

УДК 577.153

ЭФИРЫ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ КАК СУБСТРАТЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

*Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А.,
Садыков А. А.*

Обобщены данные по кинетике гидролиза различных эфиров карбоновых кислот под действием двух основных типов холинэстераз: ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади. Показано, что скорость ферментативного гидролиза существенно зависит от структуры ацильной части молекулы эфира, природы сложноэфирного гетероатома, строения спиртовой части и особенно структуры оиевой группировки. Эфиры на основе природных соединений представляют особый интерес как специфические субстраты этих ферментов. Показана роль продуктивной и непродуктивной сорбции субстратов в ферментативном катализе.

Библиография — 81 ссылка.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1624
II. Различные аналоги ацетилхолина	1628
III. Эфиры с циклической аммониевой группировкой в спиртовой части молекулы	
IV. Эфиры алифатических и ароматических спиртов	1636
V. Заключение	1644

I. ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы (ХЭ) — ферменты, гидролизующие холиновые эфиры карбоновых кислот с большей скоростью, чем нехолиновые эфиры. Характерным для этих ферментов является угнетение их каталитической активности низкими концентрациями тетраалкиламмониевых солей, некоторыми фосфорорганическими соединениями и эфирами замещенных карбаминовых кислот. Чувствительность к эзерину при концентрациях 10^{-5} М и ниже считается одним из наиболее надежных критериев принадлежности фермента к холинэстеразам.

Наиболее изучены два основных вида холинэстераз: ацетилхолинэстераза (АХЭ) — ацетилхолин — ацилгидролаза (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстераза (БуХЭ) — разность ацилхолинацилгидролаз (КФ 3.1.1.8), которые различаются по своей субстратной специфичности и по чувствительности к различным ингибиторам. С наибольшей скоростью АХЭ гидролизует ацетилхолин (АХ), несколько медленнее пропионилхолин (ПрХ) и ацетил-β-метилхолин (МеХ), но практически не влияет на скорость гидролиза бутирилхолина (БуХ) и бензоилхолина (БзХ). Тогда же бутилхолинэстераза с наибольшей скоростью гидролизует БуХ, несколько медленнее ПрХ, АХ и БзХ, но не влияет на скорость гидролиза МеХ. Кроме того, в отличие от БуХЭ каталитическая активность АХЭ угнетается высокими концентрациями субстратов.

В передаче нервного возбуждения и нерва на иннервируемую клетку непосредственное участие принимает АХЭ нервной ткани. Биологическая роль БуХЭ, а также АХЭ, содержащейся в эритроцитах многих животных, не выяснена.

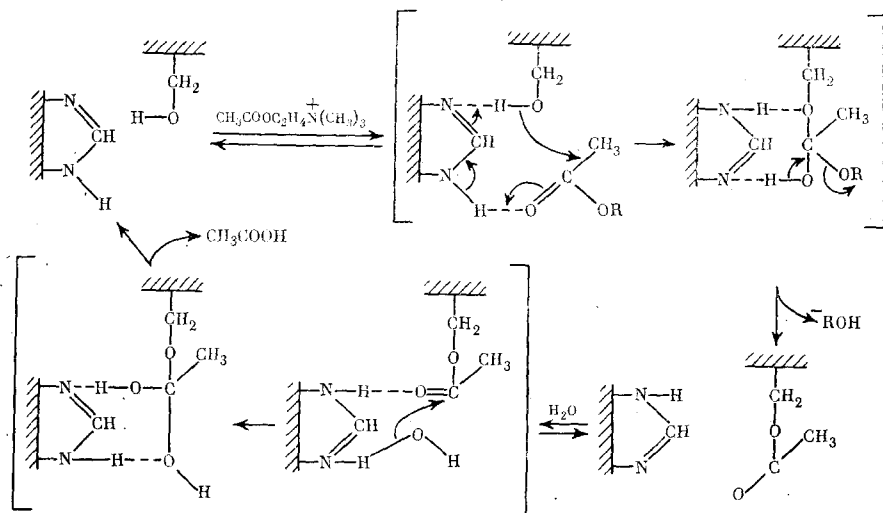
Холинэстеразы являются мишенью ингибирующего действия некоторых лекарственных препаратов, фосфорорганических и карбаматных инсектоакарицидов и фосфорорганических отравляющих веществ.

Имеется обширная литература по холинэстеразам, всесторонние обобщения в монографиях [1—5] и в ряде обзоров [6—8].

Чрезвычайно высокая каталитическая активность холинэстераз обусловлена уникальным строением их активной поверхности. На этой поверхности помимо эстеразного пункта, где осуществляется разрыв сложноэфирной связи, на расстоянии 4—5 Å от него, имеется анионный пункт, обеспечивающий специфическую сорбцию аммониевой группировки АХ и способствующий благоприятной ориентации молекулы субстрата [2—4]. Кроме кулоновского взаимодействия аммониевой группировки с анионным пунктом фермента на ориентацию субстратов и ингибиторов большое влияние оказывает гидрофобное взаимодействие их углеводородных радикалов с гидрофобными участками, расположенными как в районе анионного, так и в районе эстеразного пункта [8].

Предполагают, что анионный пункт представляет собой карбоксилат-анион двухосновной глутаминовой или аспарагиновой кислот, включенных в полипептидную цепь фермента. Эстеразный пункт активной поверхности фермента устроен более сложно. Основную роль в нем играет гидроксил серина, который ацилируется при взаимодействии с субстратами и фосфорилируется при взаимодействии с фосфорорганическими ингибиторами. Согласно современным представлениям [9, 10], активация этого химически инертного гидроксила осуществляется с помощью расположенного в непосредственной близости от него имидазола гистидина. При взаимодействии с субстратом процесс активации начинается с образования водородной связи между его карбонильным кислородом и иминным азотом имидазола, что приводит к повышению основности азольного азота и завязыванию водородной связи этого азота с гидроксилом серина [9] (схема 1). При этом резко

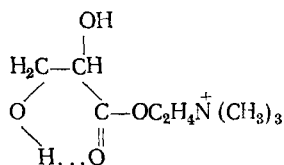
Схема 1



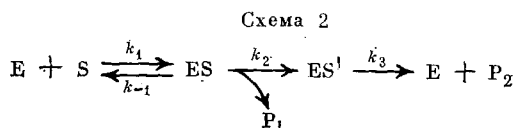
возрастает нуклеофильность гидроксильного кислорода и облегчается его взаимодействие с центральным атомом углерода. Перераспределение электронной плотности по 8-членному кольцу образовавшегося фермент-субстратного комплекса приводит к установлению ковалентной связи между кислородом серина и кислотной группой субстрата и к отщеплению спиртовой группы. Последующая реакция ацилированного фермента с водой протекает аналогичным путем с образованием промежуточного ацилфермент-гидратного комплекса, который затем распадается на исходный фермент и кислоту. Таким образом, реактивная форма гидроксила серина образуется в момент ориентированной сорбции молекулы субстрата, а не предшествует ей.

Приведенная схема холинэстеразного гидролиза подтверждается рядом фактов [4]. Холинэстеразы не катализируют гидролиз холиновых эфиров, содержащих карбонильную серу ($C=S$) вместо карбо-

нильного кислорода ($C=O$), так как атом серы не способен создавать прочную водородную связь, что затрудняет активацию гидроксила серина. По этой же причине фосфорорганические соединения, содержащие тионовую серу ($P=S$), не фосфорилируют холинэстеразы в отличие от их кислородных аналогов. Глицероилхолин, циклическая структура кислотной группы которого была доказана с помощью ИК-спектроскопии [11], не гидролизует под действием АХЭ, поскольку карбонильный кислород уже связан водородной связью с гидроксильной группой самого эфира



Обычно гидролиз субстратов (S) под действием фермента (E) описывается схемой 2 [4, 12]:



где ES — сорбционный комплекс Михаэлиса, ES' — ацилированный фермент, P₁ и P₂ — спирт и кислота соответственно, а k₁, k₋₁, k₂ и k₃ — константы скорости отдельных ступеней реакции. Очевидно, кроме комплексов ES и ES' образуются и другие промежуточные комплексы, например фигурирующие в схеме 1, но эти дополнительные комплексы, вообще говоря, не обесценивают тех кинетических выводов, которые вытекают из приведенной трехстадийной схемы [12].

Когда в реакционной смеси концентрация субстрата [S] во много раз больше исходной концентрации фермента [E]₀, предполагают, что ферментативный гидролиз протекает в стационарном режиме, при котором концентрации комплексов [ES] и [ES'] устанавливаются практически постоянными. При этом условии схема приводит к общеизвестному уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{a_c [E]_0 [S]}{K_m + [S]} = \frac{V [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

где v — скорость гидролиза субстрата ферментом, V — максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом, т. е. при [S] ≫ K_m, когда уравнение (1) принимает вид:

$$v = V = a_c [E]_0 \quad (1a)$$

a_c — активность каталитического центра фермента, связанная с константами скорости отдельных ступеней реакции формулой:

$$a_c = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (16)$$

K_m — константа Михаэлиса, выражаемая формулой

$$K_m = \frac{[E] [S]}{[ES] + [E']S} = \frac{(k_{-1} + k_2) k_3}{k_1 (k_2 + k_3)} \quad (1b)$$

При [S] = K_m уравнение (1) принимает вид

$$v = \frac{V}{2} \quad (1r)$$

а из (1b) вытекает:

$$\frac{K_m}{[S]} = \frac{[E]}{[ES] + [E']S} = 1 \quad (1d)$$

где [E] — концентрация свободного фермента.

Отсюда следует, что K_m численно равна концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции в два раза меньше максимальной (1г) и когда половина фермента связана в фермент-субстратных комплексах (1д).

Свойство холинэстераз необратимо ингибироваться фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) за счет фосфорилирования активных центров используется для определения $[E]_0$, в исследуемом растворе фермента [13]; $[E]_0$ находят по минимальному количеству высокоактивного ФОИ, вызывающего полное ингибирование каталитической активности; $[E]_0$ позволяет легко вычислить активность каталитического центра фермента a_c из формулы (1а): $a_c = V/[E]_0$.

