

ИНГИБИТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЖИВОТНЫХ В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ СУБСТРАТОВ

Н. Е. БАСОВА, Б. Н. КОРМИЛИЦЫН, А. Ю. ПЕРЧЁНОК,
Е. В. РОЗЕНГАРТ, В. С. СААКОВ, А. А. СУВОРОВ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург, Россия;
e-mail: roz@iephb.ru*

*С целью поиска потенциальных холинергически активных соединений и для исследования роли кулоновского взаимодействия в холинэстеразном катализе была изучена специально синтезированная группа производных бензимидазола, обладающих различной степенью делокализации положительно-го заряда в катионной группировке молекулы. Синтезированные соединения оказались обратимыми ингибиторами холинэстераз (ХЭ) эритроцитов человека, сыворотки крови лошади, мозга лягушки *Rana temporaria* и зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* в присутствии ацетилтиохолин йодида и пропионилтиохолин йодида в качестве субстратов. Выявлены различия в характере обратимого ингибиторного действия и обнаружено специфическое для каждого из исследованных энзимов влияние структуры ингибитора и природы субстрата на характер процесса обратимого ингибирования.*

Ключевые слова: холинэстеразы животных, бензимидазольные обратимые ингибиторы, субстраты.

Специфичность действия энзимов зависит от ряда факторов. Важнейшим для холинэстераз (ХЭ) [ацетилхолин–ацетилгидролаза (3.1.1.7) и ацилхолин–ацилгидролаза (3.1.1.8)] является структура лигандов [1–3]. В молекуле природного субстрата ХЭ – ацетилхолина – можно выделить два основных структурных блока: мишень действия ХЭ – сложнэфирную группировку и определяющую специфическую сорбцию триметиламмониевую группу [1, 3]. Благодаря триметиламмониевой группе молекула ацетилхолина является своеобразным гидрофобным катионом, у которого основной дефицит электронов («положительный заряд») локализован на атоме азота (+0,686 ед. [1]) и только частично распределён по сфере, образуемой атомами водорода триметильного окружения [1]. Иная алкильная (и только она, т.е. без ароматических и других π–связей) архитектура аммониевой группировки не вносит каких-либо существенных корректив в распределение электронной плотности в катионной части молекул лигандов ХЭ [1, 2]. Согласно со-

временным представлениям такая структура обеспечивает большую скорость прохождения молекулы эффектора в полости активного центра ХЭ [2, 4]. Неизвестно как поведут себя эффекторы ХЭ, в ониевой группировке молекулы которых заряд в разной степени делокализован. Для выяснения влияния делокализации заряда впервые в качестве лигандов ХЭ различного происхождения исследованы азотсодержащие гетероциклы, конденсированные с бензольным кольцом и несущие положительный заряд: соли бензимидазола с различными заместителями в имидазольной и бензольной частях молекулы [5]. Для сравнения был изучен их структурный аналог йодид бензимидазола, который из-за отсутствия ароматической имидазольной системы имел катион с локализованным зарядом. В дополнение к этому исследовали группу других азотсодержащих ониевых производных, которые можно также причислить к соединениям с локализованным катионом [5, 6].

Показано, что влияние структуры субстрата на процесс обратимого торможения ХЭ под

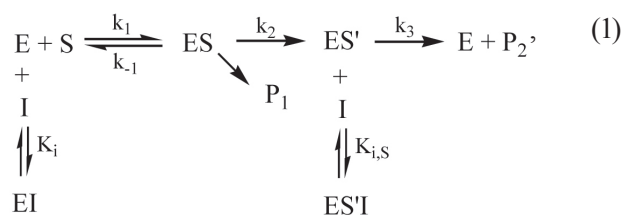
действием ониевых ингибиторов является одним из аспектов субстратной специфичности [7]. Оказалось, что в присутствии различных субстратов у ХЭ разных животных ингибиторная эффективность менялась не только количественно по величинам ингибиторных констант, но и качественно по типу тормозящего действия.

Изучен характер торможения активности различных ХЭ ониевыми ингибиторами с зарядом разной степени локализации в присутствии разных субстратов.

