

Н. Е. Басова, Б. Н. Кормилицын, А. Ю. Перчёнок, Е. В. Розенгарт,
В. С. Сааков, А. А. Суворов

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ ОНИЕВОВОГО АТОМА НА АКТИВНОСТЬ ТЕТРАМЕТИЛЕНБИСОНИЕВЫХ ОБРАТИМЫХ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Россия, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44.

Для изучения влияния природы ониевого атома на антихолинэстеразную активность исследованы элементоорганические производные тетраметилен-бис-ониевых соединений в качестве обратимых ингибиторов разных холинэстераз (ХЭ) — ацетил-ХЭ эритроцитов человека, бутирил-ХЭ сыворотки крови лошади, ХЭ мозга травяной лягушки *Rana temporaria*, ХЭ зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* и ХЭ зрительных ганглиев особой командорского кальмара *Berryteuthis magister* из разных зон обитания в северо-западной акватории Тихого океана. Бис-фосфониевые ингибиторы оказались существенно более сильными эффекторами, чем бис-аммониевые соединения, что, правда, может быть связано и со значительным увеличением размеров и гидрофобности ониевого группировки. Бис-аммониевое кремнийорганическое соединение и его моноаммониевый аналог оказались одинаковыми по активности обратимыми ингибиторами ХЭ млекопитающих. Также выраженным антихолинэстеразным действием по отношению к ХЭ млекопитающих обладало впервые изученное бис(фенилийодониевое) производное, для которого характерно существенное увеличение степени гидрофобности за счет введения атомов фтора в тетраметиленовую меж-ониевую цепь.

Ключевые слова: холинэстеразы; обратимые ингибиторы; бисаммониевые соединения.

Бис-аммониевые соединения давно известны в качестве холинэргически активных соединений — блокаторов никотинового холинорецептора и обратимых ингибиторов холинэстераз (ХЭ) [1–5]. Важным средством для блокады передачи через симпатические и парасимпатические ганглии является шестизвенный бис-аммониевый препарат — гексаметоний [1]. Обратимые ингибиторы ХЭ стали использовать в качестве активаторов когнитивных функций при болезни Альцгеймера [6]. Под руководством Б. С. Жорова нами с помощью метода молекулярной механики [7, 8] были проведены исследования конформационно-функциональных взаимодействий для ряда бис-аммониевых производных при их реакции с ХЭ разного происхождения [4, 5, 8–10]. Варьирование строения эффекторов шло по пути изменения жесткости и состава меж-ониевой цепи, когда в качестве “реперного” соединения выбран гексаметилен(триметиламмоний) (гексаметоний) [10], а также увеличения размеров и конфигурации аммониевой группировки [8, 9].

В настоящей работе “реперным” соединением послужил тетраметилен-бис(триметиламмоний) (I) с достаточно жесткой структурой, т.к. 85 % его энергетически разрешенных конформеров имели полностью вытянутую *транс-транс*-конфигурацию [7, 8]. Остальные изученные бис-ониевые соединения также содержали 4 звена в меж-ониевой цепи. Представляло несомненный интерес проанализировать влияние на антихолинэстеразную активность самой природы ониевого атома в бис-ониевой структуре обратимых ингибиторов. С этой целью впервые были изучены бис-фосфониевые и бис-иодониевые эффекторы. Для изучения специфичности действия этой группы обра-

тимых ингибиторов исследован ряд препаратов ХЭ позвоночных и беспозвоночных.

Экспериментальная часть

В качестве ингибиторов ХЭ были протестированы:
(CH₃)₃N⁺(CH₂)₄N⁺(CH₃)₃ · 2I⁻ (I) [11];
(CH₃)₃N⁺CH₂Si(CH₃)₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃ · 2I⁻ (II) [12];
CH₃(C₆H₅)₂P⁺(CH₂)₄P⁺(C₆H₅)₂CH₃ · 2I⁻ (III) [13];
(C₆H₅)₃P⁺(CH₂)₄P⁺(C₆H₅)₃ · 2I⁻ (IV) [13];
C₆H₅I⁺(CF₂)₄I⁺C₆H₅ · 2BF₄⁻ (V) [14]; N⁺(CH₃)₄ · I⁻ (VI) (“Merk”); P⁺(C₆H₅)₃CH₃ · Br⁻ (VII) [13]; P⁺(C₆H₅)₄ · Br⁻ (VIII) [13]; (CH₃)₃N⁺CH₂Si(CH₃)₃ · I⁻ (IX) [11]; (CH₃)₃N⁺CH₂Si(CH₃)₂CH₂CH₂Si(CH₃)₃ · I⁻ (X) [12].

