

УДК 577.154

О. В. СевастьяновФизико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина**КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА НОВЫХ
СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ 3-ГИДРОКСИ-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНА С
ПОМОЩЬЮ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ**

Исследованы особенности кинетики гидролиза новых сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она с помощью выделенной методом низкоскоростной седиментации в присутствии Ca^{2+} микросомальной фракции печени свиньи. Показано полное ингибирование эстеразной активности микросомальной фракции печени свиньи селективным ингибитором карбоксилэстеразы – ди-(*n*-нитрофенил)-фосфатом, что является доказательством участия этого фермента в гидролизе исследуемых субстратов. Установлена нелинейность зависимости максимальной скорости гидролиза V_{\max} и константы Михаэлиса K_m 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов от длины ацильного фрагмента в 3 положении, а также снижение V_{\max} при введении заместителей в первое положение молекулы.

Ключевые слова: гидролиз, кинетика, сложные эфиры, 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-оны, микросомальная фракция, печень свиньи

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1.) – сериновые α, β -гидролазы, катализирующие гидролиз сложноэфирной и амидной связей в молекулах различной структуры [1].

Благодаря широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности карбоксилэстеразы являются перспективными биокатализаторами энантиоселективного гидролиза и синтеза обширного ряда ациклических, карбоциклических и гетероциклических соединений [2].

Перспективно использование энзима для исследования *in vitro* метаболизма и активации лекарственных [3], наркотических веществ [1] и пролекарств [4,5] в том числе сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она – потенциальных анксиолитических и снотворных средств [6].

Карбоксилэстераза обладает рядом положительных свойств: отсутствием кофермента и суицидальной инактивации, однако недостатками ее применения являются нестабильность и высокая стоимость коммерческого препарата. Поэтому актуальным для исследования особенностей метаболизма сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она является применение более доступного частично очищенного ферментного препарата и карбоксилэстеразы в составе микросомальной фракции печени свиньи.

Целью данной работы было изучение кинетических особенностей гидролиза 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов с помощью микросомальной фракции печени свиньи.

Экспериментальная часть

В работе использовали микросомальную фракцию печени свиньи, выделенную методом низкоскоростной седиментации в присутствии ионов Ca^{2+} [7].

В выделенной микросомальной фракции определяли содержание белка по методу Лоури в модификации Хартри [8], отношение фосфолипид/ белок [9], РНК/ белок [7], эстеразную активность по нафтилацетату [10].

В качестве объектов исследования были выбраны соединения **1-9** (табл. 1), синтезированные под руководством академика НАН Украины Андронати С. А. к. х. н., с. н. с Павловским В. И. и вед. инженером Семенишиной Е. А. [11].

Кинетику реакции гидролиза с использованием МФ определяли по начальным скоростям накопления продукта реакции (соответствующей карбоновой кислоты), спектрофотометрически [12].

В колбы вносили по 4,5 см³ раствора сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, приготовленного на 80 % водном растворе ДМСО, для получения конечных концентраций: 1,25·10⁻⁴, 2,5·10⁻⁴, 5·10⁻⁴; 7,5·10⁻⁴ и 1,0·10⁻³ моль/дм³ добавляли по 3,6 см³ раствора КСl (рН 6,8).

Колбы инкубировали в течение 1 мин при перемешивании при 37°С, затем добавляли 0,9 см³ суспензии микросомальной фракции. Через 5 мин реакцию останавливали 3 см³ 0,8 % спиртового раствора сульфаниламида. Содержимое колб центрифугировали (10 мин, 6000 об/мин), прибавляли по 1,5 см³ 1,6 % водного раствора NaNO₂. Встряхивали и через 3 мин добавляли по 1,5 см³ спиртового 1,5 % раствора 1-нафтиламина. Тщательно взбалтывали, инкубировали 5 мин на водяной бане при 70 °С; охлаждали до комнатной температуры и фотометрировали на приборе СФ-46 в кювете с длиной хода луча 3 см при λ = 475 нм.