Материалы и методы

В качестве источников энзимов использовали очищенные препараты ацетил-ХЭ эритроцитов человека (АХЭ, ацетилхолин-ацетилгидролаза 3.1.1.7) и бутирил-ХЭ сыворотки крови лошади (БХЭ, ацилхолин-ацилгидролаза 3.1.1.8) с удельной активностью 1,2 и 9,6 ед. акт./мг соответственно, (Пермский НИИ вакцин и сывороток, РФ) [1], а также водные гомогенаты мозга лягушки *Rana temporaria* (45 мг/мл) [8] и зрительного ганглия тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* (3 мг/мл) [9]. В качестве субстратов использованы ацетилтиохолин йодид и пропионилтиохолин йодид (Chemapol, Чехия). Каталитическую активность энзимов определяли при 25 °С и рН 7,5 колориметрическим методом Элмана [10]. В качестве обратимых ингибиторов (табл. 1) были исследованы гетероциклические амины, конденсированные с бензольным кольцом и несущие положительный заряд – соли бензимидазола (I–V) и бензимидазолинийодид (VI) [11, 12]. Кроме того были тестированы коммерческие препараты (Merk, Германия) – тетраметиламмоний (VII) и тетраэтиламмоний (VIII), а также азотсодержащие неароматические насыщенные гетероциклические производные пиперазина (IX, X), пиперидина (XI), лупинина (XII, XIII) и декагидрохиноксалина (XIV), синтезированные в лабораториях Н. В. Хромова-Борисова (Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, РФ) [13] и А. А. Абдувахובה (Институт биоорганической химии им. А. С. Садыкова, г. Ташкент, Узбекистан) [14].

По общепринятому представлению [1, 2] обратимый ингибитор (I) ХЭ может взаимодействовать не только со свободным активным центром энзима (E), но и с ацилированным производным (ES') согласно схеме (1):



где ES – сорбционный энзимсубстратный комплекс Михаэлиса, EI и ES'I – сорбционные энзимингибиторный и ацилэнзимингибиторный комплексы, K_i и $K_{i,S}$ – константы взаимодействия с ингибитором свободного энзима и ацилэнзима. Скорость (v_i) холинэстеразного гидролиза субстратов (S) в присутствии обратимого ингибитора I выражается уравнением:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K_M \cdot (1 + [I]/K_i) + [S] \cdot (1 + [I]/K_i')}, \quad (2)$$

где V – максимальная скорость реакции; K_M – константа Михаэлиса; K_i и K_i' – конкурентная и бесконкурентная ингибиторные константы, причем $K_i' = K_{i,S} \cdot (k_2 + k_3)/k_2$ (с учетом схемы (1)). При $[S] = K_M$ уравнение (2) принимает вид:

$$v_i = \frac{V}{2 + [I] \cdot (1/K_i + 1/K_i')} = \frac{V}{2 + [I]/\bar{K}_i}, \quad (3)$$

где $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K_i'$. Обобщенная ингибиторная константа \bar{K}_i предложена А. П. Бресткиным [1, 8] для сравнительной оценки антиэнзимной эффективности обратимых ингибиторов, проявляющих разный тип торможения. Если $[S] = K_M$, то $V = 2v_0$ (v_0 – скорость холинэстеразного гидролиза субстрата в отсутствие обратимого ингибитора) и уравнение (3) после несложных преобразований принимает вид: $\bar{K}_i = [I]/2 \cdot [(v_0/v_i) - 1]$. Необходимые для расчета значения v_0 и v_i определяются из зависимости $1/v$ от $1/[S]$. Таким образом, оказалось возможным количественно сопоставлять обратимые ингибиторы с различным типом тормозящего действия и одновременно оценивать вклад конкурентной и бесконкурентной составляющих [1, 2, 8].

Об эффективности обратимых ингибиторов судили по величинам обобщенной ингибиторной константы \bar{K}_i и ее конкурентной (K_i) и бесконкурентной (K_i') составляющих (средние величины из 5–6 определений) [1, 2, 8]. Величины ингибиторных констант вычисляли графически [1] и выражали в виде $pK_i = -\lg K_i$ 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 ($pK_i \rightarrow 0$) [1, 8].

