



УДК 577.152.311.042

## ИНГИБИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ АЗИРИДИНИЕВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПОЛИМЕТИЛЕНБИСХЛОРЕТИЛАМИНОВ

*Волкова Р. И., Кочетова Л. М.*

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

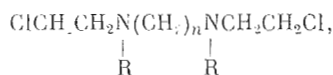
Проведена реакция циклизации полиметиленбисхлорэтиламина, полученные азиридиновые производные оказывают обратимое ( $K_i \sim 100-1 \text{ мкМ}$ ) и необратимое алкилирующее действие ( $k_{ii} \sim 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) на ацetylхолинэстеразу из эритроцитов крови человека и бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади. Бимолекулярные константы скорости алкилирования холинэстераз при изменении  $n$  и R изменяются симбатно с изменением констант обратимого ингибирования. Наиболее сильным алкилирующим агентом по отношению к ацetylхолинэстеразе ( $k_{ii} 7,8 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) и бутирилхолинэстеразе ( $k_{ii} 4,2 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) является азиридиновый аналог гексаметовия с бензильными радикалами при азоте. На основании анализа кинетики ингибирования холинэстераз и защитного действия тетраэтиламмония и галантамина обсуждается вопрос об алкилировании анионных участков в каталитическом и регуляторном центрах обеих холинэстераз.

Для исследования в каталитическом и регуляторном центрах холинэстераз функциональной роли и свойств анионных участков, образованных, по-видимому, карбоксильными группами остатков дикарбоновых аминокислот [1-3], представляет интерес использование соединений, относящихся к циклическим азиридиновым производным 2-галоидалкиламинам, алкилирующие в полипептидной цепи белка наряду с аминогруппами и гидроксильными группами карбоксильные и фосфатные группы [4-5].

При алкилировании с помощью N,N-диметил-2-фенилазиридиния ацetylхолинэстераз из разных источников [6-11] получен интересный результат модификации каталитических свойств фермента: при полной утрате способности гидролизовать ацetylхолин происходит активация гидролиза неспецифического незаряженного субстрата индофенилацетата. Для неспецифического холинэстераз этот результат не наблюдается, их алкилирование производными азиридиния приводит только к ингибированию ферментативного гидролиза субстратов [6, 11]. Чем обусловлено это различие в свойствах холинэстераз различных типов, остается неясным.

Соединения, содержащие азиридиновые группы, в настоящее время применяются в онкологии в качестве химиотерапевтических средств [12] и используются в сельском хозяйстве как хемотрепизирующие пестициды [13]. Поэтому дальнейшее исследование их ингибирующего действия на холинэстеразы крови человека и животных представляет также и практический интерес.

В настоящей работе исследовали действие на ацetylхолинэстеразу (КФ 3.1.1.7) из эритроцитов крови человека и бутирилхолинэстеразу (КФ 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади полиметиленбисхлорэтиламина структуры



где  $n=10$  и  $\text{R}=\text{CH}_3$  (А-7);  $n=6$  и  $\text{R}=\text{CH}_3$  (А-9) и  $n=6$  и  $\text{R}=\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  (А-10). Активной алкилирующей формулой этих соединений является

Влияние диализа и гель-фильтрации на каталитическую активность ацетилхолинэстеразы, ингибированной декаметонием и его азиридиновой аналогом А-7\*

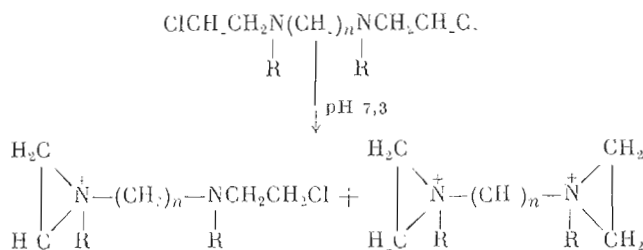
Ингибитор, 0,1 мМ	Обработка после реакции с ингибитором	Активность **, мкМ·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup>	Ингибирование ***, %
Декаметоний	—	48 (100)	52
	Диализ 24 ч, 1–3° С	97 (97)	0
А-7	—	45 (93)	51,3
	Диализ 24 ч, 1–3° С	45 (92)	51,2
	Гель-фильтрация, сефадекс G-25	43,6 (91)	52

\* Субстрат — ацетилхолин, 1 мМ; реакция ингибиторов с ферментом 1 ч 20 мин.