В качестве ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) использован водорастворимый препарат, полученный из эритроцитов крови человека на Заводе медицинских препаратов (Пермь) с удельной активностью по АХ 1,2 мкмоль/мин · мг. В качестве бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8) использован очищенный препарат фермента из сыворотки крови лошади (Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва) с удельной активностью по АХ 9,6 мкмоль/мин · мг. Для сохранения нативности ферментативной активности препаратов ХЭ использовались водные гомогенаты ткани мозга травяной лягушки *Rana temporaria* (45 мг/мл) [11] и тканей зрительного ганглия (3 мг/мл) особой тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus*, выловленных в Японском море [4], а также особой командорского кальмара *Berryteuthis magister* из разных зон обитания: Прибылово-Аляскинский район Берингова моря (56–58° с.ш. 171–177° з.д.) (зона 1), Олюторо-Наваринский район Берингова моря (60–61° с.ш. 173–179° в.д.)

(зона 2), район Центральных Курильских островов (47° с.ш. 152° в.д.) (зона 3) [5]. Каталитическую активность ферментов с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолиниодида (“Chemapol”) определяли при 25 °С и рН 7,5 колориметрическим методом [1, 11].

Об эффективности обратимых ингибиторов судили по величине 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 величины начальной скорости ферментативной реакции в широком интервале концентраций ацетилтиохолина, включая равную величине константы Михаэлиса, в отсутствие и в присутствии разных концентраций ингибитора. Величины ингибиторных констант (средние величины из 5 – 6 определений, статистическая обработка с использованием *t*-критерия Стьюдента, $p < 0,05$) вычисляли графически [9] 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 ($pK_i = pK'_i$) и бесконкурентный ($pK_i \rightarrow 0$) [11].

Результаты и их обсуждение

Все исследованные соединения (табл. 1 и 2) оказались обратимыми ингибиторами изученных ХЭ: 1) их эффективность не зависела от времени инкубации с ферментами; 2) степень ингибирующего действия существенно снижалась при разбавлении реакционной смеси. Обе эти характеристики являются необходимыми и достаточными критериями для идентификации обратимого характера торможения [1].

На основании анализа данных, представленных в табл. 1 и 2, можно сделать ряд заключений. Во-первых, сделана попытка оценить, как сказывается на антихолинэстеразной активности бис-ониевых ингибиторов изменение самой природы ониевого атома. Сложность такого анализа связана с тем, что у изученных нами соединений существенно различается структура ониевой группировки: геометрические размеры, степень симметричности алкил-арильного окружения, гидрофобность. Так I и II содержат триметилламмониевые группы, III — дифенилметилфосфониевую, IV — трифенилфосфониевую, V — фенилиодониевую. Переход от триметиламмониевого (I) к дифенилметилфосфониевому соединению (III) повысил эффективность по отношению к эритроцитарной АХЭ