Результаты и обсуждение

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

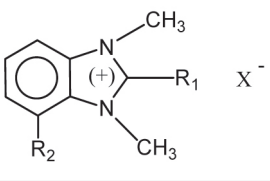
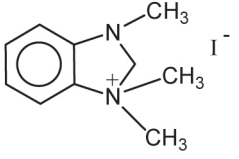
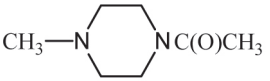
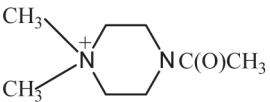
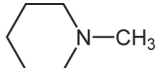

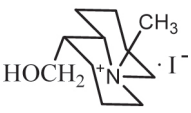
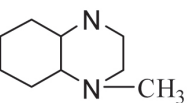
В табл. 1 наряду с бензимидазольными производными (I–VI) с разной степенью делокализации катиона представлена группа различных по структуре аммониевых соединений с локализованным положительным зарядом. Это тетраметил- (VII) и тетраэтиламмоний (VIII) – симметричные гидрофобные катионы, у которых основной положительный заряд локализован на азоте (+0,686 и +0,679 соответственно и лишь частично «распределён» по тетраалкильной сфере [1]), а также азотсодержащие неароматические насыщенные гетероциклические производные пиперазина (IX, X), пиперидина (XI), лупинина (XII, XIII) и декагидрохиноксалина (XIV). Следует учесть, что третичные эффекторы (IX, XI, XII, XIV) в нейтральной среде полностью протонированы [15]. Отсутствие сопряженной ароматической структуры дает основание рассматривать эти соединения в качестве носителей локализованного положительного заряда. Кроме того, скрининг таких азотсодержащих гетероциклических производных дает возможность провести структурный анализ ингибиторных свойств бензимидазольных эффекторов (I–VI). Наиболее близким к аммониевым ионам с локализованными катионами является йодид бензимидазола (VI), содержащий неароматический имидазолиновый цикл.

И только для солей бензимидазола (I–V) характерна делокализация положительного заряда по всей ароматической бензимидазольной части молекулы, хотя, главным образом, он сосредоточен в имидазольном цикле. Оценить степень делокализации заряда в каждом из перечисленных соединений затруднительно. Можно с известной долей вероятности предположить, что делокализация тем больше, чем меньше электро-

фильность катиона. Известно, что катионы 1,3-диметилбензимидазола (III) и 1,2,3-триметилбензимидазола (IV) обладают незначительной электрофильностью [11, 12]. Электронодонорные свойства аминогруппы должны приводить к уменьшению электрофильности катиона V по сравнению с III. С другой стороны такой катион как II, содержащий фенил в положении 2, более электрофилен, чем III. Это подтверждается сопоставлением потенциалов полуволны полярографического восстановления перхлоратов II ($E_{1/2} = -1,76$) и III ($E_{1/2} = -1,84$) [12]. Вследствие этого следует ожидать, что катион I, в бензольном кольце которого находится сильная электроноакцепторная нитрогруппа, будет еще более электрофилен. Таким образом, в группе производных бензимидазола (I–V) степень локализации положительного заряда в молекуле должна снижаться в ряду: I > II > III, IV > V. Следует учесть, что сопоставление производных бензимидазола с йодидом бензимидазола (VI) затруднено из-за неароматичности имидазольного цикла и отсутствия сопряженной бензимидазольной системы [11, 12].

При анализе данных табл. 1 можно заключить, что только в случае АХЭ уменьшение антиэнзимной эффективности в ряду I > II > III, IV > V симбатно снижению степени делокализации положительного заряда в молекуле ингибитора. Причем подобное снижение наблюдается как для интегрированной величины эффективности, оцениваемой по обобщенной ингибиторной константе pK_i (табл. 1), так и в случае сравнения величин бесконкурентной ингибиторной константы pK_i' . Такая зависимость антиацетилхолинэстеразной эффективности от степени делокализации хорошо согласуется с современными представлениями о механизме обратимого торможения АХЭ [1, 2]. Рентгеноструктурные исследования кристаллов комплексов АХЭ с обратимыми органическими ингибиторами показали, что аммониевые группы молекул ингибитора действительно попадают в полость активного центра, причем располагаются именно в районе остатка Trp⁸⁴ [2–4]. Известно, что остаток Trp⁸⁴ входит в состав Ω -петли из 27 аминокислот, сшитой S–S связями и выстилающей одну из сторон полости активного центра [4]. Катионсодержащие эффекторы с делокализованным зарядом могут быть более эффективны за счет большей скорости прохождения их молекулы по такой

Таблиця 1. Кинетические параметры процесса взаимодействия изученных ингибиторов с ацетилхолинэстеразой эритроцитов человека (АХЭ) и бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади (БХЭ)