Знание a_c и V для одного субстрата ($a_{c,1}$ и V_1), например для АХ, дает возможность найти a_c для другого субстрата ($a_{c,2}$) по величине максимальной скорости его ферментативного гидролиза V_2 , под действием одинакового количества препарата данного фермента, т. е. при $[E]_{0,1} = [E]_{0,2}$:

$$a_{c,1}/a_{c,2} = V_1/V_2$$

Как следует из (1а), a_c характеризует каталитическую активность при полном насыщении фермента субстратом, т. е. она не учитывает первую сорбционную стадию, которая существенно влияет на способность фермента гидролизовать субстрат при низких концентрациях. Эту стадию в первом приближении оценивают по величине отношения

$$a_c/K_m : a_c/K_m = k_1 k_2 / (k_{-1} + k_2)$$

поскольку член

$$k_2 / (k_{-1} + k_2) < 1, \text{ то } a_c/K_m < k_1$$

Отношение a_c/K_m является важным кинетическим параметром, характеризующим каталитическую активность фермента по отношению к данному субстрату при $[S] < K_m$, так как при этом условии уравнение (1) принимает вид:

$$v = \frac{a_c [E_0] [S]}{K_m} \quad (1e)$$

Таким образом, при высоких концентрациях субстрата скорость ферментативного гидролиза определяется величиной a_c , а при низких концентрациях величиной a_c/K_m .

Для реакции гидролиза холиновых эфиров карбоновых кислот под действием АХЭ уравнение (1) справедливо только при низких концентрациях этих эфиров, так как при высоких концентрациях имеет место подавление каталитической активности фермента. Это, так называемое субстратное торможение, учитывается в уравнении Холдена [14]

$$v = \frac{V [S]}{K_m + [S] + K_{ss} [S]^2} = \frac{V [S]}{K_m + [S] + (K_m/[S]_{\text{опт}}^2) [S]^2} \quad (2)$$

где K_{ss} — константа субстратного торможения.

Величину K_{ss} вычисляют по формуле:

$$K_{ss} = K_m/[S]_{\text{опт}}^2 \quad (2a)$$

где $[S]_{\text{опт}}$ — концентрация субстрата, при которой скорость реакции максимальна, т. е. концентрация субстрата, отвечающая максимуму на кривой зависимости v от $[S]$ [14].

По мнению Холдена [14], субстратное торможение связано с тем, что при высоких $[S]$ кроме комплексов ES образуется второй, также сорбционный, но неактивный фермент-субстратный комплекс ES_2 . При высоких концентрациях электролитов в реакционной смеси субстратное торможение АХЭ исчезает [15], что трудно согласовать с гипотезой Холдена. Вероятно, субстратное торможение связано с взаимодействием субстрата с аллостерическим центром [15].

В настоящее время нет надежного метода определения констант скорости отдельных ступеней холинэстеразного гидролиза. При изучении кинетики этой реакции ограничиваются определением K_m и V . Одним из наиболее распространенных методов нахождения этих кинетических параметров является метод Лайнуивера — Бэрка [16].

II. РАЗЛИЧНЫЕ АНАЛОГИ АЦЕТИЛХОЛИНА

Изучение кинетических параметров гидролиза различных эфиров карбоновых кислот под действием холинэстераз необходимо для установления специфичности их каталитического действия, а также для выяснения механизма холинэстеразного гидролиза и строения активной поверхности этих ферментов.

Ниже обсуждается холинэстеразный гидролиз аналогов АХ, отличающихся от него или строением ацильной группы ($R-C(O)OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$), или природой сложноэфирной связи ($R-C(O)XCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$), или строением группы между эфирным кислородом и ониевым атомом азота ($R-C(O)O-A-N^+(CH_3)_3$), или строением ониевой группировки ($(CH_3C(O)-OCH_2CH_2NR^1R^2R^3)$).

1. Субстраты общей формулы $RC(O)-OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$

Как известно [2—4], ферментативный гидролиз холиновых эфиров существенно зависит от строения ацильного остатка (табл. 1). Из холиновых эфиров насыщенных карбоновых кислот нормального строения от муравьиной (I) до энантовой (VII) под действием АХЭ гидролизуются лишь три первых эфира, среди которых с максимальной скоростью гидролизуется АХ, а под действием БУХЭ все семь эфиров, среди которых с максимальной скоростью гидролизуется БУХ (IV).

В отличие от БУХ изобутирилхолина (VIII), у которого протяженность углеводородного радикала в ацильной части такая же, как у ПрХ (III), легко гидролизуется АХЭ, но хуже, чем ПрХ. Характерно, что БУХЭ гидролизует изобутирилхолин (VIII) хуже, чем ПрХ и БУХ, т. е. разветвление углеводородного радикала ухудшает способность холиновых эфиров гидролизываться под действием этого фермента. Это подтверждается и данными по ферментативному гидролизу холиновых эфиров метилэтилуксусной (IX) и диэтилуксусной (X) кислот, которые практически не гидролизуются БУХЭ, тогда как холиновые эфиры изомерных кислот нормального ряда — валериановой (V) и капроновой (VI) гидролизуются этим ферментом с большой скоростью.

Наличие двойной связи в ацильной части снижает способность холиновых эфиров к холинэстеразному гидролизу. Так, акрилонидхолин (XI) под действием БУХЭ гидролизуется почти в два раза, а под дейст-

ТАБЛИЦА 1

Холинэстеразный гидролиз холиновых эфиров карбоновых кислот
 $R-C(O)OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ (скорость гидролиза АХ принята за 100) [4]

Соединения	R	БУХЭ	АХЭ	Соединения	R	БУХЭ	АХЭ
(I)	H	180	66	(XI)	CH ₂ =CH	100	12
(II)	CH ₃ (АХ)	100	100	(XII)	CH ₃ CH=CH	20	2
(III)	C ₂ H ₅	180	70	(XIII)	CH ₂ =CH-CH ₂	186	11
(IV)	C ₃ H ₇	240	2	(XIV)	C ₂ H ₅ CH=CH	10	0
(V)	C ₄ H ₉	180	1	(XV)	CH ₂ =CHCH ₂ CH ₂	220	0
(VI)	C ₅ H ₁₁	110	—	(XVI)	CH ₂ =C(CH ₃)	47	20
(VII)	C ₆ H ₁₃	120	—	(XVII)	CH ₃ CH=C(CH ₃)	11	0
(VIII)	(CH ₃) ₂ CH	108	40	(XVIII)	(CH ₃) ₂ C=CH	0	0
(IX)	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH	13	1	(XIX)	CH ₃ CH=C(C ₂ H ₅)	9	0
(X)	(C ₂ H ₅) ₂ CH	16	0				

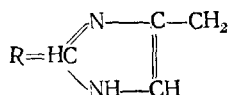
нием АХЭ в пять раз медленнее его насыщенного аналога (III). На примере холиновых эфиров кротоновой кислоты показано, что влияние двойной связи сильно зависит от ее положения. Наличие двойной связи в α -положении (XII) резко понижает способность этого эфира гидролизироваться под действием БуХЭ, тогда как связь в β -положении (XIII) снижает скорость гидролиза эфира под действием этого фермента всего в 1,3 раза по сравнению с БуХ. Аналогичные данные были получены в опытах с холиновыми эфирами ненасыщенных аналогов валериановой кислоты (XIV), (XV) [4].

Необычные результаты получены с холиновыми эфирами аминокислот, у которых $R=NH_2(CH_2)_n$ [17]. Под действием БуХЭ скорости гидролиза эфиров при $n=3-4$ были в 15—20 раз ниже скорости гидролиза АХ, а при $n=6$ и 7 эти эфиры гидролизировались с такой же скоростью, как АХ. Прекращение NH_2 в $N^+(CH_3)_3$ во всех случаях приводило к резкому снижению ферментативного гидролиза [17].

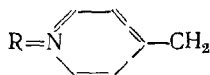
Показано [18], что карбамилхолин ($R=NH_2$) совсем не гидролизуетсся под действием БуХЭ.

Интересные данные получены [19, 20] по холинэстеразному гидролизу фтор-, хлор-, бром- и иодзамещенных производных АХ. Все эти производные под действием БуХЭ гидролизировались быстрее АХ (более чем в 2,5 раза), причем с наибольшей скоростью гидролизировалось бромпроизводное. При этом для всех производных наблюдалось несвойственное для БуХЭ торможение каталитической активности высокими концентрациями субстратов. Под действием АХЭ фторпроизводное гидролизировалось так же, как АХ, а остальные в два раза медленнее, несмотря на то что у всех производных прочность сложноэфирной связи значительно ниже, чем у АХ. Очевидно наблюдаемый эффект замещения водорода на галоген связан с увеличением размера кислотной группировки. Это предположение подтверждается тем, что дихлорзамещенное производное АХ гидролизуетсся АХЭ в пять раз медленнее, чем АХ, а трихлорпроизводное совсем не гидролизуетсся. Удивительно, что БуХЭ, для которой стерический фактор в данном случае не должен был бы играть существенной роли, не гидролизует эти два эфира.

Введение в ацильную часть молекулы АХ имидазольной [21]

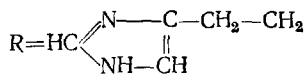


и пиридиниевой [22]



группировок снижало скорость гидролиза под действием БуХЭ, а под действием АХЭ эти производные вообще не гидролизировались.

Характерно, что имидазолилпропионилхолин:



гидролизировался под действием БуХЭ в силу БуХ, т. е. в 2,5 раза быстрее, чем АХ [21].

Фенилпропионилхолин ($R=C_6H_5CH_2CH_2$) при высоких концентрациях гидролизуетсся под действием БуХЭ почти в два раза быстрее АХ, и БзХ, а при низких концентрациях более чем в 40 раз быстрее за счет меньшей величины K_m ; под действием АХЭ он не гидролизуетсся [23]. Как и в случае с производными имидазола, увеличение расстояния между карбонильным углеродом и фенильным радикалом приводит к значительному возрастанию скорости ферментативного гидролиза.