Калибровочные зависимости строили по продуктам реакции – карбоновым кислотам. На основании полученных данных методом Хейнса находили значения K_м и V_{макс}.

Результаты и их обсуждение

Для исследования кинетических особенностей гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, катализируемого микросомальной фракцией печени свиньи, были использованы соединения **1-9** (табл. 1)

Таблица 1

Производные 3-гидрокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она 1-12

№	R ¹	R ²	R ³	№	R ¹	R ²	R ³
1	H	CH ₃	H	7	H	C ₇ H ₁₅	H
2	H	C ₂ H ₅	H	8	H	CH ₃	CH ₃
3	H	C ₃ H ₇	H	9	H	CH ₃	C ₂ H ₅
4	H	C ₄ H ₉	H	10	H	-	H
5	H	C ₅ H ₁₁	H	11	H	-	CH ₃
6	H	C ₆ H ₁₃	H	12	H	-	C ₂ H ₅

Из печени свиньи методом низкоскоростной седиментации в присутствии ионов Ca²⁺ выделена микросомальная фракция, основные характеристики которой представлены в табл. 2.

Таблица 2
Характеристики выделенной микросомальной фракции печени свиньи

Характеристики		Результаты
Выход белка, мг/г ткани		38,0±1,5
Отношение РНК/белок		0,024
Отношение фосфолипид/белок		1,158
Удельная активность	Эстеразная активность (по 1-нафтилацетату), мкмоль/мг белка в мин.	17,25±0,6
	Амидазная активность (по ацетанилиду), нмоль/мг белка в мин	2,23±0,12

Ранее нами было показано, что в результате гидролиза ряда сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью выделенной микросомальной фракции образуются соответствующие 3-гидрокси-производные (**10-12**) (рис. 1), структура которых подтверждена методами ТСХ и масс-спектрометрии [11].

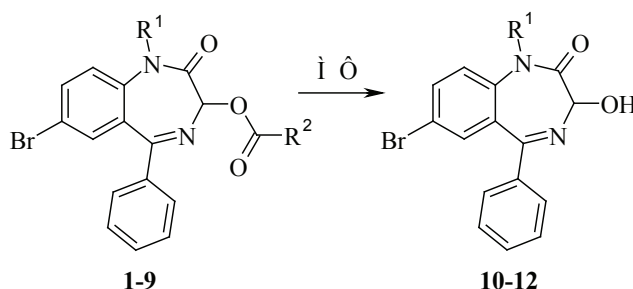


Рис. 1 Ферментативный гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бензодиазепин-2-она

Для доказательства того, что в гидролизе сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она не принимают участия другие ферменты микросомальной фракции, исследовано ингибирование ее эстеразной активности селективным ингибитором карбоксилэстеразы ди-(*n*-нитрофенил)-фосфатом (рис. 2).

Показано количественное ингибирование ферментативной активности микросомальной фракции печени свиньи в присутствии ингибитора в концентрации 147,06 мкмоль/дм³.

Поскольку известно, что структура субстрата может влиять на степень его трансформации карбоксилэстеразой [2], исследовано влияние заместителей в молекуле сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бензодиазепин-2-она на их биоконверсию с помощью микросомальной фракции печени свиньи.

С этой целью изучили кинетические характеристики гидролиза 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бензодиазепин-2-онов **1-9** с помощью микросомальной фракции.

