



УДК 577.152.311.1.042:

МЕТИЛСУЛЬФОМЕТИЛАТЫ О-АЛКИЛ-S-(β -ЭТИЛМЕРКАПТО-
ЭТИЛ) МЕТИЛТИОФОСФОНАТОВ КАК ЭФФЕКТОРЫ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

АБДУВАХАБОВ А. А., *ГРИГОРЬЕВА Г. М., ТИЛЯБАЕВ З.

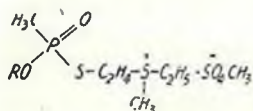
Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент

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

Холинэстераза (ХЭ) играет важную роль в передаче нервных импульсов в холинергических синапсах позвоночных и беспозвоночных животных, где химическим медиатором является АХ [1]. ХЭ различного происхождения обладают рядом таких общих признаков и свойств, как способность катализировать гидролиз холиновых эфиров, взаимодействовать с тетраалкиламмониевыми ионами, а также угнетаться фосфорорганическими соединениями (ФОС) и карбаматами [2]. Выделены два основных типа ХЭ—АХ-ацетилгидролаза (К.Ф. 3.1.1.7) и ацилхолингидролаза (К.Ф. 3.1.1.8). Однако в настоящее время найдены разновидности ХЭ, которые отличаются от ферментов двух названных типов [3—5]. Наиболее вероятной причиной различий в свойствах ХЭ являются отличия в деталях структуры их активного центра. Удобными инструментами для исследования структуры активного центра ХЭ являются их специфические ингибиторы. Среди них особое место занимают ФОС. Для проявления максимальной эффективности ФОС необходимо структурное соответствие между гидрофобными участками каталитического центра и гидрофобными радикалами эффера. В результате анализа антиферментной активности ФОС с планомерно изменяющимся строением молекулы можно получить данные об отличительных особенностях структуры активного центра различных ХЭ. Такой подход к изучению ХЭ известен в литературе как метод ингибиторного анализа [6]. Этот метод особенно важен для сравнительных исследований, поскольку использование специфических ФОС в качестве эфферов дает возможность изучать недостаточно очищенные ферменты, а в ряде случаев и гомогенаты тканей.

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей структуры активного центра ХЭ нервной ткани беспозвоночных (моллюски и

насекомые) и неизученные ранее ХЭ позвоночных с помощью метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов с общей формулой:



где R—алкильный радикал $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ изменяется от 1 до 7.

Источником бутилхолинэстеразы (БуХЭ) служила нервная ткань зрительных ганглий головного кальмара *Todarodes sagittatus* L.

Пропионилхолинэстераза (ПрХЭ) была получена из нервной ткани (окологлоточные ганглии) брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* [3]. Кроме того, использовали ХЭ нервных ганглиев саранчи *Locusta migratoria migratorioides* L. и американского таракана *Periplaneta americana* L. (гомогенаты), АХЭ электрического органа ската *Torpedo marmorata* (гомогенат) и частично очищенный препарат АХЭ эритроцитов крови человека производства Пермского НИИ вакцин и сывороток.

Метилсульфометилаты О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов синтезированы по ранее описанной методике [7]. Антихолинэстеразную активность ФОС оценивали по величине бимолекулярной константы (k_2) скорости ингибирования ХЭ, которую определяли графически [8], исходя из уравнения:

$$k_2 = \frac{2.3}{[I]} \times \lg \frac{V_0}{V_t},$$

где: V_0 —исходная активность ХЭ; V_t —остаточная активность после инкубации фермента с раствором ФОС в течение 1 мин. [I]—использованная концентрация раствора ФОС. Активность АХЭ эритроцитов человека, электрического органа ската, БуХЭ и ПрХЭ определяли методом потенциометрического титрования [9] при pH 7.5 и температуре 25°. В качестве субстратов использовали йодиды АХ («Хемапол», ЧССР), бутилхолина, пропионилхолина («Реахим», СССР). Активность ХЭ насекомых измеряли методом Ellman и соавт. [10], используя ацетилтихолин йодид («Хемапол», ЧССР) в качестве субстрата и 5,5'-дитиобис-2-нитробензойную кислоту («Koch Light Laboratories», Англия) в качестве хромогена. Реакционная среда имела pH 7.5 и температуру 25°.

