

УДК 577.153.4—615.355

ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ
ЗРИТЕЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА:
СИЛАТРАНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

РОЗЕНГАРТ Е. В., КОВАЛЕВ Н. Н., ФЕДОРЦ Ю. А., ШЕСТАКОВА Н. Н.,
ЭПШТЕЙН Л. М., ХОВАНСКИХ А. Е.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

Показано обратимое ингибирующее действие группы силатрановых производных на активность холинэстеразы зрительных ганглиев особей командорского кальмара *Berrytheutis magister*, обитающих в различных зонах Берингова моря. В качестве ингибиторов исследованы органические соединения с разной природой гетероатома (азот, сера, селен, телур), а также тионовый силатрансодержащий фосфорорганический ингибитор. Выявлена зависимость антихолинэстеразного действия от определенных нами геометрических параметров молекулы ингибиторов. Подтверждена гетерогенность свойств холинэстеразы особей кальмара из разных зон обитания, что, видимо, связано с наличием внутривидовых группировок у командорского кальмара.

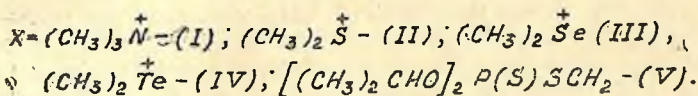
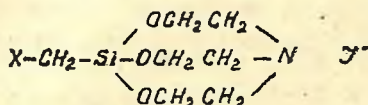
Холинэстераза (ХЭ) обладает тканевой и видовой специфичностью [1]. Как правило, это отражается на субстратно-ингибиторных характеристиках ХЭ из разных объектов. Нами были изучены свойства ХЭ особей командорского кальмара, обитающих в разных зонах Берингова моря [2—8]. Различия между ХЭ особей проявлялись в разной чувствительности к ряду обратимых ингибиторов.

Обратимые ингибиторы ХЭ (исключая «безадресные» антихолинэстеразные вещества) можно подразделить на два типа: для одних (и их большинство) мишенью действия является область анионного центра ХЭ [9], а другие тормозят активность ХЭ за счет сорбции в районе эстеразного центра [7]. Такое деление является в известной степени условным, однако оно позволяет подойти к «конструированию» обратимого ингибитора. Его молекула должна состоять из функциональной группировки; для первого типа ингибиторов может служить пералкилированный оциевый атом элементов V или VI групп Периодической системы, либо группа, способная к ионизации при близких к нейтральным значениям pH (например, замещенные аминогруппы), а также группа, пространственно имитирующая три-метиламмониевую группировку АХ, природного субстрата ХЭ (например, третично-бутильная группа). Для второго типа ингибиторов в

качестве функциональной группы может выступать фосфорильная группа молекулы фосфорорганического ингибитора (ФОИ), не способного к фосфорилированию ХЭ. Этому условию отвечают либо тиофосфаты ($P=S$), которые из-за отсутствия выраженного акцептора водородной связи не могут так «организовать» активный центр ХЭ, чтобы образовался активированный гидроксил серина [1], либо фосфаты, которые более склонны к реакции алкилирования [1], либо циклофосфаты, атом фосфора которых экранирован, вследствие чего недоступен для атаки активированным гидроксилом серина.

Что касается гидрофобной части, то здесь для химической «фантазии» нет ограничений. Однако именно гидрофобная часть молекулы обратимого ингибитора, как правило, определяет его специфичность.

Исходя из этих теоретических представлений, мы изучили в качестве обратимых ингибиторов ХЭ командорского кальмара группу силатрановых производных элементоорганических соединений:



На основании полученных результатов мы пришли к следующим выводам.

Наличие оневой группы, способной взаимодействовать с анионным центром ХЭ, позволяет отнести соединения I—IV к первому типу обратимых ингибиторов. Соединения I—IV представляют собой уникальную группу с различной природой онеевого атома.

Соединение V, будучи тионовым ФОИ, неспособно необратимо ингибировать ХЭ [1], однако обратимое торможение оно осуществляет главным образом за счет взаимодействия с эстеразным центром [7], то есть может быть отнесено ко второму типу обратимых ингибиторов.

