

Биолог. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 577.153:541.127:547.12

АНОМАЛЬНАЯ КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА ДИХОЛИНОВЫХ ЭФИРОВ ВЫСШИХ АЛИФАТИЧЕСКИХ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

М.Р. МИАЦАКАНЯН^{*}, Л.М. АКОПЯН^{*}, Ж.В. САРКИСЯН^{**},
В.А. САМОКИШ^{***}, Г.П. АЛЕБЯН^{***}

^{*}ЗАО «НИИ Биотехнологии», 0056, Ереван, РА

^{**}Ереванский государственный университет, 0025, Ереван, РА

^{***}Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, РФ

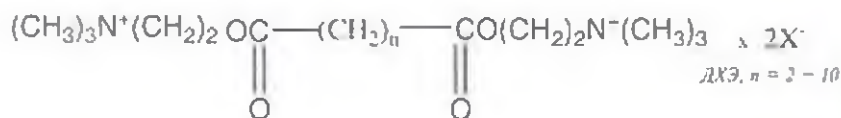
Дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот являются биологически активными веществами, из них суцинилдихолин широко применяется в медицинской практике как миорелаксант. Продолжительность их действия на организм обусловлена ферментативным гидролизом под действием бутирилхолинэстеразы (BuChE) плазмы крови. При изучении кинетики ферментативного гидролиза дихолиновых эфиров высших дикарбоновых кислот нами было обнаружено отклонение от общепринятого двухстадийного механизма. Суть данного отклонения заключается в образовании дикарбоновой кислоты на первой стадии ферментативной реакции. Представлены гипотетические объяснения наблюдаемой "аномалии".

Ալիֆատիկ դիկարբոնաթթուների դիխոլինային էսթերները կենսաբանորեն ակտիվ միացություններ են, որոնցից սուցինիլդիխոլինը (այնորեն կիրառվում է բժշկության մեջ որպես միոռելաքսանտ): Հայտնի է, որ նշված նյութերի ազդեցության տևողությունը օրգանիզմի վրա պայմանավորված է նրա հիդրոլիզով արյան պլազմայի բուրիրիլխոլինէսթերազի ազդեցությամբ: Մեր կողմից բացահայտվել է, որ այս շարքի ավելի բարձր ներկայացուցիչների ֆերմենտային հիդրոլիզի մեխանիզմը շեղվում է ընդունված երկփուլ մեխանիզմից: Հայտնաբերվել է, որ հիդրոլիզի առաջին փուլում առաջանում է դիկարբոնաթթու: Մեր կողմից առաջադրվում են հիպոթեզային սխեմաներ դիսկոլի «անոմալիայի» վերաբերյալ:

Aliphatic dicarboxylic acid dicholine esters (DChE) are bioactive compounds and succinylcholine is widely used as neuromuscular relaxant. The duration of its action on the organism depends on its hydrolysis by blood plasma BuChE. It was observed that the kinetic of enzymatic hydrolysis of higher homologues of DChE deviated from the accepted two-stage mechanism. The formation of dicarboxylic acid during the first stage of enzymatic hydrolysis was revealed. The hypotheses for explanations of this "anomaly" are presented.

*Бутирилхолинэстераза - дихолиновые эфиры - суцинилдихолин -
ферментативный гидролиз*

Дихолиновые эфиры алифатических дикарбоновых кислот (ДХЭ) являются биологически активными веществами, и некоторые из них применяются в медицинской практике [4,7]. Соединения этого ряда с общей формулой:



обладают избирательным действием на холинорецепторы (ХР) скелетных мышц, вызывая блок нервно-мышечной проводимости [1, 4, 15]. Дихолинный эфир янтарной кислоты (производимый под названиями сукцинилдихолин, дистилин и т.д.) по настоящее время широко применяется в хирургической практике в качестве миорелаксанта [4, 10]. В медицинской практике непродолжительно использовался дихолинный эфир пробковой кислоты (субехолин, корконий, суберилдихолин) как блокатор никотиновых рецепторов и дыхательный analeptик, однако в силу нежелательных побочных действий препарат был выведен из применения. Соединения этого ряда также широко используются в модельных исследованиях при изучении отдельных компонентов холинэргической системы организма [2, 3, 5, 8, 15].