\*\* В скобках приведена активность нативного фермента, подвергнутого той же обработке.

\*\*\* Ингибирование определяется по отношению к активности нативного фермента, подвергнутого той же обработке.

циклическая азиридиновая форма:



Исследования показали, что максимальное количество (до 35%) активной азиридиновой формы этих соединений образуется при проведении реакции циклизации при 37° С и рН 7,3 в течение 40–45 мин.

Реакцию холинэстераз с азиридиновыми производными А-7, А-9 и А-10 проводили в среде 0,1 М КСl и 6,7 мМ калий-фосфатного буфера при рН 7,5 и 25° С. Каталитическую активность ферментов оценивали по скорости ферментативного гидролиза ацетилхолина и незаряженного неспецифического субстрата индофенилацетата. Было показано, что азиридиновые производные полиметиленисхлорэтиламинов являются высокоактивными обратимыми ингибиторами и в то же время вызывают нарастающее во времени необратимое ингибирование обоих ферментов. Диализ и гель-фильтрация не снижают степени ингибирования холинэстераз под действием алкилирующих соединений, тогда как активность холинэстераз, ингибированных бисчетвертичным соединением декаметонием, в этом случае полностью восстанавливается (табл. 1). Эти данные свидетельствуют, что необратимое ингибирование азиридиновыми производными полиметиленисхлорэтиламинов обусловлено алкилированием функциональных групп активной поверхности холинэстераз.

Алкилирование холинэстераз азиридиновыми производными полиметиленисхлорэтиламинов приводит к ингибированию их каталитической активности по отношению как к ацетилхолину, так и к индофенилацетату.

Согласно табл. 2, у ацетилхолинэстеразы, алкилированной соединением А-7, ингибирование скорости гидролиза ацетилхолина было несколько выше, чем индофенилацетата (примерно на 10%). В случае алкилирования холинэстераз соединениями А-9 и А-10 ингибирование каталитической активности по ацетилхолину и индофенилацетату было одинаковым.

Таким образом, при алкилировании холинэстераз азиридиновыми производными полиметиленисхлорэтиламинов не наблюдается модификации каталитической активности: алкилированные ацетилхолинэстеразы

Таблица 2

**Ингибирование каталитической активности холинэстераз при гидролизе ацетилхолина (А) и индофенилацетата (Б) соединением А-7 \***

Фермент	Ингибирование, %	
	А	Б
Ацетилхолинэстераза	97,2	87,7
Бутирилхолинэстераза	70,4	67,2

\* Концентрация ингибитора 1 мМ, время реакции с ингибитором 1 ч 20 мин, затем гель-фильтрация на сефадексе G-25. Ингибирование определяли по отношению к активности нативного фермента после гель-фильтрации.

Таблица 3

**Кинетические константы ингибирования холинэстераз азиридиновыми производными полиметиленбисхлорэтиламина:  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R})(\text{CH}_2)_n(\text{R})\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  \***

Соединение	n	R	Ацетилхолинэстераза			
			$K_i$ , мкМ	$\alpha'$	$K'_i$ , мкМ	$k_{II} \cdot 10^{-2}$ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
А-7 Декаметоний	10	$\text{CH}_3$	3,5±0,2	0,74	4,7±0,3	1,7±0,2
	10		3,4±0,2	0,4	8,8±0,4	—
А-9 Гексаметоний	6	$\text{CH}_3$	140±20	>0,1	—	0,33±0,1
	6		330±30	0,21	1600±200	—
А-10	6	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	14±1	0,23	62±4	7,8±0,2

Соединение	n	R	Бутирилхолинэстераза			
			$K_i$ , мкМ	$\alpha'$	$K'_i$ , мкМ	$k_{II} \cdot 10^{-2}$ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
А-7 Декаметоний	10	$\text{CH}_3$	15±1	>0,1	—	1,4±0,1
	10		16±2	0,22	100±20	—
А-9 Тексаметоний	6	$\text{CH}_3$	240±10	>0,1	—	0,34±0,1
	6		610±20	>0,1	—	—
А-10	6	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	1,7±0,1	0,36	4,6±0,2	4,2±0,3

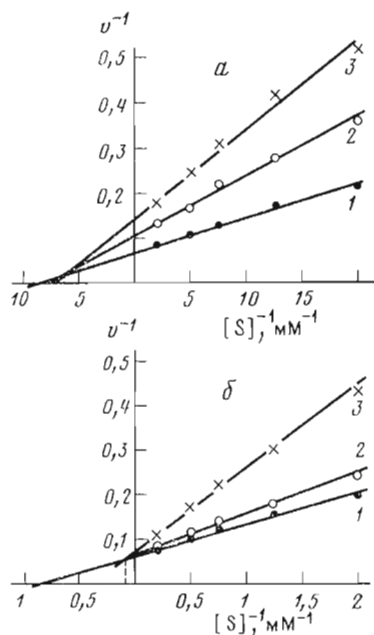
\* Субстрат — ацетилхолин; 6,7 мМ калий-фосфатный буфер, 0,1 М КСl; рН 7,5; 25° С.