№ соед.	Ингибиторы	АХЭ				БХЭ			
		$p\bar{K}_i$	pK_i	pK_i'	ТТ	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK_i'	ТТ
									
I	$R_1 = H; R_2 = NO_2; X = I^-$	5,55	–	5,55	Б	4,08	–	4,08	Б
II	$R_1 = C_6H_5; R_2 = H; X = ClO_4^-$	4,85	–	4,85	Б	4,66	–	4,66	Б
III	$R_1 = R_2 = H; X = ClO_4^-$	4,49	4,28	4,10	Н	4,26	4,01	3,89	Н
IV	$R_1 = CH_3; R_2 = H; X = ClO_4^-$	4,48	–	4,48	Б	5,17	–	5,17	Б
V	$R_1 = H; R_2 = NH_2; X = I^-$	4,05	–	4,05	Б	4,64	–	4,64	Б
VI		4,85	4,57	4,55	Н	3,72	3,60	3,52	Н
VII	$N+(CH_3)_4$	3,58	3,32	1,90	С	2,45	2,45	–	К
VIII	$N+(C_2H_5)_4$	3,40	3,12	2,05	С	2,72	2,72	–	К
IX		2,38	2,25	1,74	С	2,55	2,55	–	К
X		2,53	2,53	-	К	2,52	2,52	-	К
XI		4,02	3,24	3,92	Н	3,75	3,68	2,90	С
XII		3,31	3,25	2,43	С	3,73	3,70	2,52	С
XIII		3,97	3,53	3,78	Н	3,13	3,02	2,48	С
XIV		4,69	4,66	3,47	С	3,67	-	3,67	Б

Примечания. $p\bar{K}_i$, pK_i , pK_i' – отрицательный десятичный логарифм обобщенной ингибиторной константы и ее конкурентной и бесконкурентной составляющих; ТТ – тип торможения: К – конкурентный; С – смешанный; Н – неконкурентный, Б – бесконкурентный (то же в табл. 2 и 3).

выstelке каталитической поверхности энзима [2–4]. В некотором противоречии с этой концепцией находится неконкурентно-бесконкурентный тип ингибирования бензимидазольных производных. По отношению к БХЭ подобная зависимость практически отсутствует. Можно, однако, отметить определенное преимущественное влияние сопряженной ароматической бензимидазольной структуры ингибиторов (I–V) по сравнению с несопряженной (VI). Введение в молекулу ингибитора еще одной арильной группировки (II) существенно не сказывается на его антибутирилхолинэстеразной эффективности. И еще одна аномалия: неожиданно высокая эффективность метильного производного (IV), который является на порядок более сильным ингибитором БХЭ, чем нитробензимидазолий (I).

Установлено, все бензимидазольные производные (I–VI) существенно более сильные ингибиторы АХЭ и БХЭ по сравнению с другими азотсодержащими гетероциклами. Это связано с большей площадью молекулы: так, структурно похожие VI и XIV были практически равноэффективны как в случае АХЭ, так и в случае БХЭ, будучи неконкурентно-бесконкурентными ингибиторами этих энзимов. Интересно отметить, что ингибиторы с локализованным зарядом проявляют, как правило, конкурентно-смешанный тип торможения в отличие от неконкурентно-бесконкурентного ингибирования бензимидазольными производными с делокализованным зарядом (I–V). И еще одна особенность, как и

следовало ожидать [1, 2], все ингибиторы с локализованным тетраалкиламмониевым катионом (VII, VIII, X, XIII, XIV) являются более сильными ингибиторами АХЭ, чем БХЭ. Этому же правилу подчиняется и йодид бензимидазола (VI).

В табл. 2 приведены данные по антихолинэстеразной эффективности соединений с делокализованным зарядом (I–V) и катионсодержащих ингибиторов (VI–X) по отношению к энзимам мозга травяной лягушки *R. temporaria* [8] и зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара *T. pacificus* [9]. Во-первых, чувствительность обеих ХЭ к ингибиторам с делокализованным положительным зарядом (I–V) ниже, чем у АХЭ и БХЭ (см. табл. 1), причем, если в большинстве случаев это различие является 4–5-кратным, то I в 35–40 раз сильнее тормозит АХЭ, а чувствительность БХЭ к IV выше в 30 раз. Во-вторых, подобно БХЭ эффективность I–V не изменялась симбатно снижению степени локализации в ряду $I > II > III$, $IV > V$ (в отличие от АХЭ, где подобная корреляция наблюдается: см. табл. 1). В-третьих, эффекторы с делокализованным положительным зарядом (I–V) ингибируют активность ХЭ лягушки и кальмара по смешанному типу, в то время как эти соединения являются неконкурентно-бесконкурентными ингибиторами ХЭ млекопитающих. Таким образом, исследованные бензимидазольные производные (I–VI) проявляют себя как практически равноэффективные ингибиторы обеих тестируемых ХЭ земноводного и моллюска, причем чувстви-