Все эти соединения (I—V) содержат силатрановую группу, обладающую, с одной стороны, суперэлектроннодонорными свойствами [10], что должно понизить эффективный заряд онеевой группы (соед. I—IV) и препятствовать разрыву сложноэфирной связи в соединении V, а, с другой стороны, из-за «втягивания» неподеленной пары электронов азота, что исключает его протонирование, силатранил можно рассматривать как гидрофобную группировку.

Благодаря не содержащему силатрана соединению VI— $(CH_3)_2SeCH_2-Si(OCH_2CH_3)_3$ I—(VI) появилась возможность оценить силатрановый вклад в ингибиторные свойства соединения III.

Представлял практический интерес поиск в этой группе соединений специфических ингибиторов ХЭ особой камбодорского кальмара из разных зон обитания.

Материалы и методы

Изученные соединения синтезированы в Иркутском институте органической химии Сибирского отделения АН СССР [10].

В качестве ферментов использовали коммерческие препараты ацетил-ХЭ (АХЭ) эритроцитов крови человека (НФ 3.1.1.7) и бутирил-ХЭ (БХЭ) сыворотки крови лошади (НФ 3.1.1.8) с величиной У. А. 1,2 и 9,6 (Пермский НИИ вакцин и сывороток).

Особь камбодорского кальмара, *Be rytheutis magister* были выловлены в районе Курильских островов («южные»), а также в Олюторо-Наваринском («западные») и Прибылово-Аляскинском («северные») районах Берингова моря. Активность ХЭ в гомогенате (3 мг/мл) ткани зрительных ганглиев определяли модифицированным колориметрическим методом Элмана [11]. Эффективность ингибиторов характеризовали вычислением обобщенной ингибиторной константы $\bar{K}_i$, которая при смешанном типе торможения взаимосвязана с конкурентной (K_i) и бесконкурентной (K'_i) составляющими согласно формуле $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K'_i$. Для определения величин K_i и K'_i измеряли начальные скорости ферментативного гидролиза субстрата при разных его концентрациях, включая равную константе Михаэлиса как в присутствии разных концентраций ингибитора, так и без него. Величины констант ингибирования определяли графически [11] и выражали в виде $p\bar{K}_i = -\lg \bar{K}_i$ и т. д. По соотношению величин pK_i и pK'_i определяли тип торможения: конкурентный ($pK'_i \rightarrow 0$), смешанный ($pK_i > pK'_i$), неконкурентный ($pK'_i = pK_i$).

Результаты и обсуждение

Геометрия ониевой группировки. Катионные группировки силатрановых производных (табл. 1) существенным образом отличаются как по уровню симметрии, так и по общему объему группировки. В 3-, 4- и 5-й графах табл. 1 приведены линейные размеры катионных группировок (R_1 , R_2 , R_3), которые определяли как расстояние от центра ониевого атома вдоль радиусов, проведенных по направлению его валентных связей. Так, для соединения I триметиламмониевая катионная группировка имеет сферическую симметрию, о чем свидетельствует равенство значений $R_1 = R_2 = R_3$. У соединений II—IV катионная группировка имеет неправильную форму: значения R_1 значительно меньше R_2 и R_3 . Увеличение радиуса ониевого атома в представленном ряду, не отражаясь на общей конфигурации катионной группировки, существенным образом увеличивает ее объем (V). Как видно из 6-й графы таблицы, даже при переходе от триметиламмониевой группировки к диметилсульфониевой, несмотря на потерю метильной группы, объем возрастает на 15%.

Обратимость ингибирующего действия. Соединения I—VI оказались обратимыми ингибиторами изученных ХЭ: 1) их эффективность не зависела от времени инкубации с ферментом; 2) степень ингибирующего действия снижалась при разбавлении реакционной смеси. Обе эти характеристики являются необходимыми и достаточными для идентификации обратимого типа торможения.