В опытах с лактоилхолином была исследована стереоспецифичность холинэстераз. Под действием АХЭ $L(+)$ -изомер гидролизировался в 1,5 раза быстрее АХ, а $D(-)$ -изомер — в пять раз медленнее, ско-

рость гидролиза рацемата составляла 70% от скорости гидролиза АХ [11]; БуХЭ не проявляла стереоспецифичности: оба изомера гидролизовались этим ферментом в 3,5 раза быстрее АХ [24].

Таким образом, рассмотренные в этом разделе данные показывают, что АХЭ по сравнению с БуХЭ является более чувствительным ферментом к изменению структуры кислотной части молекулы холиновых эфиров.

2. Субстраты общей формулы $R-C(O)-X-C_2H_4N^+(CH_3)_3$

Известны аналоги АХ, у которых эфирный кислород заменен на S, Se и NH. Из них наибольший интерес представляют тиохолиновые эфиры, исследование которых началось еще в 1939 г. [18]. Ацетилтиохолин (АТХ) и бутирилтиохолин (БуТХ) уже давно применяются при гистологических исследованиях для выявления и локализации холинэстераз в различных тканях. Эти эфиры, а также пропионилтиохолин (ПрТХ) и ацетил-β-метилтиохолин (АМТХ) широко используются и в биохимии при изучении каталитической активности холинэстераз; образующийся при их гидролизе тиохолин легко определяется калориметрически с помощью хромогенного реактива Элмана [25]. Этот метод определения холинэстеразной активности более чувствителен, чем потенциометрический.

В ряде обзоров и монографий [2, 3, 5, 6] приведены данные, согласно которым скорость гидролиза тиохолиновых эфиров под действием холинэстераз в несколько раз выше, чем их холиновых аналогов. Убедительно показано [26, 27], что имеющиеся в литературе данные значительно завышены, так как исследователи, применяя метод потенциометрического титрования, не учитывали кислотные свойства тиохолина, образующегося при гидролизе этих субстратов.

В табл. 2 представлены данные сравнительного кинетического исследования ферментативного гидролиза холиновых и тиохолиновых эфиров под действием АХЭ и БуХЭ [27].

Для холинэстеразного гидролиза тиохолиновых эфиров справедливы все те закономерности, которые были установлены для их кислородных аналогов. Так, под действием АХЭ с наибольшей скоростью гидролизуетсАТХ, медленнее ПрТХ и практически не гидролизуетсБуТХ. В случае БуХЭ скорость гидролиза снижается в ряду БуТХ > >ПрТХ > АТХ. Торможение ферментативной активности высокими концентрациями тиохолиновых эфиров проявляется только в опытах с АХЭ. Для тиохолиновых и холиновых эфиров наблюдается сходство и в других субстратных свойствах — величинах S-оптимума и рН-оптимума. Характерно, что при высоких концентрациях субстратов АХЭ с большей скоростью гидролизует АХ (по a_c), а при низких концентрациях — АТХ (по a_c/K_m). Бутирилхолинэстераза гидролизует АТХ быстрее АХ и при высоких и при низких концентрациях.

В отличие от кислородного аналога АМТХ сравнительно хорошо гидролизуетсБуХЭ и поэтому не может использоваться как специфический субстрат АХЭ [26, 28].

ТАБЛИЦА 2

Кинетические параметры гидролиза холиновых и тиохолиновых эфиров под действием БуХЭ и АХЭ [27]

Субстраты	БуХЭ			АХЭ		
	a_c , мин ⁻¹	K_m , М	a_c/K_m , мин ⁻¹ М ⁻¹	a_c , мин ⁻¹	K_m , М	a_c/K_m , мин ⁻¹ М ⁻¹
АХ	$7,6 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^{-4}$	$8,4 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^9$
ПрХ	$1,2 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^8$
БуХ	$2,1 \cdot 10^5$	$7,7 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^8$	0	—	—
АТХ	$9,5 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^9$
ПрТХ	$1,2 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$6,0 \cdot 10^8$
БуТХ	$1,6 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^8$	0	—	—

Выявленные различия в способности АХЭ и БуХЭ гидролизовать холиновые и тиохолиновые эфиры обусловлены разными причинами: разная степень ангидридности сложноэфирной связи, различная конфигурация холиновых и тиохолиновых эфиров, разный радиус гетероатомов.

Селеновый аналог АХ гидролизровался АХЭ с меньшей скоростью, чем АТХ [29]. Существовало мнение, что амидный аналог АХ ($X=NH$) не способен гидролизываться под действием холинэстераз [4]. Однако по последним данным [30] этот субстрат гидролизуется под действием АХЭ. При изучении скорости гидролиза этого амида необходимо учитывать, что образующийся триметиламиноэтиламмоний $(CH_3)_3NCH_2-CH_2NH_2$ обладает выраженными основными свойствами и для его определения не пригоден традиционный метод потенциометрического титрования.

3. Субстраты общей формулы $R-C(O)-O-A-N^+(CH_3)_3$

На способность холиновых эфиров гидролизываться под действием холинэстераз большое влияние оказывает строение группировки А между эфирным кислородом и ониевым атомом азота. Синтезировано несколько производных АХ, у которых атомы водорода в этиленовой цепочке замещены различными углеводородными радикалами ($A=CH_2-CH_2-R^1-R^2$). Наибольший интерес представляет β-метильное производное АХ, которое относительно хорошо гидролизуется АХЭ: примерно в три раза медленнее АХ [31], и практически не гидролизывается БуХЭ: по крайней мере в 20 раз медленнее АХ [32]. В связи с этим ацетил-β-метилхолин до недавнего времени считался единственным специфическим субстратом АХЭ. Замещение водорода в β-положении более сложными углеводородными радикалами от C_2H_5 до C_6H_{13} лишь немного ускоряет скорость гидролиза эфиров под действием БуХЭ [18]. К сожалению, гидролиз этих производных АХ под действием АХЭ не исследовался.

Специфичность АХЭ к ацильному остатку эфиров β-метилхолина такая же, как и для эфиров холина: пропионат гидролизывается медленнее ацетата, изобутират — еще медленнее, а триметилацетат вообще не гидролизывается [33].

В опытах с оптическими изомерами ацетил-β-метилхолина установлено, что *L*-изомер гидролизывается АХЭ в два раза медленнее АХ, а *D*-изомер оказался не субстратом, а обратимым ингибитором. Как отмечено выше, рацемат гидролизывается этим ферментом примерно в три раза медленнее АХ.

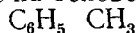
В опытах с бутирил-β-метилхолином было показано, что стереоспецифичность свойственна и БуХЭ: *L*-изомер гидролизывается этим ферментом в 10 раз медленнее АХ, а *D*-изомер совсем не гидролизывается. Характерно, что стереоспецифичность обоих ферментов не проявляется в реакциях гидролиза ацетил-α-метилхолина: оба изомера под действием БуХЭ гидролизуются в 1,5 раза быстрее АХ [34], а под действием АХЭ с такой же скоростью, как и АХ [33].

Таким образом, стереоспецифичность холинэстераз проявляется не во всех реакциях гидролиза оптически активных субстратов: она существенно зависит от положения асимметрического атома углерода в молекуле субстрата. Стереоспецифичность зависит и от природы фермента. Как указывалось выше, АХЭ различает *D*- и *L*-изомеры лактоилхолина, а БуХЭ не различает их.

Замена в этиленовой группировке двух атомов водорода на метильные радикалы в α- и β-положениях снижает скорость гидролиза этого эфира под действием АХЭ [35]. Поскольку в молекуле ацетил-α,β-диметилхолина имеется два асимметрических атома углерода, то этот эфир должен существовать в виде четырех изомеров, образующих две пары изомеров: *эритро*-изомеры и *трео*-изомеры, которые попарно являются оптическими антиподами. Оказалось, что АХЭ гидролизует только ра-

цemat *трео*- α (R), β -(S)-диметил-AX, а скорость гидролиза *эритро*- α (R), β (S)-диметил-AX равна нулю [35].

Синтезированные на основе эфедрина и псевдоэфедрина эфиры общей



формулы $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}-\text{CH}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, которые являются α -метильными, β -фенильными производными AX, не гидролизуются холинэстеразами и являются обратимыми ингибиторами [36].

При замене в молекуле AX этиленовой группировки на «жесткую» циклопропильную ($\text{A} = -\text{CH}-\text{CH}-$) получены оптически активные



транс- и *цис*-изомеры [37]. Под действием AXЭ скорость гидролиза (+)-*транс*-изомера составляла 96% от скорости гидролиза AX, а (—)-*транс*-изомера — 59%. С меньшей скоростью гидролизовала их БУХЭ: 61 и 33% соответственно. *цис*-Изомеры не гидролизировались этими ферментами.

Изложенные в этом разделе данные приводят к выводу, что БУХЭ по сравнению с AXЭ более чувствительна к изменению структуры этиленовой группировки в молекуле AX.

Этот вывод подтверждают и данные опытов с аналогами AX, у которых этиленовая группировка заменена более длинной алкильной цепью: $\text{A} = -(\text{CH}_2)_n-$. Под действием AXЭ гомогената мозга крысы эфир с триметиленовой цепочкой гидролизуетсa со скоростью, составляющей 70% от скорости гидролиза AX, а эфир с тетраметиленовой цепочкой — 10%. Под действием же БУХЭ скорость их гидролиза составляет 7,2 и 0,6% соответственно [18, 38, 39]. Аналогичные данные по снижению каталитической активности холинэстераз при увеличении n получены в опытах с аммониевыми и сульфониевыми соединениями [40, 41]. Высокая чувствительность БУХЭ к удлинению алкильной цепочки показана и в опытах с аналогичными производными БУХ. Эфир с триметиленовой цепочкой гидролизуетсa этим ферментом в пять раз, а с тетраметиленовой цепочкой — в 70 раз медленнее БУХ [42].