Таблица 2. Кинетические параметры обратимых ингибиторов (формулы в табл. 1, с. 50) по отношению к холинэстеразам лягушки и кальмара (субстрат – ацетилхолин)

Холинэстеразы:	Параметры	Ингибиторы									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
мозга лягушки	\bar{pK}_i	4,20	4,19	3,96	3,70	4,08	4,04	3,05	3,00	2,43	2,35
	pK_i	4,14	4,17	3,72	3,48	4,00	3,72	3,05	3,00	2,43	2,35
	pK'_i	3,32	2,82	2,52	2,25	2,30	2,74	–	–	–	–
	ТТ	С	С	С	С	С	С	С	К	К	К
зрительных ганглий тихоокеанского кальмара	\bar{pK}_i	3,96	4,24	3,89	3,74	3,68	3,62	2,24	2,60	2,15	2,85
	pK_i	3,92	4,21	3,85	3,70	3,66	3,59	2,24	2,60	1,66	2,55
	pK'_i	2,89	3,15	2,80	2,77	2,59	2,36	–	–	1,96	1,54
	ТТ	С	С	С	С	С	С	С	К	К	Н

Таблица 3. Ингибирование холинэстераз разного происхождения под действием некоторых обратимых ингибиторов (формулы см. в табл. 1, с. 50) в присутствии ацетилтиохолина (АТХ) и пропионилтиохолина (ПТХ)

Энзимы	Субстраты	Параметры	Ингибиторы									
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
АХЭ эритроцитов человека	АТХ	$p\bar{K}_i$	5,55	4,85	4,49	4,48	4,05	4,85	3,58	3,40	2,38	2,53
		pK_i	–	–	4,28	–	–	4,57	3,32	3,12	2,25	2,53
		pK'_i	5,55	4,85	4,10	4,48	4,05	4,55	1,90	2,05	1,74	–
		ТТ	Б	Б	Н	Б	Б	Н	С	С	С	К
	ПТХ	$p\bar{K}_i$	4,95	4,15	4,01	3,88	3,60	4,23	3,38	3,20	2,08	2,35
		pK_i	–	–	3,77	–	–	3,81	3,12	3,06	1,97	2,16
		pK'_i	4,95	4,15	3,90	3,88	3,60	4,05	2,10	2,15	1,90	1,65
		ТТ	Б	Б	Н	Б	Б	Н	С	С	Н	С
БХЭ сыворотки крови лошади	АТХ	$p\bar{K}_i$	4,08	4,66	4,26	5,17	4,64	3,72	2,45	2,72	2,55	2,52
		pK_i	–	–	4,01	–	–	3,60	2,45	2,72	2,55	2,52
		pK'_i	4,08	4,66	3,89	5,17	4,64	3,12	–	–	–	–
		ТТ	Б	Б	Н	Б	Б	С	К	К	К	К
	ПТХ	$p\bar{K}_i$	3,43	4,02	3,66	4,60	3,94	3,11	2,20	2,51	2,14	2,33
		pK_i	–	–	3,22	–	–	3,00	2,20	2,51	2,00	2,21
		pK'_i	3,43	4,02	3,54	4,60	3,94	2,92	–	–	1,54	1,60
		ТТ	Б	Б	Н	Б	Б	Н	К	К	С	С
ХЭ тихоокеанского кальмара	АТХ	$p\bar{K}_i$	3,96	4,24	3,89	3,74	3,68	3,62	2,24	2,60	2,15	2,85
		pK_i	3,92	4,21	3,85	3,70	3,66	3,59	2,24	2,60	1,66	2,55
		pK'_i	2,89	3,15	2,80	2,77	2,59	2,36	–	–	1,96	1,54
		ТТ	С	С	С	С	С	С	К	К	Н	С
	ПТХ	$p\bar{K}_i$	3,80	3,55	3,39	3,33	3,17	3,51	2,13	2,35	2,00	2,60
		pK_i	3,70	3,47	3,25	3,26	3,06	3,43	2,08	2,17	–	2,43
		pK'_i	3,68	3,45	3,21	3,20	3,00	3,40	1,40	1,65	2,00	2,38
		ТТ	Н	Н	Н	Н	Н	Н	С	С	Б	Н

тельность к ним существенно ниже, чем у ХЭ млекопитающих, и механизм этого процесса отличается.