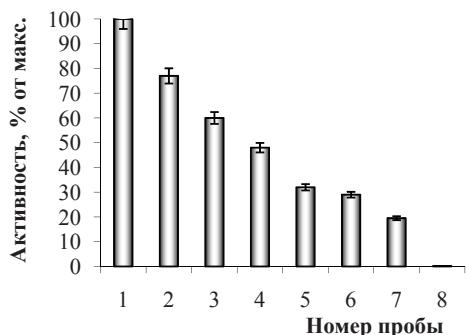
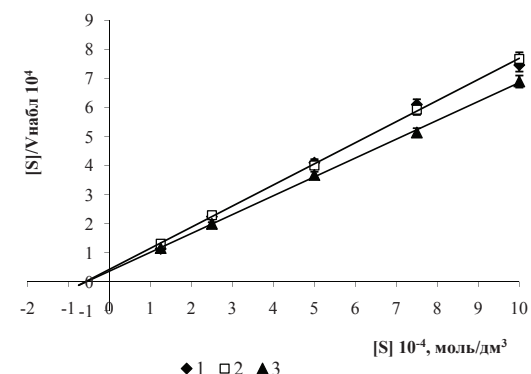
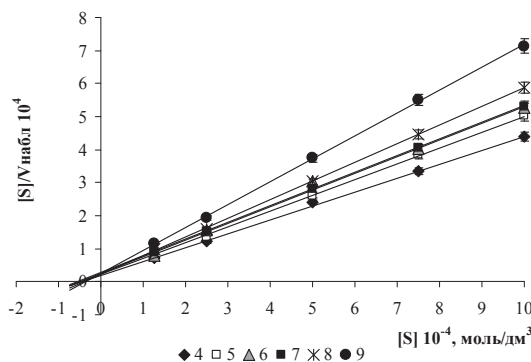


Рис. 2. Влияние концентрации бис-(*p*-нитрофенил)-фосфата на эстеразную активность МФ: 1 – без ингибитора, 2 – 0,03 мкмоль/дм³, 3 – 0,6 мкмоль/дм³, 4 – 2,9 мкмоль/дм³, 5 – 8,82 мкмоль/дм³, 6 – 20,6 мкмоль/дм³, 7 – 38,2 мкмоль/дм³, 8 – 147,06 мкмоль/дм³.

Нами проведен анализ кинетики начальных скоростей гидролиза 1-9 с помощью микросомальной фракции (рис. 3 а,б). Рассчитаны максимальная скорость реакции гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она с помощью микросомальной фракции $V_{\text{макс}}$ и константа Михаэлиса K (табл. 3).



а



б

Рис. 3. График Хейнса для определения кинетических параметров гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она 1-9 с помощью микросомальной фракции: а – при наличии заместителя в 1 положении молекулы; б – при изменении длины ацильного фрагмента в 3 положении.

Установлено, что введение заместителя в 1 положение бенздиазепаинового цикла приводит к уменьшению максимальной скорости реакции; с увеличением длины алкильного фрагмента в 1 положении максимальная скорость реакции снижается незначительно.

Таблица 3

**Кинетические параметры гидролиза сложных эфиров
3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она**

Субстрат	K_m , моль/дм ³ · 10 ⁻⁶	V_{max} , моль/мг белка · мин · 10 ⁻⁹
1	55,31	15,38
2	46,86	23,74
3	50,82	20,95
4	56,87	19,44
5	50,51	19,80
6	38,97	17,71
7	39,14	14,47
8	58,08	13,92
9	50,31	13,67

Из таблицы 4 видно, что зависимость максимальной скорости гидролиза от длины ацильного фрагмента в 3 положении носит нелинейный характер. Так, с максимальной скоростью гидролизуются 3-пропионилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-он (**2**), тогда как соединение **1** с меньшей длиной углеводородной цепи в 3 положении и **3-7** – с большей длиной – гидролизуются с меньшей скоростью. Показано, что зависимость K_m от структуры субстратов также нелинейна.

Нелинейный характер зависимости может объясняться одновременным влиянием 2 факторов – липофильности веществ и стерическими ограничениями встраивания субстратов в активный центр карбоксилэстеразы [3], вызываемыми увеличением длины ацильного фрагмента молекулы.

Таким образом, исследованы кинетические особенности гидролиза ряда сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она с помощью микросомальной фракции печени свиньи. Установлена нелинейность зависимости максимальной скорости гидролиза и константы Михаэлиса 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов от длины ацильного фрагмента в 3 положении, а также снижение V_{max} при введении заместителей в первое положение молекулы.