Исследования ФОС, как видно из их структуры, содержат сульфонируемую серу в отщепляемой части молекулы и алкильные радикалы различной протяженности у атома фосфора. Катионсодержащая часть таких ФОС взаимодействует с анионным участком активного центра ХЭ и определенным образом ориентирует молекулу ингибитора по отношению к эстеразному участку. При этом алкильные радикалы атома фосфора сорбируются на гидрофобных областях эстеразного участка. Зависимость ан-

тихолинэстеразного действия ФОС от размера их алкильных радикалов позволяет судить о размерах гидрофобных областей эстеразного участка ХЭ. Ранее было проведено исследование гидрофобных областей анионного и эстеразного участка типичных ХЭ, главным образом, позвоночных животных [11—13].

Результаты исследования зависимости антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов от протяженности алкильного радикала R в фосфорильной части молекулы представлены на рисунке.

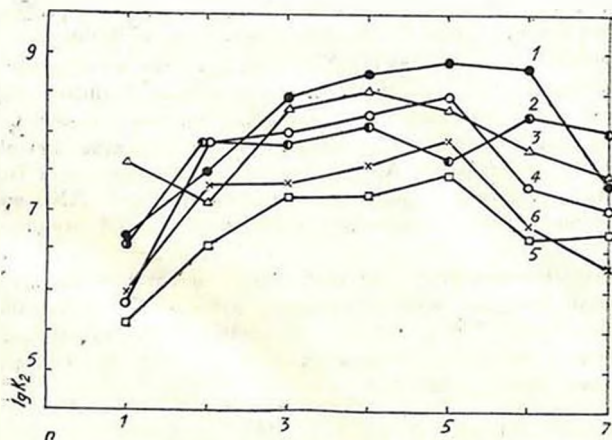


Рис. Зависимость антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов (k_2) от числа (n) углеродных атомов в О-алкильном радикале для ПрХЭ брюхоногого моллюска (1), БуХЭ кальмара (2), АХЭ электрического органа ската (3), АХЭ эритроцитов крови человека (4), ХЭ саранчи (5), ХЭ таракана (6)

Наиболее высокие величины k_2 получены для ПрХЭ брюхоногого моллюска. Величины k_2 существенно меняются с изменением длины R: с увеличением R до определенного предела наблюдается возрастание k_2 . Наиболее высокие величины k_2 с различными ХЭ получены для ФОС с О-бутильным (АХЭ ската, ХЭ таракана), с О-пентильным (АХЭ эритроцитов человека, ПрХЭ, ХЭ саранчи) и О-гексильным радикалами (БуХЭ кальмара). При этом для разных ХЭ с увеличением длины, а следовательно, и гидрофобности R наблюдается различное усиление антихолинэстеразного действия ФОС. Так, при переходе от О-метильного радикала к О-бутильному величина k_2 возрастает для АХЭ ската примерно в 7 раз, для БуХЭ кальмара—в 30 раз, а для ХЭ таракана—в 70 раз. Для другого ряда ферментов, где максимум активности ФОС наблюдается при R, равным C_5H_{11} , удлинение радикала от метильного до пентильного приводит к росту k_2 для ХЭ саранчи в 70 раз, для ПрХЭ брю-

хоногого моллюска в 170 раз, а для АХЭ эритроцитов человека в 500 раз. После вышеуказанных максимальных значений k_2 антихолинэстеразное действие, как правило, снижается при увеличении R. Это свидетельствует о том, что гидрофобная область в активном центре ХЭ, с которой взаимодействует R, прерывается, а длина радикала, для которого наблюдается максимальная величина k_2 , соответствует протяженности гидрофобной области.

После некоторого спада величины k_2 для БуХЭ кальмара и ФОС с пентильным радикалом наблюдается заметное повышение антихолинэстеразного действия ФОС с гексильным радикалом (рисунок).

