, 2, 824—836.
18. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 517—528.
19. Антонов В. К., Дьяков В. Л. (1975) Биоорган. химия, 1, 1324—1331.
20. Schonbaum G., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2939.
21. Chase T., Jr., Show E. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 29, 508—514.
22. Parks R. E., Plaut G. W. E. (1953) J. Biol. Chem., 203, 755—761.

Поступила в редакцию
2.III.1976

α -CHYMOTRYPSIN AND TRYPSIN CATALYSED HYDROLYSIS OF O-ACYL DERIVATIVES OF SEROTONIN

МАКНАЕВА Г. Ф., СУВОРОВ Н. Н., ГИНДМАН Л. М.,
АНТОНОВ В. К.

*D. I. Mendeleev Institute of Chemical Technology, Moscow;
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Eight serotonin O-acyl derivatives have been investigated in relation to their possible use as serotonin depot. Glycyl-, β -alanyl- and γ -aminobutyrylserotonin were not suitable for this purpose because of rapid spontaneous hydrolysis. The kinetic parameters of the tryptic and chymotryptic hydrolysis of serotonin esters were determined. The catalytic activity of trypsin towards the substrates examined was considerably higher than that of chymotrypsin, whereby the maximal rate of hydrolysis was observed with ϵ -aminocaproylserotonin. The possibility of effective hydrolysis of ϵ -aminocaproyl- and ω -aminocaproylserotonin by blood enzymes possessing trypsin-like activity was inferred from the results obtained. This property should be taken into account when proposing such compounds as drugs of prolonged action. Rather good resistance of acetic, succinic and terephthalic esters both to spontaneous and tryptic hydrolysis allows to regard them as potential «serotonin depot» preparations. The investigation of the inhibitory activity of serotonin allows to suggest significant role of nonproductive binding in the enzymatic hydrolysis of serotonin O-acyl derivatives.