Таблица 1

Антихолинэстеразная эффективность бис-ониевых соединений

Соединение	Структура ингибитора. Источник фермента	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	ТТ
I	(CH ₃) ₃ N ⁺ (CH ₂) ₄ N ⁺ (CH ₃) ₃ · 2Г ⁻				
	АХЭ эритроцитов человека	2,85	2,85	—	К
	БХЭ сыворотки лошади	3,44	3,44	—	К
	ХЭ мозга лягушки <i>R. temporaria</i>	2,38	2,38	—	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>T. pacificus</i>	2,38	2,38	—	К
II	(CH ₃) ₃ N ⁺ CH ₂ Si(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ · 2Г ⁻				
	АХЭ эритроцитов человека	3,71	3,68	2,46	С
	БХЭ сыворотки лошади	4,73	4,68	3,80	С
	ХЭ мозга лягушки <i>R. temporaria</i>	3,23	3,23	—	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>T. pacificus</i>	3,32	3,32	—	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	2,92	2,82	2,21	С
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	2,82	2,82	—	К
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	3,22	3,22	—	К	
III	CH ₃ (C ₆ H ₅) ₂ P ⁺ (CH ₂) ₄ P ⁺ (C ₆ H ₅) ₂ CH ₃ · 2Г ⁻				
	АХЭ эритроцитов человека	4,79	4,71	3,99	С
	БХЭ сыворотки лошади	5,00	5,00	—	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	4,94	4,84	4,25	С
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	4,50	3,76	4,41	Н
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	4,54	4,54	—	К	
IV	(C ₆ H ₅) ₃ P ⁺ (CH ₂) ₄ P ⁺ (C ₆ H ₅) ₃ · 2Г ⁻				
	АХЭ эритроцитов человека	5,80	5,75	4,85	С
	БХЭ сыворотки лошади	6,82	6,77	5,85	С
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	4,75	4,60	4,23	Н
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	4,50	4,42	3,71	С
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	4,12	—	4,12	Б	
V	C ₆ H ₅ I ⁺ (CF ₂) ₄ I ⁺ C ₆ H ₅ · 2BF ₄ ⁻				
	АХЭ эритроцитов человека	5,51	5,38	4,92	С
	БХЭ сыворотки лошади	5,18	4,96	4,75	Н

Здесь и в табл. 2: $p\bar{K}_i$, pK_i , pK'_i — отрицательный логарифм обобщенной, конкурентной и бесконкурентной ингибиторной константы; ТТ — тип торможения: К — конкурентный, С — смешанный, Н — неконкурентный, Б — бесконкурентный.

и сывороточной БХЭ, соответственно, почти на 2 порядка и в 35 раз. А дальнейшее увеличение размера оиевой группировки (трифенилфосфониевое соединение IV) привело к повышению чувствительности ХЭ млекопитающих еще в 10 – 65 раз. Следует отметить, что по антибутирилхолинэстеразной активности соединение IV ($pK_i = 6,82$) превосходит все другие изученные соединения. Существенно возросла антиферментная активность у фенилйодониевого соединения V по сравнению с I. Можно предположить, что наличие более планарной фенилйодониевой группировки вместо триметиламмониевого “шарика” является причиной возрастания антихолинэстеразного эффекта. Известно, что введение фенильного радикала в триметиламмониевую группу холина привело к увеличению ингибирующего действия по отношению к АХЭ и БХЭ в 65 и 15 раз, соответственно [15]. И еще одним существенным вкладом в возрастание ингибиторных свойств йодониевого соединения V может служить увеличение гидрофобности молекулы за счет перфторметиленовой меж-оиевой цепи [14]. Следует отметить, что фенилйодониевая группировка несколько изменила тип тормозящего действия: так для аммониевых (I и II) и фосфониевых (III и IV) соединений ингибирование протекало по конкурентно-смешанному механизму, а для йодониевого соединения V — по смешанно-неконкурентному. Во-вторых, с помощью 2

пар моно- и бис-фосфониевых ингибиторов (VII и VIII, III и IV) можно в определенной мере оценить влияние на антихолинэстеразную активность размеров (а, следовательно, и степени гидрофобности) оиевой группировки. Для бис-фосфониевых производных (III и IV), как уже было отмечено выше, замена метильного радикала на фенильный сопровождалась существенным (в 10 – 65 раз) возрастанием антиферментной активности по отношению к ХЭ млекопитающих. Чувствительность ХЭ командорского кальмара из разных зон обитания при этом менялась незначительно. Для монофосфониевых соединений VII и VIII такое изменение структуры не сказалось на количественной стороне антиферментного действия, а привело к перемене типа торможения от смешанного в случае обеих ХЭ к неконкурентному для АХЭ и к конкурентному для БХЭ. В-третьих, сравнение соединений I и II позволило оценить вклад степени гидрофобности меж-оиевой цепи (за счет замены метиленовой группы на существенно более гидрофобную диметилсилановую группировку) в проявление антихолинэстеразного действия. Как и следовало ожидать, по аналогии со сходными ингибиторами [1, 4, 5] чувствительность изученных ХЭ при этом возросла, причем для АХЭ, ХЭ лягушки и ХЭ тихоокеанского кальмара это увеличение было десятикратным, а в случае БХЭ — 20-кратным. В-четвертых, представляло интерес срав-