Процесс обратимого торможения ХЭ протекает в присутствии субстрата, а значит, как мы уже отмечали [7], зависит от его структуры.

Это побудило нас изучить ряд соединений с де-локализованным и локализованным зарядом в качестве ингибиторов энзиматического гидролиза под действием холинэстераз разных животных не только ацетилтиохолина (АТХ), но и пропионилтиохолина (ПТХ) (табл. 3). Переход к

более гидрофобному субстрату сопровождается, во-первых, повсеместным, хотя и небольшим, снижением эффективности ингибиторов. Во-вторых, увеличивается вклад бесконкурентной составляющей обобщенной ингибиторной константы (возрастает величина rK_i') и, тем самым, в ряде случаев изменяется тип ингибирования. ХЭ ганглиев тихоокеанского кальмара обладает специфическими свойствами. Ее чувствительность к ингибиторам с делокализованным зарядом (I–V) в присутствии АТХ в несколько раз ниже, чем у ХЭ млекопитающих и, подобно БХЭ, практически не зависит от степени делокализации заряда в молекуле ингибитора. А вот переход к ПТХ дал неожиданные результаты: в ряду соединений I–V отмечается уменьшение антиэнзиматической эффективности, которое симбатно снижению степени локализации положительного заряда в молекуле ингибитора I > II > III, IV > V. В то же время в присутствии ПТХ ХЭ кальмара ведет себя подобно АХЭ, т.е. использование другого субстрата не только количественно, но и качественно изменяет характер зависимости. Следует учесть уникальность этого ряда ингибиторов: с изменением структуры меняется степень электростатического взаимодействия с активной поверхностью энзима. Это позволяет трактовать полученные данные с позиций теории Кошленда о влиянии субстрата на конформацию активного центра энзима [16].

Таким образом, изучение специально синтезированной группы производных бензимидазола, обладающих различной степенью делокализации положительного заряда в молекуле, в качестве ингибиторов ХЭ млекопитающих, земноводного и моллюска выявило, с одной стороны, четкие различия в характере обратимого антиэнзимного тормозящего действия, а, с другой, – впервые обнаружено специфическое для

каждой из исследованных ХЭ влияние структуры ингибитора и природы субстрата на характер процесса обратимого ингибирования энзимов различных животных.

ІНГІБІТОРНА ДІЯ ПОХІДНИХ БЕНЗИМІДАЗОЛУ НА ХОЛІНЕСТЕРАЗИ ТВАРИН У ПРИСУТНОСТІ РІЗНИХ СУБСТРАТІВ

*Н. Е. Басова, Б. Н. Кормилицин,
А. Ю. Перченко, Е. В. Розенгарт,
В. С. Сааков, А. А. Суворов*

Інститут еволюційної фізіології та біохімії
ім. І. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Росія;
e-mail: roz@iephb.ru

З метою пошуку потенційних холінергічно активних сполук і для дослідження ролі кулонівської взаємодії в холінергічному каталізі було вивчено спеціально синтезовану групу похідних бензимидазолу, що виявляють різний ступінь делокалізації позитивного заряду в катіонному угрупованні молекули. Ці сполуки виявилися оборотними інгібіторами холінергічних еритроцитів людини, сироватки крові коня, мозку жаби *Rana temporaria* і зорового ганглія тихоокеанського кальмара *Todarodes pacificus* у присутності як субстратів ацетилтіохолін йодиду і пропіонілтіохолін йодиду. Виявлено чіткі відмінності в характері оборотної інгібіторної дії і специфічний для кожного з досліджених ензимів, вплив структури інгібітора і природи субстрату на характер процесу оборотного інгібування.

Ключові слова: холінергічні тварин, бензимидазолні оборотні інгібітори, субстрати.