Данные о синтезе и фармакологических свойствах ДХЭ впервые были опубликованы еще в 1906 г. *Hunt and Taveau* [14]. Одной из важных фармакологических характеристик сукцинилдихолина и остальных ДХЭ является кратковременность и полная обратимость их действия на организм, что обусловлено ферментативным гидролизом ДХЭ под действием бутирилхолинэстеразы сыворотки крови (БуХЭ, КФ 3.1.1.8) [9, 12].

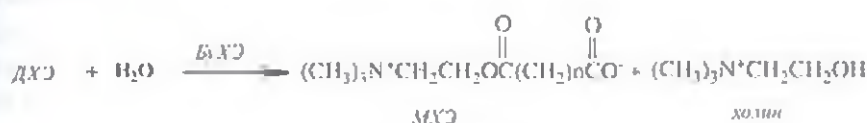
Выявление фармакологических свойств дихолиновых эфиров и их аналогов в дальнейшем послужило важной основой для изучения закономерностей ферментативного гидролиза этих соединений. В первых кинетических исследованиях было показано, что реакция гидролиза сукцинилдихолина под действием БуХЭ подчиняется уравнению скорости нулевого порядка [11, 16]. Исследования, проведенные *Whittaker et al.*, показали, что одной из важных особенностей ферментативного гидролиза сукцинилдихолина является его двухстадийность [17]. Согласно полученным кинетическим данным, было сделано предположение, что в течение первой стадии гидролиза под действием фермента расщепляется только одна из симметричных эфирных связей, в результате чего образуются монохолинный эфир и холин. Вторая стадия, во время которой образуется янтарная кислота и холин, практически начинается только после полного исчерпания в реакционной среде сукцинилдихолина.

Данные проведенного хроматографического анализа показали, что при 10% и 35% гидролиза в среде обнаруживаются сукцинилдихолин, сукцинилмонохолин и холин, при 50 % - сукцинилмонохолин и холин, а при 60 % - сукцинилмонохолин, холин и янтарная кислота [17]. Резкое разграничение двух стадий ферментативного гидролиза объясняется большой разницей между значениями K_m двух субстратов [17].

Для изучения ферментативного гидролиза четвертичных аминокислотных эфиров дикарбоновых кислот под действием БуХЭ сыворотки крови лошади Волковой и сотрудниками был использован рН-

метрический метод, а Goedde et al. — метод электрофореза с применением радионуклидов, позволяющий проводить измерения в достаточно широких диапазонах концентрации субстратов, и показан, что K_m дихолинового эфира пробковой кислоты равна $5,2 \times 10^{-3} \text{ М}$ [3], янтарной $4,2 \times 10^{-3}$ [13], а монохолинового $8,4 \times 10^{-4}$ [13].

1-ая стадия:



2-ая стадия:

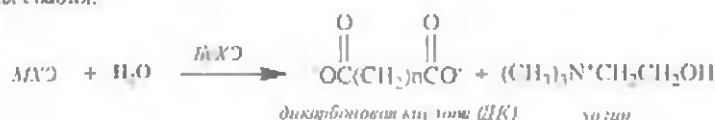


Схема 1. Двухстадийный ферментативный гидролиз дихолиновых эфиров дикарбоновых кислот под действием БуХЭ.