4. Субстраты общей формулы $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+ \begin{array}{l} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \\ \text{R}^3 \end{array}$

Способность различных аналогов AX гидролизоваться под действием холинэстераз зависит и от строения аммониевой группировки. Так, замена в AX трех метильных радикалов при ониевом азоте на этильные привела к резкому снижению скорости их гидролиза под действием БУХЭ и практически не влияла на скорость гидролиза под действием AXЭ [43].

Как следует из данных табл. 3 [44], среди исследованных соединений только дибутилметильное производное (XXIX) оказалось не субстратом, а ингибитором холинэстераз. Очевидно, при таком значительном утяжелении аммониевой группировки производные AX должны терять способность к холинэстеразному гидролизу. Другие производные AX, кроме (XXI), при высоких концентрациях в реакционной смеси гидролизировались холинэстеразами, но с более низкой скоростью, чем AX: об этом свидетельствуют приведенные в табл. 3 значения a_c . В согласии с литературными данными [43] изменение состава аммониевой группировки вызывает более резкое изменение a_c в опытах с БУХЭ. По-видимому, для AXЭ наиболее важно наличие заряда, а изменение структуры аммониевой группировки имеет меньшее значение, чем для БУХЭ.

При замене метильных радикалов в молекуле AX на этильные (XXVII) величина a_c для БУХЭ уменьшается в три раза, а для AXЭ — только на 1/3. Аналогичные соотношения имеют место и для других производных, кроме пентильного (XXIV), у которого величина a_c в опытах с AXЭ снизилась по сравнению с a_c для AX в два раза, а в опытах с БУХЭ — лишь на 1/4. Интересно, что изопропильное производное

(XXV), как субстрат БУХЭ и АХЭ, имеет большое сходство со своим неразветвленным аналогом (XXII).

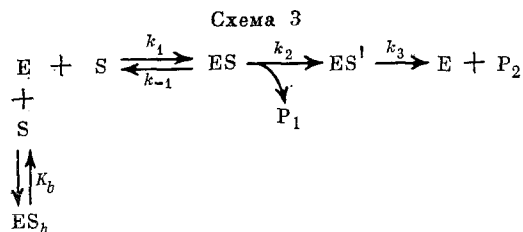
Величины K_m для многих соединений, за исключением (XXI), (XXIV), (XXV), (XXVII), в опытах с АХЭ и (XXVIII) в опытах с БУХЭ оказались более низкими, чем для АХЭ.

Наблюдаемые различия в величинах a_c для холинэстераз при ферментативном гидролизе аналогов АХ с измененным составом аммониевой группировки находятся в противоречии со схемой 2 и вытекающим из нее уравнением (1). Поскольку все эти соединения являются эфирами уксусной кислоты, то константа скорости деацетилирования (k_3) комплекса ES' для них должна быть одинаковой. Практически одинаковой должна быть и константа скорости ацетилирования (k_2), так как согласно квантовохимическим расчетам все соединения характеризуются равной электронной плотностью на карбонильном углероде, а следовательно, не должны различаться и по прочности сложноэфирной связи. Таким образом, в соответствии с этим при справедливости схемы 2 для всех приведенных соединений должны быть одинаковыми и величины a_c как в опытах с АХЭ, так и в опытах с БУХЭ. На самом деле эти величины варьируют в широких пределах.

Возникшее противоречие легко объясняется исходя из представления о продуктивном и непродуктивном связывании [45—47]. В соответствии с этим представлением ферментативный гидролиз может происходить только при правильной ориентации молекулы субстрата на активной поверхности фермента, т. е. при продуктивном связывании, при котором карбонильный углерод субстрата занимает строго определенное положение относительно гидроксила серина, осуществляющего нуклеофильную атаку на этот углерод.

Очевидно, далеко не у всех аналогов АХ вероятность правильной ориентации достаточно велика. Если при сорбции субстрата его карбонильный углерод не оказывается в непосредственной близости от гидроксила серина, то гидролиз произойти не может. Такая сорбция с неправильной ориентацией характеризуется как непродуктивное связывание.

С учетом непродуктивного связывания схема холинэстеразного гидролиза принимает вид:



где K_b — равновесная константа диссоциации неактивного комплекса ES_b . Схема 3 приводит к видоизмененному уравнению Михаэлиса — Ментен:

$$v = \frac{a_c [E]_0 [S]}{K_m + [S]} = \frac{(k_2 + k_3)/(k_2 \cdot k_3) \cdot K_b/(K_b + K_m^*) [E]_0 [S]}{(K_m^* K_b/(K_b + K_m^*) + [S])} = \frac{a_c p [E]_0 [S]}{K_m^* p + [S]} \dots \quad (5)$$

где K_m и a_c — константы Михаэлиса и активность каталитического центра, величины которых определяются экспериментально; K_m^* и a_c — истинные величины этих параметров, выражаемые формулами (1в) и (1б), а p — коэффициент, определяющий долю продуктивного связывания субстрата в процессе ферментативного гидролиза:

$$p = \frac{[ES] + [ES']}{[ES] + [ES'] + [ES_b]} = \frac{K_b}{K_b + K_b^*} \quad (6)$$

Если $K_b > K_m^*$, то $[ES_b] \rightarrow 0$ и $p = 1$, а следовательно, $a_c = a_c$ и $K_m = K_m$. В этом случае непродуктивное связывание отсутствует и каждая сорби-

ТАБЛИЦА 3

Кинетические параметры гидролиза аналогов АХ общей формулы $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_4\text{X}$ под действием БухЭ и АХЭ [44]

Соединения	X	БухЭ						АХЭ					
		$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c/K_M, \text{мин}^{-1}, \text{M}^{-1}$	p	K_M^*, M	K_b, M	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c/K_M, \text{мин}^{-1}, \text{M}^{-1}$	p	K_M^*, M	K_b, M
(XX)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{AX})$	$6,0 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^8$	1	$5 \cdot 10^{-4}$	—	$3,0 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-4}$	$15 \cdot 10^8$	1	$2,0 \cdot 10^{-4}$	—
(XXI)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$	$6,0 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^8$	1	$3,3 \cdot 10^{-4}$	—	$3,1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-4}$	$15 \cdot 10^8$	1	$2 \cdot 10^{-4}$	—
(XXII)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_3\text{H}_7$	$1,9 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$0,5 \cdot 10^8$	0,12	$12 \cdot 10^{-4}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$12 \cdot 10^8$	0,73	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$
(XXIII)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_4\text{H}_9$	$2,2 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^8$	0,37	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^8$	0,54	$6,9 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
(XXIV)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_5\text{H}_{11}$	$4,8 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^8$	0,8	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$14 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$11 \cdot 10^8$	0,54	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$
(XXV)	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$1,9 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$0,5 \cdot 10^8$	0,32	$13 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$16 \cdot 10^8$	0,85	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$10 \cdot 10^{-4}$
(XXVI)	$\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_3$	$4,5 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^8$	0,75	$5,9 \cdot 10^{-4}$	$18 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$15 \cdot 10^8$	0,87	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$13 \cdot 10^{-4}$
(XXVII)	$\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	$2,1 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$0,7 \cdot 10^8$	0,35	$8,3 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^8$	0,64	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$7,2 \cdot 10^{-4}$
(XXVIII)	$\text{N}^+(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{CH}_3$	$0,3 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^{-4}$	$0,02 \cdot 10^8$	0,05	$240 \cdot 10^{-4}$	$13 \cdot 10^{-4}$	$0,32 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^{-4}$	$0,4 \cdot 10^8$	0,11	$82 \cdot 10^{-4}$	$10 \cdot 10^{-4}$
(XXIX)	$\text{N}^+(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{CH}_3$	0	$1 \cdot 10^{-3} \text{ а}$	—	0	—	—	—	$1 \cdot 10^{-4} \text{ а}$	—	0	—	—

Примечание. Здесь K_M^* — истинное значение константы Михаэлиса; K_b — равновесная константа диссоциации неактивированного комплекса; p — коэффициент, определяющий долю продуктивного связывания субстрата в процессе ферментативного гидролиза.

а Приведена константа обратного ингибирования — K_i .

рующаяся на активном центре молекула субстрата гидролизуется. Если $K_b < K_m$, то, наоборот, происходит главным образом непродуктивное связывание: $p = K_b/K_m^* \rightarrow 0$, $a_c = a_c \cdot p \rightarrow 0$, и в этом случае эфир будет не субстратом, а обратимым ингибитором. Вероятно, при равных концентрациях фермента $[E]_0$ различия в экспериментально найденных для аналогов АН величинах a_c , равных a_c , p (см. уравнение (5)), связаны главным образом с разными значениями коэффициента p ; истинная же величина каталитической активности a_c для них по указанным выше причинам должна быть одинаковой. В этом случае отношение значений a_c для двух субстратов будет равно отношению величин p :

$$a_{c,1}/a_{c,2} = a_{c,1}^* \cdot p_1/a_{c,2}^* \cdot p_2 = p_1/p_2 \quad (7)$$

Величину p для каждого аналога АХ с измененным составом аммониевой группировки можно оценить, допустив, что при ферментативном гидролизе АХ $p=1$ и тем самым пренебрегая непродуктивным связыванием АХ и на АХЭ и на БУХЭ.

$$p = a_c/a_c(\text{АХ}) \quad (8)$$

Найденные величины p для исследованных ацетатов позволяют вычислить для них значения K_b и истинные значения констант Михаэлиса K_m^* .

$$K_m^* = K/p \quad (9)$$

$$K_b = K_m^* \cdot p/(1-p) \quad (10)$$

Для кинетики ферментативных реакций принципиальное значение имеет отношение a_c/K . Во-первых, оно не зависит от непродуктивной сорбции, и с учетом уравнений (8), (9) и (10):

$$a_c/K_m = a_c^* \cdot p/K_m^* p = a_c^*/K_m^* = \frac{k_2 k_3 k_1 (k_2 + k_3)}{(k_2 + k_3) (k_{-1} + k_2) k_3} = k_1 \frac{k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (11)$$

Во-вторых, величина этого отношения позволяет оценить константу скорости образования комплекса Михаэлиса, поскольку член $k_2/(k_{-1} + k_2) < 1$, то из формулы (11) следует: $k_1 > a_c/K$.