Таблица 1

Геометрические характеристики ониевых группировок силатрановых производных (расчеты проведены по данным Бокш [12])

Соединения	Ониевая группировка	R_1 , нм	R_2 , нм	R_3 , нм	V , нм ³
I	$N(CH_3)_3$	0.203	0.203	0.203	0.00770
II	$S(CH_3)_2$	0.104	0.237	0.237	0.03889
III	$Se(CH_3)_2$	0.117	0.250	0.250	0.00991
IV	$Te(CH_3)_2$	0.137	0.270	0.270	0.01201

Взаимодействие с АХЭ и БХЭ. Как показано выше, соединения I—IV принадлежат к такому типу обратимых ингибиторов, которые взаимодействуют главным образом с анионным центром (табл. 2). Принято считать, что обратимые ингибиторы выраженной ониевой природы являются более сильными эффекторами АХЭ [1, 9]. В полном соответствии с этим соединения I, III, IV оказались в 10—30 раз, а соединение II—даже в 230 раз более сильными ингибиторами АХЭ, чем БХЭ. Превосходство сульфониевого производного (соединение II) перед аммониевым (соединение I) по отношению к АХЭ можно предположительно связать с переходом от симметричной триметиламмониевой группы к несимметричной диметилсульфониевой группе (табл. 1). Такая асимметрия делает вероятным подход к анионному центру АХЭ на меньшее расстояние, что может повлиять на электростатическую и стерическую характеристики сорбционного процесса. Снижение антиацетилхолинэстеразной эффективности у селениевого (соединение III) и телуриинового (соединение IV) производных, видимо, связано с увеличением объема ониевой группировки (табл. 1).

Сравнение соединений III и VI дает возможность оценить вклад в ингибиторную активность наличия силатрановой группировки. Следует учесть неоднозначность замены силатрановой группы (соединение III) на триэтилсилоксановую (соединение IV). С одной стороны, отсутствие суперэлектроннодонорной группировки должно повысить эффективный заряд ониевой группы, вследствие чего можно ожидать усиления ингибиторных свойств. Но с другой стороны, переход от компактной силатрановой структуры к конформационно гибкой объемной силоксановой группировке сопряжен с существенными стерическими затруднениями. Резкое снижение (более чем в 30 раз) ин-

Таблица 2

Кинетические параметры взаимодействия силатрановых производных с АХЭ
из эритроцитов человека и БХЭ сыворотки крови лошади

Соединения	Ф о р м у л а	АХЭ				БХЭ			
		pK_i	pK_i	pK_i'	тт	pK_i	pK_i	pK_i'	тт
I	$(CH_3)_3N^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	5,04	4,92	4,42	с	4,07	3,51	3,92	н
II	$(CH_3)_2S^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	5,66	5,61	4,24	с	3,29	3,22	2,47	с
III	$(CH_3)_2Se^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	4,90	4,48	3,54	с	3,54	3,54	—	н
IV	$(CH_3)_2Te^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	4,58	4,55	3,41	с	3,10	3,10	—	к
V	$(CH_3)_2CHO \begin{matrix} \backslash \\ p \\ / \end{matrix} \begin{matrix} S \\ SC_2H_4-Si(OCH_2CH_2)_3N \end{matrix}$	4,52	4,15	4,27	н	5,53	5,53	—	к
VI	$(CH_3)_2Se^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	3,47	3,30	2,98	с	3,53	3,53	—	к

Примечание. Типы торможения (тт): конкурентный (к), смешанный (с), неконкурентный (н).

либаторных свойств у соединения VI свидетельствует о приоритете стерического эффекта.

Ранее была описана пространственно ограниченная модель аннионного центра БХЭ [13]. С такой моделью в определенной мере согласуются наши данные по соединениям I—IV. Сорбция конформационно жесткой молекулы опиевого силатранового ингибитора в районе аннионного центра БХЭ пространственно затруднена. Видимо, с этим связана как сравнительно низкая эффективность, так и практическое отсутствие дифференциации от структуры ингибитора (по величинам pK_i). Подтверждением этому служит и тот факт, что раскрытие силатранового бицикла (соединение VI) не дало эффекта, в отличие от АХЭ. Другими словами, некомплементарность силатранового ингибитора по отношению к активной поверхности БХЭ столь существенна, что к этому ничего не добавляет ни превращение силатрана в объемную триэтилсилаксановую группу, ни увеличение объема опиевой группировки. Оказалось, что аммониевое производное (I) несколько активнее остальных: так, по величине K_i соединение I в 5 раз сильнее соединения II и в 10 раз эффективнее соединения IV. Предположительно это связано со способностью $(CH_3)_3N$ -группировки сорбироваться и вне активного центра с периферическими аннионными группировками. Так, в случае АХЭ для соединения I характерен наибольший вклад бесконкурентной составляющей K_i , а по отношению к БХЭ преимущество соединения I перед соединением II по величине K_i было 30-кратным.