Литература

1. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrug // *Molecules*. – 2008. - Vol. 13, № 2. – P. 412-431.
2. Zhu L. M. Applications of pig liver esterases (PLE) in asymmetric synthesis // *Tetrahedron*. – 1990. – V.46, № 19. – P. 6587-6611.
3. Redinbo M. R Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochem. Soc. Transac.* – 2003. – V. 31, № 1. – P. 620-624.
4. Wadkins R., Morton C., Danks M. Structural constraints affect the metabolism of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy- camptothecin (CPT-11) by carboxylesterases // *Mol. Pharmacol.* – 2001. – V. 60, № 2. – P. 355-362.
5. Satoh T., Hosakawa M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1998. – V. 38, № 2. – P. 257-288.
6. Olkkola K. T., Ahonen J. Midazolam and other benzodiazepines // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2008. – V. 13, № 2. – P. 412-431.
7. L. S. Eriksson. Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1978. – V. 508, № 1. – P. 155-164.
8. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* – 1972. – Vol. 48, № 1. – P. 422-427.
9. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. – 322 с.
10. Balls A. K., Wood H. N. Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // *J. Biol. Chem.* – 1956. - V.219, № 1. – P. 245-256.
11. Андронаті С. А., Шестеренко Е. А., Севастьянов О. В., Романовская И. И., Семенішина Е. А., Павловский В. И. Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи // *Вісник ОНУ, Сер. Хімія.* - 2008. - Т.13, № 11. - С. 37-45.
12. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. – 280 с.

Стаття надійшла до редакції 11.04.2012

О. В. Севастьянов

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна

КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГІДРОЛІЗУ НОВИХ ЕСТЕРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСОМАЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ СВИНІ

Резюме

Досліджено особливості кінетики гідролізу нових естерів 3-гидрокси-1,4-бенздиазепін-2-ону за допомогою виділеної методом низькошвидкісної седиментації в присутності Ca^{2+} микросомальної фракції печінки свині. Показано повне інгібування естеразної активності микросомальної фракції печінки свині селективним інгібітором карбоксилестерази – ді-(*n*-нітрофеніл)-фосфатом, що є доказом участі цього ферменту в гідролізі досліджуваних субстратів. Встановлено нелінійність залежності максимальної швидкості гідролізу V_{\max} і константи Міхаеліса K_m від довжини ацильного фрагмента в 3 положенні, а також зниження V_{\max} при введенні замісників в перше положення молекули.

Ключові слова: гідроліз, кінетика, естери, 3-гидрокси-1,4-бенздиазепін-2-они, микросомальна фракція, печінка свині

O. V. Sevastyanov

A. V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine, Lyustdorskaya dor. 86, Odessa, 65080, Ukraine

KINETIC FEATURES OF HYDROLYSIS OF 3-HYDROXY-1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONE ESTERS WITH A HELP OF PIG LIVER MICROSOMAL FRACTION

Summary

The kinetic features of new 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-ones esters hydrolysis with a help of pig liver microsomal fraction, isolated using the low-speed sedimentation method in the presence of Ca^{2+} -ions, were studied. The total inhibition of porcine microsomal fraction esterase activity by carboxylesterase selective inhibitor – bis-(*p*-nitrophenyl) phosphate was shown, which is an evidence of such an enzyme involvement in studied substrates hydrolysis. The nonlinearity of maximal rate, V_{max} , and Michaelis constant, K_M , of 3-acyloxy-5-phenyl-1,2-dihydro-3*H*-1,4-benzodiazepin-2-ones hydrolysis dependence from acyl moiety length in the 3 position, and also V_{max} lowering due to substitutes introduction in the first position of molecule, was established.

Key words: hydrolysis, kinetics, esters, 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-ones, microsomal fraction, pig liver.