Ферментативный гидролиз серии дихолиновых и монохолиновых эфиров алифатических дикарбоновых кислот (от янтарной до пробковой) под действием БуХЭ сыворотки крови лошади описан в работе [1]. Кинетические параметры реакций (K_m и V) определены специально разработанным авторами косвенным флуориметрическим методом с применением конкурирующего субстрата α -нафтилацетата. Полученные значения K_m в ряду ДХЭ равны $5,1 - 8,9 \times 10^{-3} \text{ М}$ для диэфиров и $1,49 - 0,97 \times 10^{-3} \text{ М}$ для моноэфиров. Как было показано, реакционная способность (V) в ряду как моноэфиров, так и диэфиров зависит от длины полиметиленовой цепи в молекуле дикарбоновой кислоты, при этом максимальная скорость гидролиза диэфира приблизительно на один порядок выше максимальной скорости моноэфира той же кислоты. Учитывая значение pH реакционной среды, авторы обращают внимание на то, что молекулы моноэфира, как и диэфира в указанных условиях несут два заряда с той лишь разницей, что в случае моноэфира один из зарядов имеет отрицательный знак. Следовательно, моно- и диэфиры можно рассмотреть как единый ряд субстратов с варьирующим расстоянием между заряженными группами. Это наблюдение позволило обнаружить совершенно неожиданную единую корреляцию. Именно, оказалось, что логарифм максимальной скорости реакции в объединенном ряду является функцией расстояния между зарядами и монотонно увеличивается с увеличением этого расстояния, примерно в 200 раз от монохолинового эфира янтарной кислоты до дихолинового эфира пробковой кислоты. На основе полученных данных была выдвинута гипотетическая модель гидролиза холиновых эфиров дикарбоновых кислот под действием БуХЭ, согласно которой амилый хвост субстрата в течение каталитической

реакции предпочтительно взаимодействует с внешней средой, то есть с водной фазой.

Из-за отсутствия данных о структуре БуХЭ и расположении активного центра в макромолекуле фермента все перечисленные исследования можно считать незавершенными. В конце прошлого столетия тотальная компьютеризация и развитие рентгеноструктурного и других методов анализа оказали сильное влияние на эффективность исследований в области строения белков. Вскоре в интернете была помещена база данных протеинов (protein data bank). Модель БуХЭ человека, полученная исходя из кристаллической структуры АХЭ *Torpedo californica*, дала достоверное представление о строении активного центра фермента и его локализации.

Одним из последних исследований, посвященных холинэстеразному гидролизу сукцинилдиптихолина, была работа, опубликованная (Masson P., Lockridge O. et al.) в 1997 г., где для объяснения ряда кинетических закономерностей авторами использованы современные представления о структуре БуХЭ, применены природные натуральные и искусственные формы мутантных ферментов, методы компьютерного молекулярного моделирования [15]. Проведенные работы позволили построить модель трехэтапного формирования фермент-субстратных комплексов для субстратов с положительно заряженной группой, таких как сукцинилдиптихолин и бутирилдиптихолин (схема 2). Показано, что при использовании D70G мутанта БуХЭ при гидролизе сукцинилдиптихолина значение K_m увеличивается в 100 раз по сравнению с природной формой БуХЭ (дикий тип БуХЭ), тогда как при гидролизе бутирилдиптихолина K_m увеличивается только в 10 раз. Было предположено, что Asp 70, который находится на поверхности, у порога «ущелья» активного центра фермента, ответственен за образование переходных комплексов Михаэлиса с положительно заряженными субстратами. Наблюдаемая разница значений K_m объясняется различием взаимодействия Asp 70 с моно- и бисчетвертичными субстратами. Бисчетвертичный субстрат взаимодействует с Asp 70 последовательно в два этапа, образуя ES1 и ES2 комплексы, тогда как субстраты с одним положительно заряженным атомом азота образуют только ES1 комплекс [15].

Хотя описанная схема не противоречит принятой кинетической картине ферментативного гидролиза сукцинилхолина, при попытке применения предложенного механизма для объяснения кинетических закономерностей наблюдаемых при ферментативном гидролизе других членов этого ряда ДХЭ, возникают определенные трудности.

Согласно уже упомянутым данным, удлинение полиметиленовой цепи в ряду ДХЭ приводит к увеличению скорости реакции [1], что не объясняется схемой 2, предложенной в работе [15]. Более того, при уточнении параметров уравнения Михаэлиса этих соединений было обнаружено и другое несоответствие. Оказалось, что при гидролизе ДХЭ с длинной полиметиленовой цепью, начиная с дихолинового эфира пробковой кислоты, в течение первой стадии (гидролиз одной из симметричных сложноэфирных групп) количество образующегося кислотного продукта превышает ожидаемое

примерно на 35%. Наблюдаемый избыток продукта может приписываться, вероятно, формированию дикарбоновой кислоты на первой стадии ферментативного гидролиза. Однако такое предположение противоречит вышеприведенному механизму гидролиза этого ряда субстратов [2, 3].