Особого внимания заслуживает обратимый тионовый ФОИ (соединение V), который может взаимодействовать с эстеразным центром ХЭ. Видимо, за счет того, что эстеразный центр БХЭ более комплементарен диизопропилфосфатной группировке (известно, что высокоспецифическим ФОИ для БХЭ является диизопропилфторфосфат [1]), соединение V оказалось на порядок более сильным ингибитором БХЭ по сравнению с АХЭ. Если же учитывать только сорбцию в активном центре (по величинам конкурентной составляющей K_i), то различие в чувствительности между ХЭ было 25-кратным. Еще одно объяснение в пользу БХЭ-эффективности соединения V: из-за неспособности силатрана к ионизации соединение V не имеет катионондной группы, и это позволяет сорбироваться вне аннионного центра, а как указывалось выше, именно аннионный центр БХЭ предъявляет особенно высокие требования к комплементарности.

Взаимодействие с ХЭ особей командорского кальмара из разных зон обитания. Исследование субстратно-ингибиторной специфичности ХЭ командорского кальмара выявило своеобразие свойств этого фермента [14] по сравнению с реперными ХЭ—эритроцитной АХЭ и сывороточной БХЭ (табл. 3). Ткань зрительных ганглиев содержала только одну ХЭ [14]. Как по способности к гидролизу тиохолиновых эфиров, так и по чувствительности к достаточно широкому кругу необратимых ФОИ ХЭ особей кальмаров из разных зон обитания не проявили достоверных различий.

Известно, что взаимодействие субстратов и необратимых ФОИ с ХЭ приводит к ацилированию (фосфорилированию) тидроксила серина эстеразного центра ХЭ [1]. Полученные результаты дают основание предположить о сходстве окружения эстеразного центра ХЭ особей кальмаров и предпринять поиски различий с помощью эффекторов анионного центра, то есть ониевых обратимых ингибиторов [2—8]. Как показано выше, эти поиски увенчались успехом: обнаружены специфические ингибиторы ХЭ особей из разных зон обитания [3]. Для продолжения этих поисков силатрановые производные (соединения II—VI) были изучены как обратимые ингибиторы ХЭ зрительных ганглиев «южных», «западных» и «северных» особей командорского кальмара.

Таблица 3

Кинетические параметры взаимодействия силатрановых ингибиторов с ХЭ зрительных ганглиев особей командорского кальмара из разных зон обитания

Соединения	З о н ы о б и т а н и я											
	«южные»				«западные»				«северные»			
	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт
II	3,85	3,60	3,50	н	4,59	4,54	3,61	с	4,21	4,18	3,32	с
III	4,92	4,80	4,31	с	4,45	—	4,45	б	4,20	—	4,20	б
IV	3,42	3,32	2,73	с	3,50	3,41	2,76	с	3,70	3,62	2,85	с
V	4,26	4,05	3,83	с	4,91	4,86	3,89	с	4,03	3,89	3,48	с
VI	2,91	2,88	1,95	с	3,17	3,13	2,11	с	2,50	2,80	2,21	с

Примечание. Типы торможения (тт): смешанный (с), неконкурентный (н), бесконкурентный (б).

Как видно из табл. 3, по чувствительности к ониевым ингибиторам (соединения II—IV) ХЭ кальмара занимала промежуточное положение, уступая АХЭ и превосходя БХЭ. Эффективность тионово-го ФОИ (соединение V) по отношению к ХЭ кальмара была существенно ниже, чем по отношению к БХЭ (в случае ХЭ «северных» это различие было 40-кратным).

Мы обнаружили определенные различия между чувствительностью ХЭ разных особей к ониевым ингибиторам (соединения II—IV): для «южных» — III > II > IV, для «западных» — II > III > IV, для «северных» — II = III > IV.

Таким образом, объем ониевой группировки (табл. 1) не во всех случаях был критерием эффективности. Кроме того, так называемый «силатрановый эффект» (ср. соединения III и VI) был для ХЭ кальмаров достаточно высок (аналогично АХЭ), особенно для ХЭ «южных» особей (в 100 раз). В связи с этим среди изученных ингибиторов выявлена определенная специфичность действия. Так, соедине-

ние II оказалось в 6 раз более сильным ингибитором ХЭ «западных» особей, чем «южных». Соединение III сильнее тормозило активность ХЭ «южных особей», причем здесь отмечалось торможение по смешанному типу, а для других ХЭ—по бесконкурентному типу.