и бутирилхолинэстераза утрачивают способность гидролизовать как специфический катионный субстрат ацетилхолин, так и неспецифический незаряженный субстрат индофенилацетат.

Обратимое ингибирование холинэстераз азиридиновыми соединениями оценивалось по их влиянию на скорость ферментативного гидролиза ацетилхолина с помощью ингибиторных констант:  $K_i$  — конкурентного и  $K'_i = K_i/\alpha'$  — неконкурентного обратимого ингибирования, где  $\alpha'$  — неконкурентный компонент в торможении. Идентификацию типа обратимого ингибирования и расчет констант производили по методу Лайнуивера и Бэрка [14, 15]. Необратимое ингибирование холинэстераз алкилирующими соединениями оценивали по бимолекулярной константе ( $k_{II}$ ) скорости их реакции с ферментом.

Полученные данные (табл. 3) показывают, что алкилирующие соединения, синтезированные на основе полиметиленбисчетвертичных соединений — декаметония и гексаметония, являющийся высокоактивными обратимыми ингибиторами преимущественно конкурентного типа по отношению к бутирилхолинэстеразе и смешанного конкурентно-неконкурентного типа по отношению к ацетилхолинэстеразе (рис. 1). Наиболее сильный обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы, азиридиновый аналог декаметония А-7, действует главным образом по неконкурентному типу. По отношению к бутирилхолинэстеразе как декаметоний, так и его азиридиновый аналог А-7 проявляют более низкое ингибирующее действие исключительно конкурентного типа. Гексаметоний и его азиридиновый

Рис. 1. *a* – зависимость скорости гидролиза ацetylхолина, катализируемого холинэстеразой, от концентрации субстрата в отсутствие (1) и в присутствии 2 (2) и 5 мкМ (3) азиридинового производного декаметония А-7 ( $K_1$  3,5 мкМ,  $\alpha'$  0,74). *б* – та же зависимость для реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, в отсутствие (1) и в присутствии 5 (2) и 25 мкМ (3) соединения А-7 ( $K_1$  15 мкМ,  $\alpha'$  0,06)



аналог А-9 значительно слабее декаметония и соединения А-7 по отношению к обоим типам холинэстераз, причем соединение А-9 является ингибитором конкурентного типа по отношению как к ацetylхолинэстеразе, так и к бутирилхолинэстеразе. Обратимая сорбция производного гексаметония А-10 значительно возрастает по сравнению с соединением А-9 вследствие замены метильных радикалов при азоте на объемные бензильные радикалы, и одновременно увеличивается неконкурентность в обратимом ингибировании ацetylхолинэстеразы и особенно бутирилхолинэстеразы. Соединение А-10 наиболее сильный обратимый ингибитор бутирилхолинэстеразы смешанного конкурентно-неконкурентного типа.

Величина  $K_1$  конкурентного обратимого ингибирования для катионных соединений отражает обратимую сорбцию ингибитора по анионным участкам каталитического центра холинэстераз или сорбцию вне каталитического центра, которая, конформационно его изменяя, может полностью предотвращать связывание на нем субстрата. По константам неконкурентного обратимого ингибирования  $K_1'$  можно судить о сорбции соединений по периферическим анионным участкам холинэстераз вне каталитического центра. Способность полиметиленисчетвертичных и азиридиновых соединений сорбироваться вне каталитического центра различна при их действии на ацetylхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу. Для ацetylхолинэстеразы первостепенное значение для проявления неконкурентности имеет расстояние между азотами: при увеличении числа метиленовых групп от 6 до 10 значительно увеличивается неконкурентный компонент в торможении. В случае бутирилхолинэстеразы для проявления неконкурентности, вероятно, более важно наличие объемных гидрофобных радикалов при азоте.