**INHIBITORY EFFECT OF
BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES ON
CHOLINESTERASES OF ANIMALS
IN THE PRESENCE OF DIFFERENT
SUBSTRATES**

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

Sechenov Institute of Evolutionary
Physiology and Biochemistry, Russian
Academy of Science, Saint-Petersburg;
e-mail: roz@iephb.ru

Specifically synthesized group of benzimidazole derivatives possessing varying degrees of delocalization of the positive charge in the cation group of the molecule has been studied in order to search for potential cholinergically active compounds and to study the role of the Coulomb interaction in cholinesterase catalysis. These compounds were reversible inhibitors of cholinesterase (ChE) of human erythrocytes, horse serum, brain of the frog *Rana temporaria* and visual ganglia of the Pacific squid *Todarodes pacificus* in the presence of acetylthiocholine iodide and propionylthiocholine iodide as substrates. The differences in the nature of reversible inhibitory effect were observed. The effect of the inhibitor structure and substrate nature, specific for each of the studied inhibitors, on the character of the process of reversible inhibition was found.

Key words: cholinesterases of animals, benzimidazol reversible inhibitors, substrates.

References

1. Brestkin A. P., Kuznetsova L. P., Moralev S. N., Rosengart E. V. Cholinesterases of terrestrial animals and aquatic organisms. Vladivostok.: TINRO Center, 1997. 466 p. (In Russian).
2. Moralev S. N., Rozengart E. V. Comparative Enzymology of Cholinesterases. La Jolla. Ca. (USA): International University Lines, 2007. 485 p.
3. Beri V., Auletta J. T., Maharvi G. M., Wood J. F., Fauq A. H., Rosenberry T. L. Hydrolysis of low concentrations of the acetylthiocholine analogs acetyl(homo)thiocholine and acetyl(nor)thiocholine by acetylcholinesterase may be limited by selective gating at the enzyme peripheral site. *Chem. Biol. Interact.* 2013;203(1):38-43.
4. Sussman J. L., Harel M., Silman I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. *Chem. Biol. Interact.* 1993;87(1):187-197.
5. Rozengart E. V., Girshovich M. Z., Basova N. E. Benzimidazole derivatives with delocalized charge in cation group as reversible inhibitors of cholinesterases of different origin. *Dokl. RAS.* 1997;355(1):123-125. (In Russian).
6. Basova N. E., Rozengart E. V. Reversible anticholinesterase effect of ammonium compounds with localized and delocalized charge: the influence of enzyme nature and substrate structure. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008;422(1):P. 251-256.
7. Rozengart E. V., Basova N. E. Comparative-enzymological study of cholinesterases from optic ganglia of the commander squid *Beryteuthis magister* individuals inhabiting different zones of the species area. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2010;46(5):429-441.
8. Brestkin A. P., Vinyar T. N., Rosengart E. V. Interaction of brain cholinesterase frog with some reversible inhibitors of ammonium. *Biochemistry.* 1981;46:1042-1048. (In Russian).
9. Rozengart E. V., Basova N. E. Comparative-enzymological study of cholinesterase of the Pacific squid *Todarodes pacificus*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2010;46(1):1-18.
10. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7(2):88-95.
11. Eltcov A. V., Girshovich M. Z. 1,2-Digidrobenzimidazole derivatives. VI. *J. Organic Chem.* 1967;3:1332-1338. (In Russian).
12. Girshovich M. Z., Eltcov A. V. Synthesis of benzimidazole. *J. Organic Chem.* 1974;10:386-396. (In Russian).
13. Khromov-Borisov N. V., Indenbom M. L., Tikhonova L. N., Danilov A. F., Rozengart E. V., Soboleva I. N., Starshinova L. A. Enzymatic hydrolysis and action on skeletal muscle of acetylcholine analogs with various structure of cationic group. *Dokl. RAS.* 1974;218(6):1476-1477. (In Russian).

14. Abduvahabov A. A., Sadykov A. A., Dalimov D. N., Aslanov H. A. Alkaloids and their derivatives as a tool for the study of the cholinergic system. Tashkent: FAN, 1984. 288 p. (In Russian).
15. Albert A., Sergeant E. Ionization constants of acids and bases. N.Y., Wiley, 1962. 180 p.
16. Koshland D. E. The active site and enzyme activity. *Adv. Enzymol.* 1960;22(1):45-104.

Получено 27.01.2014