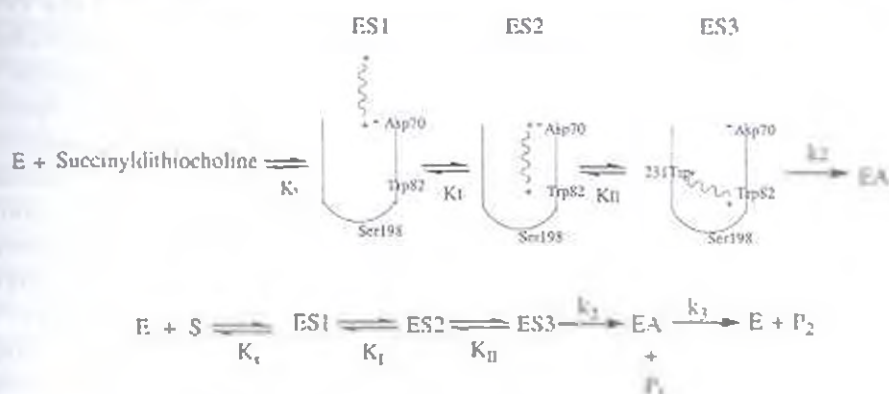


Схема 2. Схема бутирилхолинэстеразного гидролиза сукцинилдихолина, предложенная в работе [15]. ES1, ES2, ES3 – фермент-субстратные комплексы, EA – промежуточный ацилированный фермент, P₁ – холин, P₂ – монохалиновый эфир, K₁ – константа диссоциации ES1 комплекса, K₂ и K₃ – константы изомеризации для комплексов ES2, ES3 соответственно, k₁ и k₂ – константы скорости актов ацилирования и деацилирования фермента

Данная работа посвящена исследованию установленному нами явления нарушения кинетики Михаэлиса при гидролизе дихолиновых эфиров высших алифатических дикарбоновых кислот под действием БУХЭ.

Материал и методика. Скорость ферментативного гидролиза ДХЭ определяли методом прямого потенциометрического титрования образующихся при гидролизе кислотных продуктов в реакционной среде, содержащей 0,3 М KCl, 0,001 М фосфатного буфера на приборе pH-stat марки Radiometer Analytical TitrLab854. Определения проводили в термостатируемой ячейке прибора при 25° и pH 7,6. Минимальная начальная концентрация субстратов в реакционной среде составляла не менее $2,5 \times 10^{-4}$ М. В качестве титранта использовали 0,013 – 0,02 М раствор NaOH.

Использованный препарат БУХЭ высокой степени очистки из сыворотки крови человека с удельной активностью 344 Ед/мл любезно предоставлен профессором О. Локридж (Мелинский Центр Университета Небраски). Дихолиновые эфиры синтезированы в ИТОХ им. А.Л. Милославского НАН РА.

Наличие в реакционной среде дикарбоновой кислоты на разных этапах реакции определяли методом тонкослойной хроматографии с использованием подвижной фазы бензол – метиловый спирт – уксусная кислота, с соотношением объемов 45:8:4 соответственно, и проявителя бромкрезолового пурпурного.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показана зависимость накопления кислотного продукта в течение реакции холинэстеразного гидролиза дихолиновых эфиров адипиновой и себациновой кислот. Как видно из рис., накопление продукта на начальном этапе реакции в обоих случаях протекает в общих чертах одинаково. Сначала в реакционной среде происходит монотонное, практически линейное нарастание концентрации продукта. После накопления определенного количества продукта кинетика реакции меняется, что выражается в резком замедлении скорости гидролиза.

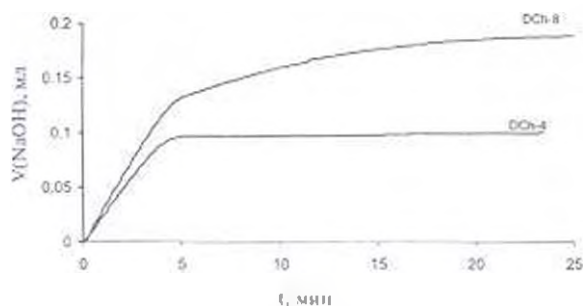


Рис. 1 Кинетика накопления кислотного продукта при гидролизе препаратов дихолиновых эфиров адипиновой (DCh-4) и себаценовой (DCh-8) кислот (пунктирной линией представлено расчетное количество титранта при условии гидролиза только одной сложнойэфирной связи) ($[NaOH] = 0.013M$, $[DCh] = 2.5 \times 10^{-4} M$, $V = 5$ мл, $pH = 7.6$, $25^\circ C$).