По обратимому антихолинэстеразному действию циклизованные производные полиметиленисхлорэтиламинов не уступают бисчетвертичным соединениям, декаметонию и гексаметонию, и даже немного превосходят их. Вероятно, получаемые в эксперименте параметры ингибирования отражают свойства бисазиридиновой формы полиметиленисхлорэтиламинов и указывают на преимущественное ее образование в процессе циклизации.

Необратимое ингибирование холинэстераз азиридиновыми производными полиметиленисхлорэтиламинов следовало уравнению для псевдомомолекулярных реакций:

$$k_{II} = \frac{2,3}{t[I]} \cdot \lg \frac{v_0}{v_i}$$

где  $v_0$  и  $v_t$  — скорости гидролиза ацетилхолина в начальный момент времени и ко времени  $t$  реакции фермента с алкилирующим ингибитором, I (рис. 2). В течение 2 ч реакции сохранялась линейная зависимость в координатах  $\lg(v_0/v_t) - t$ . По-видимому, алкилирование функциональных групп на активной поверхности холинэстераз происходит при участии только одной из азиридиниевых групп в структуре алкилирующих соединений.

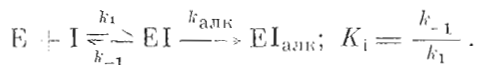
Бимолекулярные константы скорости необратимого ингибирования ( $k_{II}$ ) холинэстераз циклическими катионными производными полиметиленибисхлорэтилламинов были одного порядка с константой  $k_{II}$  скорости алкилирования ионами N,N-диметил-2-фенилазиридиния ( $\sim 0,1 \text{ мм}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) и значительно уступали величине  $k_{II}$  ингибирования холинэстераз катионными фосфорорганическими соединениями [16].

При необратимом ингибировании холинэстераз величины  $k_{II}$  при изменении  $n$  и R изменяются симбатно с изменением обратной сорбции на активной поверхности фермента: снижение  $K_1$  во всех случаях сопровождается увеличением  $k_{II}$  необратимого ингибирования. Но количественно изменения  $k_{II}$  при изменении  $n$  и R были менее выражены, чем изменения  $K_1$ .

При ингибировании бутирилхолинэстеразы этими соединениями увеличение  $n$  от 6 до 10 снижает  $K_1$  в 15,6 раза, а  $k_{II}$  в этом случае увеличивается только в 4,2 раза. При введении бензильных радикалов при азоте  $K_1$  снижается в 140 раз, а  $k_{II}$  увеличивается только в 12,3 раза.

При ингибировании ацетилхолинэстеразы изменение числа метиленовых групп от 6 до 10 также в большей степени сказывается на обратной сорбции соединений:  $K_1$  падает почти в 40 раз, а  $k_{II}$  скорости алкилирования фермента увеличивается в 5,4 раза. Только при замене в структуре полиметиленибисхлорэтилламинов метильных радикалов при азоте на гидрофобные бензильные радикалы (см. ниже) при ингибировании ацетилхолинэстеразы в большей степени увеличивается  $k_{II}$  скорости алкилирования, чем снижается  $K_1$ , характеризующая обратимую сорбцию соединений.

На основании симбатности изменения  $K_1$  и  $k_{II}$  при изменении структуры ингибирующих соединений можно полагать, что реакция алкилирования анионных участков производными полиметиленибисхлорэтилламинов включает в себя стадию образования обратимого фермент-ингибиторного комплекса EI, а величины  $K_1$  отражают константы диссоциации этого промежуточного обратимого EI-комплекса:



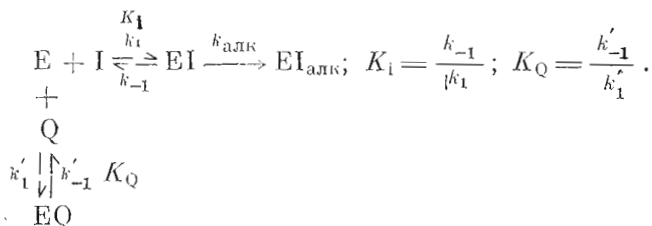
В этом случае по типу обратимого ингибирования можно судить о месте расположения алкилируемой группы на активной поверхности холинэстераз. Азиридиниевый аналог гексаметония А-9, проявляющий конкурентное обратимое ингибирование холинэстераз, вероятно, алкилирует функциональные группы в активном центре ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. Азиридиниевый аналог декаметония А-7, практически полностью неконкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы и преимущественно конкурентный ингибитор бутирилхолинэстеразы, возможно, алкилирует периферические анионные участки ацетилхолинэстеразы и функциональные участки каталитического центра бутирилхолинэстеразы. Самое сильное алкилирующее соединение А-10 является обратимым ингибитором смешанного конкурентно-неконкурентного типа. Поэтому необратимое ингибирование холинэстераз соединением А-10 может быть результатом алкилирования функциональных групп как в каталитическом центре, так и периферических анионных участков обеих холинэстераз.