Таблица 2

Антихолинэстеразная эффективность монооиевых соединений

Соединение	Структура ингибитора. Источник фермента	$\overline{pK_i}$	pK_i	pK'_i	ТТ
VI	$N^+(CH_3)_4 \cdot I^-$				
	АХЭ эритроцитов человека	3,52	3,39	2,00	С
	БХЭ сыворотки лошади	2,50	2,50	–	К
	ХЭ мозга лягушки <i>R. temporaria</i>	3,05	3,05	–	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>T. pacificus</i>	2,24	2,24	–	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	2,20	2,20	–	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	2,23	2,13	1,38	С
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	2,42	2,22	1,80	С	
VII	$P^+(C_6H_5)_3CH_3 \cdot Br^-$				
	АХЭ эритроцитов человека	4,51	4,40	3,82	С
БХЭ сыворотки лошади	5,19	5,14	4,17	С	
VIII	$P^+(C_6H_5)_4 \cdot Br^-$				
	АХЭ эритроцитов человека	4,44	4,22	4,04	Н
	БХЭ сыворотки лошади	5,31	5,31	–	К
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	3,99	3,75	3,62	Н
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	3,98	3,92	3,10	С
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	3,86	3,77	3,14	С	
IX	$(CH_3)_3N^+CH_2Si(CH_3)_3 \cdot I^-$				
	АХЭ эритроцитов человека	3,39	3,39	–	К
	БХЭ сыворотки лошади	4,06	3,82	3,70	С
	ХЭ мозга лягушки <i>R. temporaria</i>	3,44	3,44	–	К
ХЭ ганглиев кальмара <i>T. pacificus</i>	3,30	3,30	–	К	
X	$(CH_3)_3N^+CH_2Si(CH_3)_2CH_2CH_2Si(CH_3)_3 \cdot I^-$				
	АХЭ эритроцитов человека	3,71	3,68	2,46	С
	БХЭ сыворотки лошади	4,76	4,68	3,80	С
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 1	2,89	2,80	2,16	С
	ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 2	2,82	2,75	2,00	С
ХЭ ганглиев кальмара <i>B. magister</i> , зона 3	3,22	3,20	2,20	С	

нение антихолинэстеразной активности моно- и бис-ониевых соединений. Неожиданно оказалось, что тетраметиламмоний (VI) 5-кратно превосходил по ингибиторной активности бис-ониевое соединение I в отношении эритроцитарной АХЭ и ХЭ мозга лягушки. Предположительно это можно объяснить “жесткой” структурой I, которая вряд ли может быть комплементарна активному центру АХЭ [1]. В случае же БХЭ, наоборот, отмечено 10-кратное преимущество бис-аммониевого ингибитора I, что можно связать с большей пространственной “свободой” каталитической поверхности БХЭ. По отношению к ХЭ тихоокеанского кальмара VI и I оказались практически равноэффективно слабыми ингибиторами. В случае кремнийорганической пары IX и II некоторое преимущество бис-аммониевого ингибитора II отмечено только относительно сывороточной БХЭ. А вот бис(трифенилфосфониевое) соединение IV превосходило тетрафенилфосфоний (VIII) по эффективности в отношении к ХЭ млекопитающих в 25 – 30 раз, в то время как трифенилметилфосфоний (VII) и его бис-ониевый аналог (III) были практически равноэффективны. Чувствительность ХЭ командорского кальмара из разных зон обитания к бис-фосфониевому соединению IV была лишь незначительно выше, чем к монофосфониевому VIII. И, наконец, в-пятых, показалось интересным сопоставление бисаммониевого кремнийорганического соединения II с его моноониевым аналогом (X), у которого вторая гидрофильная триметиламмониевая группа заменена на практически изоструктурную ей гидрофобную триметилсилановую группировку. При таком сравнении мы как бы исключаем из молекулы ингибитора 1 заряд при сохранении структуры эффектора. Оба соединения оказались совершенно идентичными (как по активности, так и по характеру тормозящего действия) обратимыми ингибиторами ХЭ млекопитающих.