При гидролизе дихолинового эфира адипиновой кислоты, после накопления в среде приблизительно $2.5 \times 10^{-4} M$ кислотного продукта (что соответствует начальной концентрации диэфира в данном опыте) скорость реакции практически падает до нуля. Однако добавление в реакционную среду дополнительного большого количества препарата фермента приводит к

возобновлению расхода титранта, что свидетельствует о продолжении реакции гидролиза (на рисунке не показано). Таким образом, гидролиз дихолинового эфира адипиновой кислоты протекает в полном соответствии со схемой 1, приведенной выше, в частности вторая стадия гидролиза (гидролиз монохолинового эфира) протекает после полного исчерпания диэфира в реакционной среде.

При гидролизе такой же концентрации дихолинового эфира себаценовой кислоты резкое падение скорости реакции наблюдается при более высоком значении расхода титранта. Наблюдаемый на первой стадии реакции расход титранта приблизительно на 35 % выше, чем в случае дихолинового эфира адипиновой кислоты.

По всей видимости, избыточная затрата титранта может предписываться образованию дикарбоновой кислоты в течение первой стадии гидролиза. Для установления справедливости этого предположения в специально проведенном опыте реакция была остановлена (кипячением) примерно на половине первой стадии. Определение образовавшихся продуктов реакции было проведено методом ТСХ. Результаты хроматографического анализа реакционных смесей гидролиза дихолиновых эфиров адипиновой и себаценовой кислот показали наличие дикарбоновой кислоты только в случае дихолинового эфира себаценовой кислоты. В другом опыте ферментативный гидролиз был проведен при высокой ($4 \times 10^{-3} M$) концентрации дихолинового эфира себаценовой кислоты. По достижении аналогичной точки конверсии для денатурации фермента добавлением концентрированной серной кислоты pH реакционной среды была доведена до единицы. Через небольшой промежуток времени в реакционной среде образовался белый осадок, который центрифугированием был отделен от жидкой фазы и методом ТСХ идентифицирован как себаценовая кислота. В контрольном опыте, проведенном без добавления фермента, образования осадка не наблюдалось.

Как свидетельствуют результаты проведенных нами экспериментов, кинетика ферментативного гидролиза дихолинового эфира адипиновой кислоты

вполне укладывается в представления, сформированные в литературе о кинетическом поведении ДХЭ. Что касается дихолинового эфира себашиновой кислоты, то наблюдаются ранее не описанные в литературе отклонения. Образование себашиновой кислоты в реакционной среде в течение первой стадии реакции может быть, например, объяснено сравнительно близкими величинами значений сродства фермента к дихолиновому и монохолиновому эфирам себашиновой кислоты. Однако в этом случае до появления излома на кинетической кривой на первой стадии необходимо было ожидать сильное искривление зависимости накопления продукта от времени, ввиду низкой скорости гидролиза моноэфира. Тем не менее, в целях проверки данного предположения нами был проведен следующий опыт. После завершения первой стадии гидролиза в реакционную среду сразу была введена новая порция такой же концентрации дихолинового эфира себашиновой кислоты. Если предположение о конкуренции субстратов верно, то кинетическая зависимость первой стадии должна быть сильно искажена, так как в реакционной среде в значительной концентрации накоплен моноэфир. Как показано на рис. 2, кинетика первой стадии практически не претерпевает никаких изменений. Результат проведенного опыта фактически опровергает сделанное предположение и указывает на то, что гидролиз некоторой части моноэфира протекает параллельно с гидролизом диэфира и что этот гидролиз протекает вопреки сильной разнице в значениях K_m .