Таким образом, возрастание числа метиленовых группировок в алкоксильном радикале фосфорильной части ФОС приводит к усилению сорбции этого радикала на соответствующих гидрофобных областях эстеразного участка исследованных ХЭ за счет гидрофобного взаимодействия.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о том, что исследованные ХЭ имеют различное гидрофобное окружение эстерофильной группировки в эстеразном участке. Для АХЭ ската и ХЭ таракана гидрофобная область в эстеразном участке пространственно соответствует бутильному радикалу. У ХЭ саранчи, ПрХЭ брюхоногого моллюска и АХЭ эритроцитов человека эта гидрофобная область соответствует протяженности пентильного, а у БуХЭ кальмара—гексильного радикала, как и у ранее исследованной типичной БуХЭ сыворотки крови лошади [14]. У БуХЭ кальмара, как и у БуХЭ сыворотки, в районе эстеразного участка имеется, по-видимому, гидрофильная группировка, которая разделяет гидрофобную область эстеразного участка на две части, при этом ближайшая из них к эстерофильной группировке соответствует протяженности бутильного радикала, как гидрофобная область в эстеразном участке АХЭ электрического органа ската и АХЭ бычьих эритроцитов [15].

На основании результатов исследования антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β -этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов с возрастающей протяженностью нормального алкильного радикала можно заключить, что ХЭ из разных источников имеют различия, а в ряде случаев некоторое сходство в структуре гидрофобных областей эстеразного участка. Обнаруженные различия в структуре гидрофобных областей активного центра, вероятно, определяют разную субстратную специфичность ХЭ.

METHYLSULFOMETHYLATES OF O-ALKYL-S-(BETA-ETHYLMERCAPTOETHYL) METHYLTHIOPHOSPHONATES AS EFFECTORS FOR STUDYING CHOLINESTERASES OF DIFFERENT ORIGIN

A. A. ABDUVAKHABOV, G. M. GRIGOR'EVA*, and Z. TILYABAEV

Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbek Academy of Sciences, Tashkent
and *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad

The anticholinesterase effect of several organophosphorus compounds (OPC) having general formula $\text{CH}_3(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{SCH}_2(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ has been examined (R is the hydrocarbon radical from CH_3 to C_7H_{13}) using cholinesterases (ChEs) from the nerve tissue of mollusks, fish and insects. The inhibitory efficiency of OPC, expressed in terms of the second order rate constant (k_2), increases with the increase in the length of R. The dependence of k_2 on R for the investigated ChEs was nonidentical, it is associated with differences in the structure of hydrophobic sites of the esterase onto which the alkyl radicals of OPC are adsorbed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уиттекер В. П.—В кн.: Сравнительная фармакология синаптических рецепторов. Труды международного симпозиума, 1975, г., с. 15—26, Л., 1977.
2. Brestkin A. P., Brick I. L., Grigorjeva G. M.—In: International Encyclopedia of pharmacology and Therapeutics, Sect. 85, v. 1, p. 241—344, Pergamon Press, New York—London, 1973.
3. Григорьева Г. М. Биохимия, т. 45, № 12, с. 2176—2188, 1980.
4. Григорьева Г. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 18, № 2, с. 205—206, 1982.
5. Григорьева Г. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 23, № 4, с. 433—440, 1987.
6. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент, Фан, 1976.
7. Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Мазаланик Л. Г., Матрющкова Т. А., Михельсон М. Я., Рожкова Е. К., Фруентов Н. К., Яковлев В. А. Вогр. мед. химии, № 7, с. 250—258, 1961.
8. Бресткин А. П., Брик И. А., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалиев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. Докл. АН СССР, т. 200, с. 103—106, 1971.
9. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М., Наука, 1965.
10. Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., v. 7, p. 88—95, 1961.
11. Пархоменко Т. В. Автореферат канд. дисс. Л., 1972.
12. Пархоменко Т. В. Реакционная способность органич. соединений, т. 8, вып. 3, с. 653—661, 1971.
13. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Эпштейн Л. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 7, № 5, с. 474—477, 1971.
14. Кабачник М. И., Абдувахобов А. А., Атабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкович Р. В. Успехи химии, т. 39, вып. 6, с. 1050—1072, 1970.
15. Абдувахобов А. А. Автореферат канд. дисс. М., 1968.

Поступила 4. V 1988