Для получения дополнительной информации о том, какие функциональные ацетилхолинэстеразы подвергаются химической модификации при действии соединения А-10, исследовали влияние обратимых катионных ингибиторов тетраэтиламмония и галантамина (табл. 4, рис. 3а) на реак-

Обратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы тетраэтиламмонием и галантамином в реакциях катализируемого ею гидролиза ацетилхолина (А) и ее алкилирования соединением А-10 (Б)

Соединение	Реакция	$K_i$ , мкМ	$\alpha'$	$K'_i$ , мкМ	$K_Q$ , мкМ
Тetraэтиламмоний	А	$600 \pm 53$	$0,12 \pm 0,09$	$5000 \pm 420$	—
	Б	—	—	—	$2000 \pm 310$
Галантамин 0,1–2 мкМ	А	$0,41 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,12$	$1,1 \pm 0,20$	—
	Б	—	—	—	$1,2 \pm 0,20$
Галантамин, 2–10 мкМ	Б	—	—	—	$6,5 \pm 0,50$

цию алкилирования ацетилхолинэстеразы соединением А-10. Установлено, что величины  $k_{II}$  скорости алкилирования фермента соединением А-10 в присутствии этих катионных ингибиторов значительно снижаются, т. е. тетраэтиламмоний и галантамиин проявляют защитное действие согласно схеме



При конкурентной защите, когда защитный агент Q, сорбируясь по одному и тому же участку с алкилирующим соединением, препятствует образованию обратимого EI-комплекса, константа скорости алкилирования в присутствии Q ( $k_Q$ ) будет снижаться:

$$k_Q = \frac{1}{1 + [Q]/K_Q} \cdot \lg \frac{v_0}{v_i}$$

или

$$k_Q = \frac{k_{II}}{1 + [Q]/K_Q}.$$

В этом случае в координатах  $1/k_Q$  от  $[Q]$  будет наблюдаться линейная зависимость, из которой может быть определена  $K_Q$  — константа диссоциации обратимого EQ-комплекса фермента с защитным агентом.

Полученные нами данные показывают, что более слабый обратимый ингибитор холинэстераз — тетраэтиламмоний оказывает защитный эффект конкурентного типа в реакции ацетилхолинэстеразы с соединением А-10: зависимость  $1/k_Q$  от концентрации тетраэтиламмония была линейной с  $K_Q$  2 мМ, константой, которая ближе к константе неконкурентного по отношению к ацетилхолину обратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы тетраэтиламмонием. Следовательно, алкилирование ацетилхолинэстеразы соединением А-10 происходит преимущественно вне каталитического центра по периферическим анионным участкам.

Защитный эффект галантамина более сложен и зависит от его концентрации (рис. 3б): в области концентрации 0,1–20 мкМ наблюдается сильное защитное действие в реакции алкилирования ацетилхолинэстеразы соединением А-10 с  $K_Q$  1,2 мкМ, а в области более высоких концентраций (2–10 мкМ) защитное действие галантамина ослабевает и соответствует другой, более высокой величине:  $K_Q$  6,5 мкМ. Обе величины  $K_Q$  для галантамина, полученные в реакции алкилирования ацетилхолинэстеразы соединением А-10, значительно выше величины обратимого конкурентного ингибирования ферментативного гидролиза ацетилхолина ( $K_i$  0,41 мкМ), которая отражает сорбцию галантамина по анионному участку каталитического центра ацетилхолинэстеразы. Величина  $K_Q$ , полученная при низких

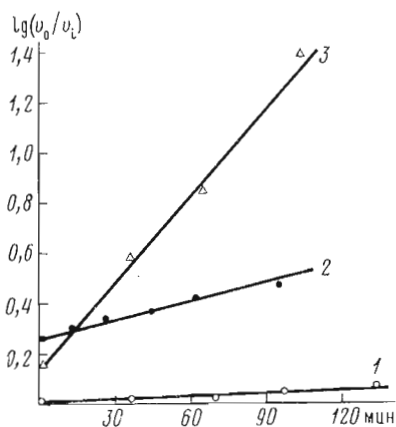


Рис. 2

Рис. 2. Зависимости  $\lg(v_0/v_i)$  от времени ингибирования ацетилхолинэстеразы азиридиновыми производными полиметиленбисхлорэтиламина: 1 — А-9 ( $k_{II}$  33  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ), 2 — А-7 ( $k_{II}$  170  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ), 3 — А-10 ( $k_{II}$  780  $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ); концентрация ингибиторов 35  $\mu\text{M}$