В-третьих, отношение a_c/K_m характеризует скорость реакции при $[S] \ll K_m$, когда уравнение (1) принимает вид:

$$v = \frac{a_c}{K_m} \cdot [E]_0 \cdot [S]$$

Как показывают проведенные расчеты, большее снижение a_c при бутирилхолинэстеразном гидролизе исследованных аналогов АХ по сравнению с ацетилхолинэстеразным гидролизом связано с более существенным изменением величины p . Если исключить (XXII), то в опытах с АХЭ для всех других аналогов АХ величина a_c снижается менее, чем в два раза, тогда как в опытах с БУХЭ — в три раза. При учете непродуктивного связывания заметно возросли истинные константы Михаэлиса K_m^* . Их величины в большинстве случаев обратно пропорциональны величинам отношения a_c/K_m , которые, как указывалось выше, в первом приближении характеризуют константу скорости продуктивного связывания субстрата ферментом (k_1). Действительно, субстраты с наибольшими K_m^* характеризуются наименьшими величинами a_c/K : (XXII), (XXV) в опытах с БУХЭ, и (XXIII), (XXVII) в опытах с АХЭ. Наблюдаемая корреляция между K_m^* и a_c/K_m свидетельствует о том, что изменение истинных констант Михаэлиса K_m^* для исследованных аналогов АХ связано главным образом с изменением k_1 , тогда как величины констант скорости других ступеней ферментативного гидролиза k_2 и k_3 , а возможно и k_{-1} , постоянны [45—47].

Соединение (XXVIII), которое логично рассматривать как ингибитор, не является исключением. Оно характеризуется самым высоким значением K_m^* и самым низким значением a_c/K_m в связи с чрезвычайно малой долей продуктивной сорбции.

Исходя из представлений о продуктивном и непродуктивном связывании, вычисленные значения K_b должны быть наименьшими для субстратов с наименьшей величиной p . Такая зависимость прослеживается на примере многих аналогов АХ в опытах с БУХЭ: (XXIV), (XXVI) имеют наибольшие величины p и наибольшие величины K_b , а (XXII), (XXIII) и (XXVII) наименьшие p и K_b . В опытах с АХЭ эта зависимость проявляется менее четко. Наблюдаемый разброс расчетных данных связан, во-первых, с принятым допущением $p=1$ для АХ и, во-вторых, с неизбежными ошибками при нахождении экспериментальных величин V и K_m особенно для АХЭ, каталитическая активность которой подавляется высокими концентрациями субстратов. Возникает вопрос, чем обусловлено изменение доли продуктивного связывания у исследованных аналогов АХ. При холинэстеразном гидролизе холиновых эфиров их сорбция в первую очередь обеспечивается ион-ионным взаимодействием аммониевой группировки субстрата с анионным пунктом ХЭ. Кроме того, здесь существенную роль играет гидрофобное взаимодействие углеводородных радикалов «катионной головки» субстрата с гидрофобной областью, обрамляющей анионный центр.

Комплементарность молекулы субстрата по отношению к активной поверхности фермента, которая в конечном счете и обуславливает продуктивную сорбцию, в общем виде зависит от согласованности ион-ионного, ион-дипольного и гидрофобных взаимодействий. При согласованности этих взаимодействий молекула субстрата занимает на активном центре такое положение, при котором создаются необходимые условия для образования реакционно способного комплекса Михаэлиса (см. схему 1). Именно при таком продуктивном связывании субстрата обеспечивается активация гидроксила серина, осуществляющего нуклеофильную атаку на карбонильный углерод.

При несогласованности указанных взаимодействий молекулы субстрата с активной поверхностью фермента не создаются условия для образования комплекса Михаэлиса. Вместо него образуется реакционно инертный фермент-субстратный комплекс ES_b .

В свете этого представления усиление гидрофобного взаимодействия за счет введения в молекулу субстрата более сложных углеводородных радикалов не всегда должно приводить к возрастанию доли продуктивного связывания субстрата ферментом. Например, в опытах с БУХЭ величина a_s при замене в молекуле АХ одного метильного радикала на пропильный (XXIV) понижается более чем в два раза, при замене на бутильный (XXV) — в 2,7 раза, а на пентильный (XXVI) — всего в 1,3 раза.

Как показал теоретический конформационный анализ, столь необычное изменение величины a_s при постепенном замещении одного метильного радикала при оиевом атоме азота на более сложные радикалы, связано с происходящим при этом изменении пространственной конфигурации молекул субстрата. Показано, что даже незначительное изменение аммониевой группировки приводит к изменению числа устойчивых конформаций, из которых только некоторые комплементарны по отношению к активной поверхности фермента. Отсюда изменение доли непродуктивной сорбции субстрата связано с изменением количественного соотношения между конформерами, комплементарными и некомплементарными активной поверхности фермента [48].

III. ЭФИРЫ С ЦИКЛИЧЕСКОЙ АММОНИЕВОЙ ГРУППИРОВКОЙ В СПИРТОВОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ

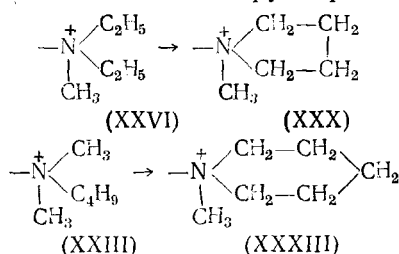
Начиная с 1939 г. [18], изучено большое количество таких эфиров. Среди них были найдены весьма ценные субстраты холинэстераз. Это в первую очередь относится к хромогенным и флуорогенным субстратам, которые по оптическим свойствам существенно отличаются от продуктов их гидролиза [49]. Применение этих субстратов позволяет оп...

активность холинэстераз с большой точностью даже при очень низких концентрациях ферментов и субстратов.

В этой главе будут рассмотрены два типа ацетатов циклических аминоспиртов: эфиры, у которых ацетоксиэтильная группа связана с ониевым азотом, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$, и эфиры, у которых ацетокси-группа связана с циклами, содержащими ониевый атом азота. Кроме того, будут рассмотрены и некоторые тиопроизводные.

1. Эфиры общей формулы $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+ \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$

Эти эфиры можно рассматривать как аналоги АХ. Их исследование началось сравнительно недавно [47]. Синтез и кинетика холинэстеразного гидролиза соединений, представленных в табл. 4, проводились большим коллективом химиков и биохимиков Института биоорганической химии АН УЗССР, Института экспериментальной медицины АМН СССР и Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР [4, 36, 44, 47, 50—64]. Особый интерес представляют соединения (XXX)—(XXXIII), поскольку на их примере можно продемонстрировать эффект циклизации аммониевой группировки



Эти превращения сопровождаются резким снижением величины a_c для БуХЭ и практически не сказывается на реакции с АХЭ. Расширение цикла от пятичленного (XXX) до семичленного (XLII) сопровождается постепенным понижением величины a_c для БуХЭ в три-четыре раза, а для АХЭ менее чем в два раза. Приведенные данные в целом свидетельствуют о большей чувствительности БуХЭ к изменениям структуры аммониевой группировки. Этот вывод согласуется с заключением по исследованию субстратов (XX)—(XXIX), приведенных в табл. 3.

Введение метильного радикала в α -положение пиперидинового кольца (XXXVIII) снижает a_c для АХЭ, а введение в γ -положение (XXXIX) повышает a_c для БуХЭ. Производное же с пиридиниевой группировкой в α -положении — анабазиносов производное, (XLVIII) не гидролизуются этими ферментами. Замена пиперидиниевой группировки на пиридиниевую (XL) или на жесткую хинуклидиниевую (XLI) приводит к полной утрате способности гидролизываться под действием холинэстераз.

«Утяжеление» циклической аммониевой группировки (XLIV), (XLV), (XLVI), (XLVII) сопровождается заметным снижением величин a_c для АХЭ и БуХЭ. Переход от пиперидиниевого соединения к более гидрофильному морфолиниевому (XXXVII) мало сказался на субстратных свойствах. *N*-Этильные производные (XXXI), (XXXIV) гидролизывались БуХЭ значительно лучше *N*-метильных аналогов.

Величины K_m для исследованных субстратов изменяются: в случае БуХЭ в 35 раз (см. (XLII) и (XLVI)), а в случае АХЭ—в 50 раз (см. XXXIX) и (XLV)). Как указывалось выше, сами по себе величины K_m не характеризуют способность субстратов гидролизываться под действием холинэстераз. Они имеют значение при оценке этой способности при низких концентрациях субстратов, когда скорость гидролиза определяется величиной a_c/K_m . Обращает на себя внимание тот факт, что (XLVII) с наименьшими значениями a_c для этих ферментов имеет и наименьшее значение a_c/K_m , и максимальному значению a_c соответствует максимальное значение a_c/K_m : (XXXI) для АХЭ и (XXXV) для БуХЭ.