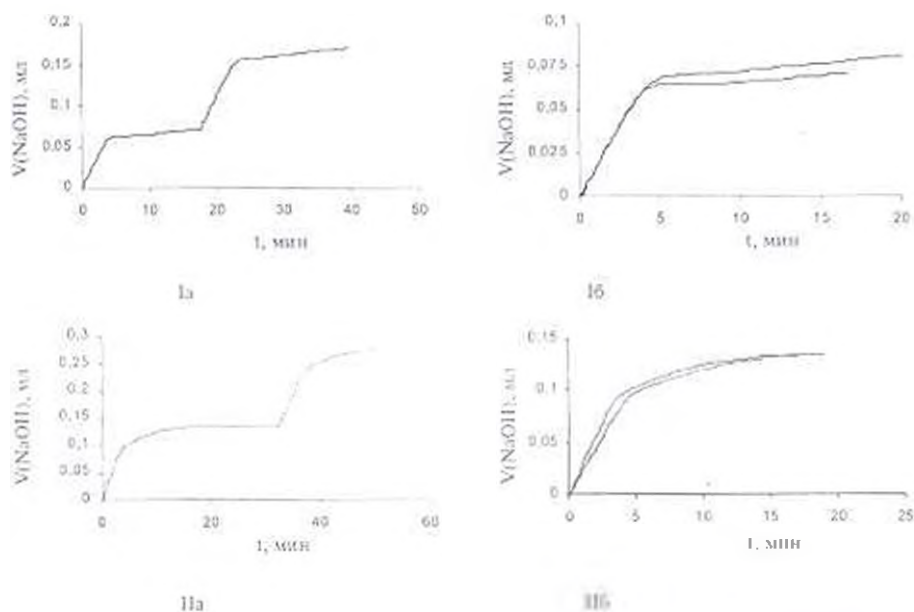


Рис. 2. Кинетика ферментативного гидролиза дихолиновых эфиров адипиновой (Ia, Ib) и себашиновой (IIa, IIb) кислот с добавлением второй порции субстрата: а - накопление продукта при повторном добавлении субстрата, б - наложение отдельных частей зависимости при совмещении по времени моментов добавления субстрата $[\text{NaOH}] = 0,02 \text{ M}$, $[\text{DCE}] = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $V = 1 \text{ мл}$, $\text{pH} = 7,4$, 25°C

ЛИТЕРАТУРА

1. Алебян Г.П., Григорян Н.А., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. Биооргани. химия. 3, 9, 1266-1272, 1977.
2. Алебян Г.П., Мнджоян О.Л., Самокиш В.А. Биотехнология 1, 80-85, 1999.
3. Волкова Р.И., Дмитриева Е.Н. Биохимия, 41, 264-275, 1976.
4. Дипилин и опыт его клинического применения. под ред. А. Л. Мнджояна, 7-28, Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1957.
5. Михельсон М.Я., Зеймаль Э.В. Ацетилхолин, 154-183. «Наука», М., 1970.
6. Bovei D. In: Neuromuscular blocking agents, ed. J. Cheymol, 1, 244, 1973.
7. Brucke F. Pharmacological reviews, 8, 256-335, 1956.
8. Carter, Chris, R.J., Cao L., Kawai, H., Smith, P.A., Dryden, W.F., Raftery, M.A., Dunn, S.M. Biochem. Pharmacol. 73, 417-426, 2007.
9. Castillo J., de Beer E.J. J.Pharmacol. 99, 458-464, 1950.
10. Cokugras A.N. J. Biochem. 28(2): 54-61, 2003.
11. Foldes F.F., McNall P.G., Borrego-Hinojosa J.M. New Engl. J. Med. 247: 596-600, 1952.
12. Glick D. J. biol. Chem. 137: 357-362, 1941.
13. Goedde H.W., Held K.R., Altland, K. Mol. Pharmacol. 4, 274-287, 1968.
14. Hunt R., Taveuu R. de M, Brit. med. J. 2: 1788-1791, 1906.
15. Masson P., Legrand P., Bartels C.F., Froment M.T., Schopfer L.M., Lockridge O. Biochemistry, 36(8). 2266-2277, 1997.
16. Tsuji F.J., Foldes F.F. Hydrolysis of succinylecholine in human plasma. Fed. Proc. 12: 374, 1953.
17. Whittaker V.P., Wijesundera S. Biochem. J. 52: 475-479, 1952.

Поступили 24.X.2007