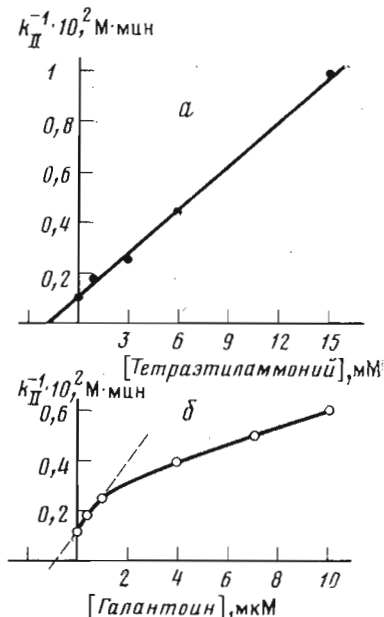


Рис. 3

Рис. 3. Защитное действие тетраэтиламмония (а) и галантамина (б) в реакции необратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы азиридиновым производным А-10 (35  $\mu\text{M}$ )

концентрациях галантамина, практически совпадает с  $K_i'$  — константой некооперативного обратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы галантамином, а  $K_Q$  для высоких концентраций галантамина значительно выше  $K_i$ . Таким образом, из кинетических данных о защитном действии галантамина следует, что, сорбируясь вне каталитического центра, соединение А-10, по-видимому, может алкилировать не менее двух периферических анионных участков.

В настоящее время на каждой субъединице ацетилхолинэстеразы помимо анионного участка каталитического центра (АС) постулируется наличие по крайней мере четырех периферических анионных участков  $AP_1$ — $AP_4$ , связанных со специфическими гидрофобными областями [2, 17—20]. Взаимодействие с этими участками неорганических ионов, органических лигандов [20], а также алкилирующих соединений может приводить к сложным изменениям конформации и свойств активной поверхности ацетилхолинэстеразы. Кинетические данные [6] и опыты с меченым N,N-диметил-2-фенилазиридином [18] показывают, что образование формы ацетилхолинэстеразы с модифицированными эстеразными свойствами происходит при алкилировании двух анионных участков: АС и одного из периферических анионных участков. Какой из участков  $AP_1$ — $AP_4$  в этом случае алкилируется, пока неизвестно. Наиболее близко к каталитическому центру ацетилхолинэстеразы, на расстоянии от АС в 14 нм, расположен участок  $AP_1$ . Показано, что декаметоний связывается одновременно с АС и  $AP_1$  [19, 20]. В литературе практически нет сведений о периферических анионных участках бутирилхолинэстеразы. Согласно полученным нами данным, периферические анионные участки бутирилхолинэстеразы, вероятно, расположены на другом расстоянии от каталитического центра и имеют более мощное гидрофобное окружение, чем периферические анионные участки ацетилхолинэстеразы.

Для образования холинэстераз с модифицированными свойствами, по-видимому, важна также и структура остатка, присоединяющегося к

Изменение каталитических свойств холинэстераз при их алкилировании полиметиленбисхлорэтилaminaми А-7 – А-10 и 2-хлорэтилaminaми R'CHClCH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)R (I) – (IV)

Соединение	Фермент *	Тип ингибирования (или активация, %) при гидролизе		Литературный источник
		ацетилхолина	индофенил-ацетата	
(I): R = -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , R' = -CH <sub>3</sub>	АХЭ быка	Необратимое	160	[7-9]
	АХЭ человека	»	180-200	[11]
	БХЭ	»	Необратимое	[11]
(II): R = -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , R' = -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	АХЭ быка	»	160	[10]
(III): R = -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br, -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH, -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> ; R' = -CH <sub>3</sub>	АХЭ быка	Обратимое	Обратимое	[7]
(IV): R = -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> (n), R' = -CH <sub>3</sub>	АХЭ человека	Необратимое	Необратимое	[11]
	БХЭ	»	»	[11]
А-9	АХЭ человека	»	»	
	БХЭ	»	»	
А-10	АХЭ человека	»	»	
	БХЭ	»	—	
А-7	АХЭ человека	»	»	
	БХЭ	»	»	

\* АХЭ — ацетилхолинэстераза эритроцитов, БХЭ — бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади.

анионным участкам при алкилировании. В связи с этим было интересно проследить, как зависят свойства алкилированных холинэстераз от структуры алкилирующего реагента (табл. 5). Из данных табл. 5 следует, что активация ферментативного гидролиза индофенилацетатом наблюдается для различных ацетилхолинэстераз только при их обработке циклическими производными незамещенных 2-хлор-2-фенилэтилaminaми. Наличие неполярного фенильного радикала в алкилирующем соединении, вероятно, очень важно для образования фермента с модифицированными каталитическими свойствами. Изменение свойств фенильного радикала за счет введения полярных заместителей приводит к утрате способности соединения продуцировать фермент с модифицированными эстеразными свойствами (например, при введении в *n*-положении NO<sub>2</sub>-группы) или даже к утрате способности алкилировать анионные участки ацетилхолинэстеразы (при введении HO-, Br- или CH<sub>3</sub>O-заместителей). В случае полиметиленбисхлорэтилaminaми, если алкилирование анионных участков происходит при участии только одной алкилирующей группы, наличие в присоединяющейся к ферменту части реагента полярной хлорэтилaminaминой или азиридиновой группы также может быть неблагоприятным для таких конформационных перестроек холинэстераз, которые приводят к образованию формы фермента с модифицированной каталитической активностью.

### Экспериментальная часть

В качестве ферментов использовали частично очищенные препараты ацетилхолинэстеразы из эритроцитов крови человека с уд. акт. 4,2 МЕ/мг и бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади с уд. акт. 9,6 МЕ/мг отечественного производства. Полиметиленбисхлорэтилaminaми А-7, А-9 и А-10 были синтезированы Д. В. Иоффе и Т. С. Смирновой в Ленинградском институте токсикологии Министерства здравоохранения СССР [21].

Для получения максимального количества этилениммониевой формы соединений А-7, А-9 и А-10 готовили их растворы в концентрации 0,8 мМ на 10% этаноле в 67 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,3. Реакцию цикли-



зации проводили при 37°С в течение 1,5–2 ч. Через каждые 10 мин из инкубационной смеси отбирали пробы по 5 мл, реакцию циклизации останавливали добавлением 1 мл 0,2 н. уксусной кислоты и концентрацию этиленаммониевых ионов определяли обратным иодометрическим титрованием по их связыванию с тиосульфатом натрия. Для этого в каждую пробу добавляли по 1 мл 0,1 М тиосульфата натрия, пробы выдерживали 20 мин в темноте и избыток тиосульфата натрия оттитровывали 0,1 н. раствором иода. Для всех соединений концентрация этиленаммониевой формы возрастала в течение 40–45 мин и достигала к этому времени 35%. В дальнейшем для получения азиридиновых производных реакцию циклизации проводили 45 мин и в каждой порции концентрацию азиридиновых ионов определяли иодометрическим титрованием. Раствор циклизованной формы реагента хранили на холоду не более 1 сут.

Реакцию алкилирования холинэстераз проводили при 25°С в среде 6,7 мМ калий-фосфатного буфера при рН 7,5. Раствор фермента с ингибитором инкубировали 1,5–2 ч и в течение этого времени отбирали из смеси пробы для определения активности холинэстераз по скорости гидролиза ацетилхолина методом непрерывного потенциометрического титрования со стеклянным электродом на приборе рН-121 в среде 0,1 М КСl и 6,7 мМ калий-фосфатного буфера при концентрации ацетилхолина 1 мМ (ацетилхолинэстераза) и 10 мМ (бутирилхолинэстераза). Скорости гидролиза хромогенного субстрата пидофенилацетата определяли спектрофотометрически при  $\lambda$  590 нм в тех же условиях. При исследовании обратимого ингибирования холинэстераз измеряли скорости гидролиза в диапазоне концентраций ацетилхолина 0,05–1 мМ (ацетилхолинэстераза) и 0,5–10 мМ (бутирилхолинэстераза) в отсутствие ингибитора и при 3–4 различных его концентрациях. Константы обратимого ингибирования  $K_i$ ,  $K'_i$  и  $\alpha'$  рассчитывали графическим методом Лайнуивера и Бэрка [14, 15].