Кинетические параметры реакции ацетатов циклических аминоспиртов $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_4\text{—X}$ с БУХЭ и АХЭ

Соединения	X	БУХЭ			АХЭ		
		$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c / K_M, \text{мин}^{-1}, M^{-1}$	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c / K_M, \text{мин}^{-1}, M^{-1}$
(XXX)		$1,3 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$7,7 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^9$
(XXXI)		$3,2 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^9$
(XXXII)		0	—	—	0	—	—
(XXXIII)		$3,0 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^8$
(XXXIV)		$2,0 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^8$
(XXXV)		$3,9 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^8$
(XXXVI)		0	—	—	0	—	—
(XXXVII)		$4,1 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^8$
(XXXVIII)		$3,1 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^8$
(XXXIX)		$1,2 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$6,7 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^8$
(XL)		0	—	—	0	—	—


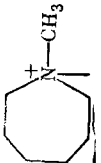
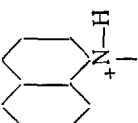
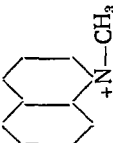
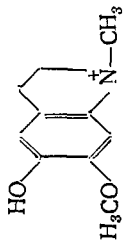
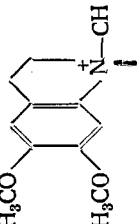
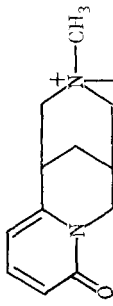
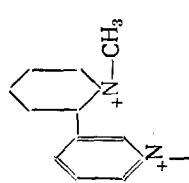
(XLI)		0	—	—	0	—	—
(XLII)		$4,0 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^8$
(XLIII)		0	—	—	0	—	—
(XLIV)		$1,6 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^3$
(XLV)		$1,8 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$6,5 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^8$
(XLVI)		$1,7 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \cdot 10^8$

ТАБЛИЦА 4 (продолжение)

Соединения	X	БухЭ			АХЭ		
		$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c / K_M, \text{мин}^{-1}, M^{-1}$	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c / K_M, \text{мин}^{-1}, M^{-1}$
(XLVII)		$6,0 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$6,0 \cdot 10^7$
(XLVIII)		0	—	—	0	—	—

Особый интерес заслуживает тот факт, что третичные аналоги циклических эфиров (XXXII), (XXXVI), (XLIII) не гидролизуются АХЭ и БухЭ. Здесь будет уместно вспомнить, что диметиламиноэтилацетат, третичный аналог АХ, в 1,5—3 раза медленнее гидролизуются под действием БухЭ и АХЭ, чем АХ. По данным теоретического конформационного анализа [65], наиболее выгодная конформация протонированной формы диметиламиноэтилацетата — циклическая с Н-связью $\text{C}=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}$. Как указывалось выше, образование Н-связи между карбонильным кислородом АХ и имидазольным кольцом гистидина, находящегося в активном центре фермента, играет важную роль в холинэстеразном катализе, а следовательно, такие циклические конформеры не будут подвергаться гидролизу, хотя их сорбция на каталитической поверхности не исключена.

Что касается способности к холинэстеразному гидролизу третичных эфиров циклических аминокислот (XXXII), (XXXVI), (XLII), то, как показали конформационные расчеты, энергетически выгодной становится структура с ацетоксиэтильной частью в экваториальном положении по отношению к азотсодержащему кольцу. Такая менее компактная по сравнению с аксиальной конформация должна испытывать стерические препятствия со стороны гидрофобного окружения анионного центра фермента, что может быть дополнительной причиной, объясняющей их неспособность гидролизироваться холинэстеразами.

2. Эфиры общей формулы $R-C(O)-S-(CH_2)_2R$

Как следует из табл. 2, замена эфирного кислорода на S в молекуле холиновых субстратов не вызывает существенного изменения в способности к холинэстеразному гидролизу. Большие изменения этой способности наблюдаются при замене O на S у ацетил- β -метилхолина (AMX). Если сам AMX гидролизуетсся БуХЭ с весьма малой скоростью ($a_c = 3 \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1}$), то его тиоловый аналог (AMTX) гидролизуетсся этим ферментом в 20 раз быстрее ($a_c = 6,5 \cdot 10^4 \text{ мин}^{-1}$) [28]. Величина a_c для АХЭ возрастает всего в два раза (соответственно $1,0 \cdot 10^5$ и $2,1 \cdot 10^5 \text{ мин}^{-1}$) [28]. В связи с этим замена O на S в молекуле AMX приводит к резкому снижению специфичности: величины отношения $a_c(\text{АХЭ})/a_c(\text{БуХЭ})$ для AMX и AMTX равны соответственно 30 и 3.

В связи с этим представляло большой интерес сравнить субстратные свойства кислородных и тиольных аналогов эфиров с циклической аммониевой группой [63, 66]. В табл. 5 представлены кинетические параметры холинэстеразного гидролиза карбоновых тиоэфиров. Прежде всего обращают на себя внимание две группы соединений: производные морфолина (XLIX) — (LII) и α -пипеколина (LIII) — (LVI). В случае АХЭ как и для холиновых эфиров (см. табл. 2) с наибольшей скоростью гидролизуются ацетаты (XLIX) и (LIII). Однако если БуТХ не гидролизуетсся АХ, то в случае производных морфолина бутират гидролизуетсся в 20 раз медленнее ацетата. Кроме того, с заметной скоростью гидролизуетсся даже валерат. Изменение же каталитической активности БуХЭ при «утяжелении» ацильной части происходит иначе, чем у холиновых эфиров. Среди морфолиниевых производных с наибольшей скоростью гидролизуетсся пропионат (L), а среди α -пипеколиниевых — ацетат (LII). Отсюда следует, что зависимость способности эфиров к холинэстеразному гидролизу при «утяжелении» ацильной части молекулы зависит от природы оиевой группировки.

Представляет интерес факт гидролиза под действием обоих ферментов протонированной формы оснований эфиров циклических аминоспиртов (LX) и (LXII) в отличие от кислородных аналогов (стр. 1640). При

ТАБЛИЦА 5
Взаимодействие тиоэфиров $R-C(O)-S(CH_2)_2-R'$ в БуХЭ и АХЭ [63, 66]

Соединения	R	R'	БуХЭ		АХЭ	
			$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M	$a_c, \text{мин}^{-1}$	K_M, M
(XLIX)	CH ₃		$6,6 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^{-5}$
(L)	C ₂ H ₅		$2,3 \cdot 10^4$	$8,9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
(LI)	C ₃ H ₇		$3,7 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^{-4}$
(LII)	C ₄ H ₉		$1,9 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$8,8 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^{-4}$
(LIII)	CH ₃		$3,6 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
(LIV)	C ₂ H ₅		$1,8 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^{-4}$
(LV)	C ₃ H ₇		$2,2 \cdot 10^2$	$8,3 \cdot 10^{-5}$	0	$1,4 \cdot 10^{-5} *$
(LVI)	C ₄ H ₉		0	$1,6 \cdot 10^{-3} *$	0	$1,8 \cdot 10^{-5} *$
(LVII)	CH ₃		$1,1 \cdot 10^4$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^{-5}$
(LVIII)	C ₂ H ₅		$2,5 \cdot 10^4$	$6,3 \cdot 10^{-5}$	$8,5 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^{-4}$
(LIX)	CH ₃		$1,8 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
(LX)	CH ₃		$2,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$7,0 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^{-4}$
(LXI)	CH ₃		$4,4 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^{-4}$
(LXII)	CH ₃		$4,8 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^{-4}$

* Приведена константа обратимого ингибирования— K_i .

сравнении величин α , представленных в табл. 5 тиоэфиров с их кислородными аналогами (табл. 4), выявляется определенная закономерность: при замене О на S скорость гидролиза под действием БуХЭ либо не изменяется, либо возрастает. В связи с этим исследованные тиосустраты обладают более низкой специфичностью к АХЭ. Как будет показано ниже (табл. 8), для субстратов (XXXII) и (XXXVII) замена О на S привела к резкому снижению специфичности.

3. Эфиры катионсодержащих гетероциклов

В табл. 6 представлены имеющиеся в литературе данные по сравнительному исследованию ацетоксипроизводных аммонийсодержащих гетероциклов в качестве субстратов БуХЭ и АХЭ. В отличие от всех вышеописанных соединений в этих эфирах ацильный остаток связан с ониевым азотом через цикл. Большой интерес представляют пиридиниевые производные (XXX)—(XXXV) [67]. Несмотря на указанные существенные структурные отличия, и для этих соединений правомочно правило: БуХЭ более чувствительна к изменениям строения спиртовой части эфира по сравнению с АХЭ. Так, в случае метилатов (XXX)—(XXXII) изменение положения ацетоксиметильной группы резко снижает скорость ферментативного гидролиза под действием БуХЭ и не влияет на гидролиз под действием АХЭ. То же наблюдалось и для этилатов (XXXIII), (XXXIX). Следует отметить высокую специфичность к АХЭ соединения (XXXII).

Для производных лупинина и эпилупинина (XXXVI), (XXXVII) характерно то, что обе холинэстеразы не чувствительны к эписмерным пре-

ТАБЛИЦА 6

Относительная скорость гидролиза ацетокси производных (φ) некоторых аммонийсодержащих гетероциклов с БуХЭ и АХЭ [72—74]

Соединения	R	Положение CH ₂ OCOCH ₃	Гетероцикл	φ^*	
				БуХЭ	АХЭ
(LXIII)	CH ₃	2		55	50
(LXIV)	CH ₃	3		20	60
(LXV)	CH ₃	4		3	50
(LXVI)	C ₂ H ₅	2		125	35
(LXVII)	C ₂ H ₅	4		10	35
(LXVIII)	C ₃ H ₇	2		50	35
(LXIX) **	CH ₃	—		7	21
(LXX)	CH ₃	—		8	22
(LXXI)	CH ₃	—		55	140

* Здесь скорость гидролиза АЖ принята за 100.

** Здесь (LXIX) — лупинин; (LXX) — эпилупинин; (LXXI) — 8-оксихинолин.

вращениям, однако АХЭ гидролизует эти эфиры быстрее, чем БуХЭ [52, 68].

Широкое применение в лабораторной практике нашли хинолиниевые производные. В табл. 6 приведены данные только для 8-ацетоксихинолина (ХХХVIII) [69]. Другие производные изучены только с АХЭ электрического органа *torpedo mormorato* [70, 71]. Скорость гидролиза (ХХХVIII) можно определять с высокой точностью колориметрическим и флуориметрическим методами. Под действием АХЭ он гидролизуется даже с большей скоростью, чем АХ.