Как отмечалось выше, тионовые обратимые ФОИ взаимодействуют главным образом с эстеразным центром ХЭ [7]. Весомым аргументом в пользу этого положения была одинаковая чувствительность к таким ФОИ у ХЭ особей командорского кальмара из разных зон обитания, в связи с тем, что у этих ХЭ предполагается одинаковое окружение эстеразного центра [7]. Соединение V свидетельствует о неоднозначности такого вывода: его эффективность по отношению к ХЭ «западных» особей была выше, чем к ХЭ других особей. Интересно, что эти различия (близкие к 10-кратным) за счет величины конкурентной составляющей K_i , то есть при взаимодействии непосредственно с активным центром ХЭ. По-видимому, здесь вносит свои коррективы силатрановая группа.

Таким образом, нами предпринято комплексное исследование силатрансодержащих элементоорганических обратимых ингибиторов ХЭ, показана роль ониевой группы с учетом уникальных различий в природе ониевого атома (азот, сера, селен, телур), оценено влияние на антихолинэстеразные свойства суперэлектроннодонорной силатрановой группировки в молекуле ониевых эффектов и тионового ФОИ. Подтверждена гетерогенность свойств ХЭ особей из разных зон обитания, что, видимо, связано с наличием внутривидовых группировок у этого вида командорского кальмара.

REVERSIBLE INHIBITORS OF COMMODORE SQUID OPTICAL GANGLIA CHOLINESTERASE: SILATRAN DERIVATIVES OF ELEMENTORGANIC COMPOUNDS

ROZENGART E. V., KOVALEV N. N., FEDORETZ Yu. A., SHESTAKOVA N. N.,
EPSHTEIN L. M., KHOVANSKIKH A. E.

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

The optical ganglia cholinesterase (CE) of commodore squid (*Berythentis magister*) represented in different zones of Bering sea was found to be inhibited reversibly by a group of new silatronic derivatives. Among the inhibitors investigated were onium compounds with different nature of heteroatom (nitrogen, sulfur, selenium, tellurium) and silatran-containing thionic organophosphorus inhibitor. The relationship between anti-CE properties of studied inhibitors and several geometric parameters of their molecules was shown. The heterogeneity in CE properties of squids representing different living zones was confirmed that possibly is connected with the presence of inter-species groups of commodore squid.

ЛИТЕРАТУРА

1. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. ФАН, Ташкент, 1976.
2. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е. — В сб.: Вопросы эволюционной физиологии, с. 126—127, Л., Наука, 1986.
3. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 23, № 4, с. 548—550, 1987.
4. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е. — В сб.: Технологии гидробионтов, с. 46—54, Владивосток, ТИНРО, 1987.
5. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В. — В сб.: Биологически активные вещества гидробионтов при комплексной утилизации ресурсов океана, с. 27—29, Владивосток, ТИНРО, 1988.
6. Розенгарт Е. В., Виняр Т. Н., Ковалев Н. Н., Хованских А. Е. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 24, № 5, с. 679—685, 1988.
7. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Гафуров М. Б., Далимов Д. Н., Абдувахобов А. А. Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, с. 926—929, 1988.
8. Розенгарт Е. В. — В сб.: Физиология морских животных, с. 77. Мурманск, Апатиты, 1989.
9. Long J. Handbuch exp. Pharmacol., B. 15, S. 374—427, 1963.
10. Розенгарт Е. В., Ковалев Н. Н., Хованских А. Е., Сорокин М. С., Воронков М. Г. Хим. фармацевт. журн., № 2, с. 170—172, 1989.
11. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Биохимия, т. 46, с. 1042—1048, 1981.
12. Бокий Г. Б. Кристаллохимия, с. 136—141, М., Химия, 1971.
13. Розенгарт Е. В., Жоров Б. С. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 25, № 2, с. 189—194, 1989.
14. Бресткин А. П., Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Федорец Ю. А., Эпштейн Л. М. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 264—270, 1986.

Поступила 25. XII. 1990