В заключение можно сказать несколько слов о специфичности действия изученных соединений. Во-первых, для бис-ониевых производных, имеющих четырехзвенную межониевую цепь, характерна определенная специфичность к сывороточной БХЭ по сравнению с эритроцитарной АХЭ (исключение составило бис(фенилиодониевое) соединение V). Во-вторых, в

большинстве случаев чувствительность ХЭ млекопитающих была выше, чем ХЭ других животных; особенно значительным (в 10 – 500 раз) это преимущество в чувствительности ХЭ млекопитающих отмечалось для IV. В-третьих, изученные бис-ониевые соединения II, III и IV в отличие от некоторых ранее изученных обратимых ингибиторов [1, 5] практически не проявили специфичности действия по отношению к ХЭ командорского кальмара *B. magister* из разных зон обитания в северо-западной акватории Тихого океана. Тем самым предложена новая группа специфических ингибиторов ХЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. N. Moralev and E. V. Rozengart, *Comparative Enzymology of Cholinesterases, International University Lines*, La Jolla, Ca. (2007).
2. J. P. Long, *Handbuch Experim. Pharmacol.*, **15**, 374 – 427 (1963).
3. Е. В. Розенгарт, Н. Е. Басова, *ДАН*, **395**, 699 – 703 (2004).
4. Е. В. Розенгарт, Н. Е. Басова, *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **46**, 3 – 16 (2010).
5. Е. В. Розенгарт, Н. Е. Басова, *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **46**, 359 – 369 (2010).
6. E. V. Rozengart, N. E. Basova, S. N. Moralev, et al., *Chem.-Biol. Interact.*, **203**(1), 3 – 9 (2013).
7. Е. В. Розенгарт, Б. С. Жоров, *ДАН СССР*, **273**, 505 – 508 (1983).
8. Е. В. Розенгарт, Б. С. Жоров, А. Е. Хованских и др., *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **30**, 168 – 186 (1994).
9. Е. В. Розенгарт, А. А. Суворов, А. Е. Хованских и др., *Хим.-фарм. журн.*, **30**(8), 20 – 21 (1996); *Pharm. Chem. J.*, **30**(8), 510 – 512 (1996).
10. Е. В. Розенгарт, Н. Н. Шестакова, С. О. Прокатор, Н. Е. Басова, *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **31**, 387 – 395 (1995).
11. А. П. Бресткин, Т. Н. Виняр, Е. В. Розенгарт, *Укр. биохим. ж.*, **55**, 77 – 79 (1983).
12. А. П. Бресткин, Т. Н. Виняр, Е. В. Розенгарт и др., *Нейрохимия*, **2**, 212 – 216 (1983).
13. А. П. Бресткин, В. С. Бровко, Е. В. Розенгарт и др., *Ж. эвол. биохим. и физиол.*, **22**, 123 – 126 (1986).
14. А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт, Л. М. Ягупольский и др., *ДАН СССР*, **275**, 1425 – 1428 (1984).
15. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Н. Е. Теплов, *Биохимия*, **33**, 1059 – 1068 (1968).

Поступила 04.04.14

TETRAMETHYLENEBISONIUM REVERSIBLE INHIBITORS OF CHOLINESTERASES WITH VARIOUS STRUCTURES OF ONIUM GROUP

N. E. Basova, B. N. Kormilitsyn, A. Yu. Perchenok, E. V. Rozengart*, V. S. Saakov, and A. A. Suvorov

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia;

* e-mail: roz@jephb.ru

In order to determine the influence of the onium atom nature on the anticholinesterase activity of organoelement compounds, tetramethylembisonium derivatives have been studied as reversible inhibitors of cholinesterase (ChE) on samples of acetyl-ChE from human erythrocytes, butyryl-ChE from horse serum, ChE from *Rana temporaria* frog brain, and ChEs from visual ganglia of Pacific squid *Todarodes pacificus* and Commander island squid *Beryteuthis magister* from different habitats in the north-western Pacific Ocean. Bisphosphonium inhibitors turned out to be significantly more potent effectors than bisammonium ones, but this could also be associated with a significantly greater size and hydrophobicity of onium groups in the former case. Bisammonium organosilicon compound and its monoammonium analog were equally active as reversible ChE inhibitors in mammals. Bis(phenyliodonium) derivative, characterized by significantly increased degree of hydrophobicity due to the introduction of fluorine atoms in the inter-onium tetramethylene chain, which has been studied for the first time, also exhibited marked anticholinesterase effects with respect to mammal ChE.

Keywords: cholinesterases; reversible inhibitors; bisammonium compounds.