IV. Эфиры алифатических и ароматических спиртов

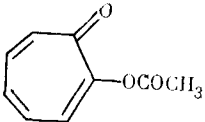
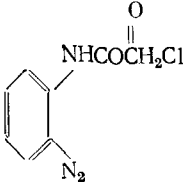
Еще в 1949 г. было установлено, что холинэстеразы способны гидролизовать не только эфиры катионоидных спиртов, но и карбоновые эфиры алифатических спиртов [72—74]. Хотя скорости гидролиза были невелики, но этот факт имел принципиальное значение. Как и в случае холиновых эфиров, скорость гидролиза алифатических эфиров при удлинении ацильной части молекулы от ацетата до бутирата в случае АХЭ снижается, а в случае БуХЭ — повышается. Что касается спиртовой части, то для обоих ферментов оптимальной является углеродная цепь из четырех атомов. Большое влияние оказывает разветвление алкильной цепи. Наиболее комплементарной алкильной группой для обеих холинэстераз является 3,3-диметилбутильная, которую рассматривают как углеродный аналог холина.

В лабораторной практике часто применяют карбоновые эфиры ароматических спиртов: фенола [75], нитрофенолов, нафтолов индола [76, 77]. Эфиры этих ароматических спиртов гидролизуются холинэстеразами с большой скоростью. Специально для высокочувствительного флуориметрического метода определения холинэстеразной активности был предложен целый ряд производных резорфина и антрацена [77].

Особое место среди некаатионоидных субстратов занимают карбоновые эфиры индофенола и его галогензамещенных [4, 78]. Они широко используются в колориметрических методах определения холинэстеразной активности не только с помощью приборов, но и визуально. Это обусловлено тем, что эфиры имеют слабо-красное окрашивание, а продукты их гидролиза индофенолы окрашены в интенсивно синий цвет. Характер-

ТАБЛИЦА 7

Гидролиз АХЭ электрического органа *torpedo mormorato*
новых некаатионогенных субстратов

Соединения	Субстрат	a_c , мин ⁻¹	K_M , M
(LXXII)	АХ	$9,8 \cdot 10^5$	0,4
(LXXIII)	$\text{CH}_2=\text{CHOC}(\text{O})\text{CH}_3$ винилацетат	$10,5 \cdot 10^5$	67,0
(LXXXIV)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHOC}(\text{O})\text{CH}_3$ 1-бутенилацетат	$5,7 \cdot 10^5$	1,1
(LXXV)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCOCCH}_3)_2$ пропилидендиацетат	$6,0 \cdot 10^5$	1,7
(LXXVI)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OCOCCH}_3)_2$ бензилидендиацетат	$6,6 \cdot 10^5$	1,5
(LXXVII)	 трополонацетат	$10,2 \cdot 10^5$	0,55
(LXXVIII)		$1,6 \cdot 10^4$	2,5
(LXXIX)	о-нитрохлорацетанилид о-нитродихлорацетанилид	$1,2 \cdot 10^4$	0,6

но, что АХЭ гидролизует только незамещенный индофениловый эфир, а БуХЭ также и галогензамещенные.

Все перечисленные в этой главе эфиры обладают существенным недостатком: они в отличие от холиновых эфиров легко гидролизуются другими эстеразами. Для определения холинэстеразной активности биологических тканей с помощью таких хромогенных субстратов сначала находят суммарную эстеразную активность, а затем после обработки этой ткани специфическим ингибитором ХЭ снова измеряют эстеразную активность. Разность между этими измерениями и характеризует активность холинэстераз.

Особо следует отметить, что некоторые виды холинэстераз гидролизуют не все хромогенные субстраты: ХЭ нервных ганглиев таракана не гидролизует *n*-нитрофенилацетат, который используется для определения активности карбоксилэстераз этого насекомого [79].

Недавно изучены новые необычные субстраты АХЭ электрического органа *torpedo mormorato* [80]. Как видно из табл. 7, эти некатионоидные эфиры гидролизуются АХЭ немногим хуже АХ, а трополонацетат (LXXVII) даже лучше. Интересны алкалидендиацетаты (LXXV), (LXXVI), где 2-ацетоксигруппы присоединены к одному атому углерода. Как известно, обычные дикарбоновые эфиры двухатомных спиртов медленно гидролизуются холинэстеразами. Например, гидролиз 9,10-диацетоксиантрацена под действием БуХЭ протекал значительно медленнее гидролиза 9-ацетоксиантрацена, т. е. вторая ацетоксигруппа мешала ферментативной реакции [77]. В отличие от таких дикарбоновых эфиров алкалидендиацетаты гидролизуются АХЭ электрического органа *torpedo mormorato* всего в 1,5 раза медленнее АХ. Не исключено, что после ферментативного гидролиза первой ацетоксигруппы спонтанно гидролизуется вторая. В этой же работе показана возможность холинэстеразного гидролиза амидной связи на примере некатионоидных ацетанилидов (LXXVI), (LXXIX).






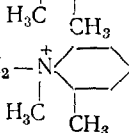
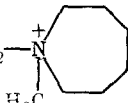
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный в обзоре материал свидетельствует об ограниченной специфичности каталитического действия АХЭ и БуХЭ. Оба фермента обладают способностью гидролизовать чрезвычайно большое количество холиновых и нехолиновых эфиров карбоновых кислот. Различие в специфичности этих ферментов состоит в том, что АХЭ более чувствителен к структуре кислотной части эфиров, а БуХЭ — к структуре спиртовой части. Показано, что и АХЭ, и БуХЭ обладают стереоспецифичностью по отношению к оптическим изомерам. Оба фермента чувствительны к оптическим изомерам субстратов, у которых асимметрический атом углерода находится в β -положении холиновой части молекулы. Кроме того, АХЭ различает оптические изомеры субстратов, у которых асимметрический атом находится в кислотной части.

Кроме специфичности каталитического действия холинэстераз существует понятие о специфических субстратах. Специфическим субстратом для данного фермента считается такой субстрат, скорость превращения которого под действием данного фермента в десятки раз больше скорости его превращения под действием другого фермента. Специфичность субстрата может значительно изменяться в зависимости от условий протекания ферментативного процесса: рН, ионный силы и особенно концентрации субстратов. Как показано выше, при высоких концентрациях субстрата его специфичность к двум холинэстеразам определяется отношением $a_{c,1}/a_{c,2}$, а при низких концентрациях — $(a_c/K_m)_1/(a_c/K_m)_2$. До недавнего времени специфическими субстратами для БуХЭ являлись БуХ и БэХ, а для АХЭ — только АМХ. При изучении ацетатов циклических аминокислот выявлено несколько новых специфических субстратов АХЭ с более выраженной избирательностью (см. табл. 8).

Наиболее специфическими субстратами АХЭ при высоких концентрациях эфиров (по величине отношения a_c) являются (XXXIII) и (XXXVII), величина отношения равна соответственно 65 и 50, которые по этому параметру значительно превосходят АМХ (отношение a_c равно

Специфичность ацетатов $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-\text{X}$ по отношению к АХЭ [48, 81]

Соединения	X	$\frac{a_c(\text{AX}\ominus)}{a_c(\text{БуХ}\ominus)}$	$\frac{(a_c/K_M)(\text{AX}\ominus)}{(a_c/K_M)(\text{БуХ}\ominus)}$
(XX)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	5	12
ATX	$\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	2	11
(LXIII)	$\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	30	32
(LXIV)	$\text{S}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3	10
(XXX)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	20	15
(XXXIII)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	65	5
(LXI)	$\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	10	1
(XXXVII)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	50	30
(XXXVIII)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	35	18
(LIII)	$\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	8	160
(XLII)	$\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ 	35	40

30). Эфиры (XXXVII) и (XLII) оказались высоко специфическими субстратами АХЭ и при высоких и при низких концентрациях. Из вновь выявленных специфических субстратов производные пиперидина (XXXIII) и морфолина (XXXVII) широко применяются в лабораторной практике.

Как указывалось выше, тиоаналоги АХ и АМТХ проявляют более низкую специфичность к АХЭ. Это подтверждается и на примере пиперидиновых производных (LII) и (LIII). Что касается α -пипеколиновых аналогов (XXXVIII) и (LIII), то здесь снижалась специфичность только при их высоких концентрациях, а при низких концентрациях (величина отношения a_c/K_M) она резко увеличивалась. Тиоэфир (LXI) пока единственный тиосубстрат, который можно рассматривать как специфический субстрат АХЭ [63, 66].

Приведенные в обзоре данные о чрезвычайно чувствительной БуХЭ к изменениям структуры аммониевой группировки молекулы субстрата дают основание высказать соображения об ограниченности размеров анионного центра БуХЭ [48, 81]. Можно предположить, что в районе анионного центра существует углубление, форма и размеры которого обслуживают предельные структуры катионной группы такого субстрата, когда еще возможен гидролиз. Путем теоретического конформационного анализа производных АХ с различной структурой аммониевой группы показано, что молекула субстрата находится в виде смеси конформаций, разделенных, как правило, высокими потенциальными барьерами. Если при взаимодействии с БуХЭ субстрат находится в конформа-

ции, размеры которой превышают предельные габариты углубления анионного центра, происходит непродуктивная сорбция субстрата. Гидролизу подвергаются те конформации эфира, у которых катионная группировка укладывается в границы анионного центра БУХЭ. В соответствии с этим конформации одного и того же субстрата делятся на продуктивные и непродуктивные. Проведенный анализ показал очень хорошую корреляцию между относительной заселенностью продуктивных конформаций субстратов и скоростью гидролиза под действием БУХЭ.

На первый взгляд казалось, что увеличение размеров N-алкильного радикала должно затруднять сорбцию в районе анионного центра и тем самым снижать скорость гидролиза под действием БУХЭ. Но по данным теоретического конформационного анализа, для центильного производного (XXII) характерны конформеры с более компактной упаковкой алкильных радикалов, чем для пропильного производного (XXI).

Таким образом, можно объяснить «аномальное» изменение скорости гидролиза в ряду (XX), (XXII), (XXIV), (XXII) гидролизует в три раза хуже (XX) и в 2,5 раза хуже (XXIV). То же самое можно сказать и об N-алкильных производных пиперидиния — (XXXII), (XXXIV), (XL), где изопропильный аналог (XL) оказался более компактным, чем метильный (XXXIII).