При проведении экспериментов с защитой ацетилхолинэстеразы от алкилирующего действия фермент инкубировали с соединением А-10 в присутствии тетраэтиламмония и галантамина, затем из смеси отбирали пробы и после разведения их в 50–100 раз определяли в них остаточную активность фермента по скорости гидролиза ацетилхолина. Данные графических зависимостей обрабатывали по методу наименьших квадратов. Расчетные величины кинетических параметров подвергали статистической обработке по методу Мюллера [22].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anticholinesterase agents. International Encyclopedia Pharmac. Therap./Ed. Karczmar A. G. Oxford – N. Y.: Pergamon Press, 1970, v. 1, p. 1–46.
2. Rosenberry T. L. Adv. Enzymol., 1975, v. 43, p. 103–218.
3. Trevor A. L., Gordon M. A., Parker K. K., Sin-Lam-Chan. Life Sci., 1978, v. 23, p. 1209–1220.
4. Means G. E., Feeney R. E. Chemical modification on proteins. Holden day, Inc., 1971.
5. Вульфшус Е. А. В сб.: Природа холинорецептора и структура его активного центра. Пуцино: Изд-во АН СССР, 1975, с. 22–44.
6. Волкова Р. И., Кочегорова Л. М. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1539–1551.
7. Belleau V., Tani H. Mol. Pharmacol., 1966, v. 2, № 2, p. 1539–1551.
8. Purdie J. E. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 185, № 1, p. 122–133.
9. Purdie J. E., McIvor R. A. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 128, № 4, p. 590–594.
10. O'Brien R. D. Biochem. J., 1969, v. 113, № 4, p. 713–719.
11. Волкова Р. И., Кочегорова Л. М. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 699–706.
12. Волков И. Биохимия клеточного цикла. Проблемы канцерогенеза и химиотерапии. М.: Мир, 1979, с. 78–87.
13. Шамшури А. А., Гриммер М. Э. Физико-химические свойства пестицидов. М.: Химия, 1976, с. 24, 28, 52, 224.
14. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966, с. 156–184.
15. Волкова Р. И., Дмитриева Е. П. Биохимия, 1976, т. 41, № 3, с. 443–451.
16. Бресткин А. И., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1968, № 9, с. 2028–2032.
17. Волкова Р. И. Биохимия, 1968, т. 33, № 2, с. 604–611.
18. Belleau V., DiTullio V. Can. J. Biochem., 1971, v. 49, № 10, p. 1131–1133.
19. Wee V. T., Sinka B. K., Taylor R. W., Chignell C. F. Mol. Pharmacol., 1976, v. 12, № 4, p. 667–677.

20. Tomlinson G., Mutus B., McLennan I. Can. J. Biochem., 1980, v. 59, № 10, p. 728-735.  
21. Иоффе Д. В., Кузнецов С. Р. Ж. общ. химии, 1964, т. 34, № 5, с. 1336-1341.  
22. Müller K. H. Z. Landwirtsch. Versuchs Untersuchungswesen, 1960, B. 6; S. 195-198.

Поступила в редакцию  
26.IV.1982  
После доработки  
18.I.1983

## INHIBITION OF CHOLINESTERASES BY AZIRIDIUM DERIVATIVES OF POLYMETHYLENE BISCHLOROETHYLAMINES

VOLKOVA R. I., KOCHETOVA L. M.

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

Cyclization of polymethylene bischloroethylamines, differing in the methylene chain-length ( $n=6$  or  $10$ ) and the N-substituents ( $R=CH_3$  or  $CH_2C_6H_5$ ), was carried out and the respective aziridinium derivatives were obtained. These derivatives of hexamethonium and decamethonium manifested reversible inhibition ( $K_i \sim 100-1 \mu M$ ) and irreversible alkylating activity ( $k_{II} \sim 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ ) towards acetylcholinesterase from human erythrocytes and horse serum butyrylcholinesterase. Upon varying  $n$  and  $R$ , the alkylation bimolecular rate constants changed symbately with changes in the reversible inhibition constants. The most potent alkylating agent with respect to acetylcholinesterase ( $k_{II} 7,8 \cdot 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ ) and butyrylcholinesterase ( $k_{II} 4,2 \cdot 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ ) was found to be the aziridinium analog of hexamethonium with  $R=CH_2C_6H_5$ . Based on the kinetic data, the problem of alkylation of anionic sites in the catalytic and allosteric centers of the two cholinesterases is discussed.