Этот новый подход открывает возможности как для исследования методом субстратного анализа особенностей структуры каталитической поверхности холинэстераз, так и для прямых рекомендаций при синтезе высокоспецифических субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nachmansohn D.* Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity New York: Acad. Press, 1957, p. 235.
2. *Koelle G. B.* Cholinesterase and Anticholinesterase Agent. B. 15, Berlin: Handbuch exp. Pharmacol., 1963, p. 1216.
3. *Годилов С. Н., Розенгарт В. И.* Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л.: Медицина, 1964, с. 110.
4. *Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А.* Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: Фан, 1976, с. 206.
5. *Silver A.* The Biology of Cholinesterases, New York: North Holland Publishing, 1974, p. 596.
6. *Usdin E.* In: Anticholinesterase Agents, Inter. Encyclopedia Pharmac. Therap., sec. 13. v. 1, p. 47.
7. *Brestkin A. P., Brick I. L., Grigoreva G. M.* Intern. Encyclop. Pharmac. Therap., 1973, sec. 85, v. 1, p. 241.
8. *Kabachnik M. J., Brestkin A. P., Godovikov N. N., Michelson M. J., Rozengart E. V., Rozengart V. J.* Pharmacol. Rev., 1970, v. 22, p. 355.
9. *Brestkin A. P., Rozengart E. V.* Nature, 1965, v. 205, p. 388.
10. *Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В.* Биохимия, 1970, т. 35, с. 382.
11. *Sastry B. V. R., White E. C.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 151, p. 597.
12. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М.: Изд-во иностр. лит., 1961, с. 726.
13. *Barry W. K.* Biochem. J., 1951, v. 49, p. 615.
14. *Холден Дж. Б. С.* Энзимы. Л.: ОНТИ. Госхимиздат, 1934, с. 122.
15. *Бресткин А. П., Иванова Л. А.* Биохимия, 1970, т. 35, с. 652.
16. *Lineweaver H., Burk D. J.* Amer. Chem. Soc., 1934, v. 56, p. 658.
17. *Foldes F. F., Foldes V. M. J.* Pharm. Exp. Therap., 1965, v. 150, p. 220.
18. *Glick D. J.* Biol. Chem., 1939, v. 130, p. 527.
19. *Chion C. Y., Sastry B. V. R.* Biochem. Pharm., 1968, v. 17, p. 805.
20. *Sastry B. V. R., Chion C. Y.* Biochim. Biophys. Acta, 1968, v. 167, p. 339.
21. *Tabachnick J. J. A., Roth F. E., Rubin A. A. J.* Pharm. Exp. Therap., 1958, v. 123, p. 98.
22. *Rubin A. A., Mershon J., Tabachnick J. J. A.* Ibid., 1958, v. 123, p. 104.
23. *Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н.* Биохимия, 1976, т. 41, с. 264.
24. *Sastry B. V. R., White E. C.* Fed. Proc., 1964, v. 23, p. 177.
25. *Ellman G. H., Countney R. D., Anders V., Feather K. M.* Biochem. Pharmacol., 1961, v. 7, p. 88.
26. *Heilbronn E.* Acta Chem. Scand., 1959, v. 13, p. 1547.
27. *Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Сипенкова Т. Н.* Биохимия, 1974, т. 39, с. 13.
28. *Абдувахобов А. А., Азярова М., Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Садыков А. С.* Докл. АН СССР, 1981, т. 258, с. 1233.
29. *Hillman G. R., Mautner H. G.* Biochemistry, 1970, v. 9, p. 2633.
30. *Moore D. E., Hess G. P.* Ibid., 1975, v. 14, p. 2386.
31. *Alles G. A., Hawes R. C. J.* Biol. Chem., 1940, v. 133, p. 375.
32. *Яковлев В. А.* Кинетика ферментативных реакций. М.: Наука, 1965, с. 247.

33. Beckett A. H., Mitchand M., Clitherow J. W. Biochem. Pharmacol., 1968, v. 17, p. 1601.
34. Beckett A. H., Harper N. J., Clitherow J. W. J. Pharm. Pharmacol., 1963, v. 15, p. 362.
35. Shefter E., Mauther H., Smiasman E. J. Pharm. Sci., 1970, v. 59 p. 1118.
36. Абдувахобов А. А., Хакимов Ю. Р., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Садыков А. А., Асламов Х. А., Садыков А. С. Докл. АН СССР, 1978, т. 241 № 1, с. 227.
37. Chion C. Y., Long J. P., Cannon J. C., Armstrong P. D. J. Pharm. Exp. Therap., 1969, v. 166, p. 243.
38. Фруентов Н. К. Биохимия, 1963, т. 28, с. 964.
39. Mehrotra K. N., Dauterman W. C. J. Neurochem., 1963, v. 10, p. 119.
40. Ярв Я. Л., Кесватера Т. А., Аавиксаар А. А. Реакц. способн. орган. соед., 1976, т. 13, вып. 4, с. 509.
41. Ярв Я. Л., Лангель Ю. Л. Биооргани. химия, 1979, т. 5, с. 746.
42. Nozawa M., Tanisawa K., Kanaoka Y. Biochem. Biophys. Acta, 1980, v. 611, p. 314.
43. Barlow R. B. Introduction of Chemical Pharmacology. London: Methuen, 1964, p. 470.
44. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Соболева И. Н., Хромов-Борисов И. В., Тихонова Л. И. Биохимия, 1975, т. 40, с. 95.
45. Huang H. T., Nieman C. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 4634.
46. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Қосов А. А. Биохимия, 1971, т. 36, с. 227.
47. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Соболева И. Н., Хромов-Борисов И. В., Инденбом М. Л., Тихонова Л. Н., Абдувахобов А. А., Торемурастов Қ. Докл. АН СССР, 1972, т. 205, с. 717.
48. Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Хромов-Борисов И. В., Бровцина И. Б. Там же, 1976, т. 231, с. 215.
49. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М.: Мир, 1965, с. 572.
50. Розенгарт Е. В., Соболева И. Н., Инденбом М. Л., Тихонова Л. И., Хромов-Борисов И. В. Докл. АН СССР, 1973, т. 209, с. 482.
51. Хромов-Борисов И. В., Инденбом М. Л., Тихонова Л. И., Данилов А. Ф., Розенгарт Е. В., Соболева И. Н., Старшинова Л. А. Там же 1974, т. 218, с. 1476.
52. Қасымов Ш. К., Абдувахобов А. А., Асламов Х. А., Розенгарт Е. В. Узб. хим. ж., 1975, № 2, с. 56.
53. Абдувахобов А. А. и др. Узб. хим. ж., 1975, № 3, с. 38.
54. Қасымов Ш. К., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асламов Х. А., Садыков А. С. Авторск. свид. № 518496, 27.02.1976; Бюл. изобр., 1976, № 23, с. 76.
55. Қасымов А. К., Хаджиев Қ. Х., Розенгарт Е. В., Майзель Е. Б., Қасымов Ш. К., Абдувахобов А. А. Докл. АН УзССР, 1976, № 6, с. 52.
56. Хакимов Ю. Р., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Садыков А. А., Асламов Х. А. Там же, 1978, № 1, с. 45.
57. Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Хакимов Ю. Р., Абдувахобов А. А., Асламов Х. А. Биохимия, 1978, т. 43, с. 1150.
58. Қасымов А. К., Розенгарт Е. В. Тр. молодых ученых-медиков Узбекистана, 1977, вып. 7, с. 51.
59. Абдувахобов А. А. и др. Докл. АН УзССР, 1977, № 4, с. 39.
60. Хакимов Ю. Р. и др. Там же, 1977, № 5, с. 50.
61. Хакимов Ю. Р. и др. Там же, 1977, № 9, с. 33.
62. Қасымов Ш. К. Автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. хим. наук. Ташкент: Ин-т биоорг. химии, 1975.
63. Қасымов А. К. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. мед. наук. Алма-Ата: Мед-институт, 1977.
64. Хакимов Ю. Р. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. Л.: ЛТИ им. Лен-совета, 1979.
65. Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Қасымов А. К., Абдувахобов А. А., Қасымов Ш. К., Асламов Х. А., Садыков А. С. Докл. АН СССР, 1976, т. 228, с. 1460.
66. Бресткин А. П., Қасымов А. К., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В., Гмиро В. Е., Познякова Л. Н., Хромов-Борисов И. В. Там же, 1976, т. 229, с. 207.
67. Augustinsson K. B. Biochim. Biophys. Acta, 1966, v. 128, p. 351.
68. Абдувахобов А. А., Қасымов Ш. К., Розенгарт Е. В., Соболева И. Н., Асламов Х. А., Садыков А. С. Докл. АН СССР, 1975, т. 220, с. 961.
69. Умецкая М. Н. Биохимия, 1970, т. 35, с. 736.
70. Prince A. K. Arch. Biochem. Biophys., 1966, v. 113, p. 195.
71. Prince A. K. Biochem. Pharmacol., 1966, v. 15, p. 411.
72. Adams D. H. Biochim. Biophys. Acta, 1949, v. 3, p. 1.
73. Adams D. H., Whitteker V. P. Ibid., 1949, v. 3, p. 358.
74. Adams D. H., Whitteker V. P. Ibid., 1949, v. 4, p. 543.
75. Волкова Р. И. Биохимия, 1967, т. 32, с. 1253.
76. Бресткин А. П., Лапицкий К. В., Самокиш В. А., Смирнов О. И. Докл. АН СССР, 1974, т. 219, с. 999.
77. Guilbault G., Kramer D. N. Anal. Chem., 1965, v. 37, p. 120.
78. Kramer D., Gamson R. M. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, p. 1785.
79. Brick I. L., Mandelshtam Ju. E., Nemes V. Chem. Agric., 1977, v. 15, p. 40.
80. Neveh M., Bernstein Z., Segal D., Shalitin Y. FEBS Letters, 1981, v. 134, p. 53.
81. Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А., Хромов-Борисов И. В., Бровцина И. Б. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, с. 820.

Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент;
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград