

УДК 577.154

**О. В. Севастьянов**Физико-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  $\text{Ca}^{2+}$  микросомальной фракцией 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  $\alpha, \beta$ -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 алициклических, 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  $\text{Ca}^{2+}$  [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 см<sup>3</sup> раствора сложного эфира 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, приготовленного на 80 % водном растворе ДМСО, для получения конечных концентраций: 1,25·10<sup>-4</sup>, 2,5·10<sup>-4</sup>, 5·10<sup>-4</sup>, 7,5·10<sup>-4</sup> и 1,0·10<sup>-3</sup> моль/дм<sup>3</sup> добавляли по 3,6 см<sup>3</sup> раствора КСl (рН 6,8).

Колбы инкубировали в течение 1 мин при перемешивании при 37°С, затем добавляя 0,9 см<sup>3</sup> суспензии микросомальной фракции. Через 5 мин реакцию останавливали 3 см<sup>3</sup> 0,8 % спиртового раствора сульфаниламида. Содержимое колб центрифугировали (10 мин, 6000 об/мин), прибавляли по 1,5 см<sup>3</sup> 1,6 % водного раствора NaNO<sub>2</sub>. Встряхивали и через 3 мин добавляли по 1,5 см<sup>3</sup> 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<sub>м</sub> и V<sub>макс</sub>.

### 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 <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	№	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1	H	CH <sub>3</sub>	H	7	H	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H
2	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	8	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
3	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	9	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
4	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	10	H	-	H
5	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	11	H	-	CH <sub>3</sub>
6	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	H	12	H	-	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

Из печени свиньи методом низкоскоростной седиментации в присутствии ионов Ca<sup>2+</sup> 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	2,232±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-бенздиазепин-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].

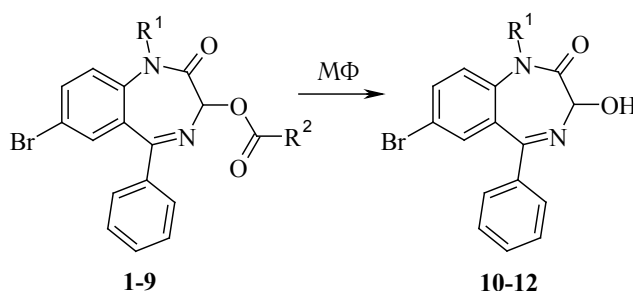


Рис. 1 Ферментативный гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она

Для доказательства того, что в гидролизе сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-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/дм<sup>3</sup>.

Поскольку известно, что структура субстрата может влиять на степень его трансформации карбоксилэстеразой [2], исследовано влияние заместителей в молекуле сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-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-бенздиазепин-2-онов **1-9** с помощью микросомальной фракции.

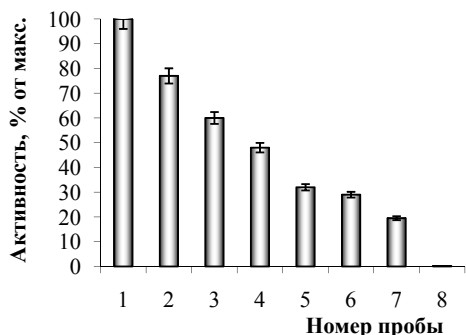
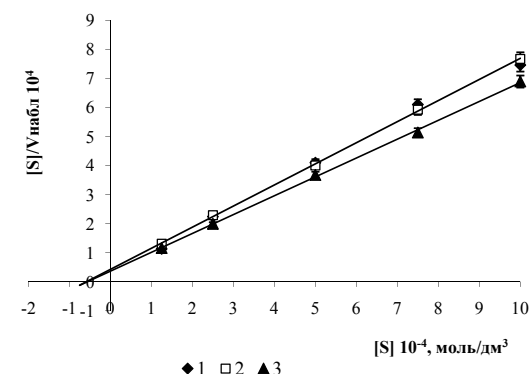
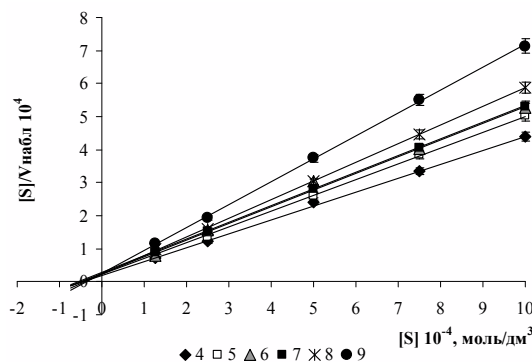


Рис. 2. Влияние концентрации бис-(*p*-нитрофенил)-фосфата на эстеразную активность МФ: 1 – без ингибитора, 2 – 0,03 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 3 – 0,6 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 4 – 2,9 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 5 – 8,82 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 6 – 20,6 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 7 – 38,2 мкмоль/дм<sup>3</sup>, 8 –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

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  $K^M$  (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 <sup>3</sup> · 10 <sup>-6</sup>	$V_{max}$ , моль /мг белка · мин · 10 <sup>-9</sup>
<b>1</b>	55,31	15,38
<b>2</b>	46,86	23,74
<b>3</b>	50,82	20,95
<b>4</b>	56,87	19,44
<b>5</b>	50,51	19,80
<b>6</b>	38,97	17,71
<b>7</b>	39,14	14,47
<b>8</b>	58,08	13,92
<b>9</b>	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., Е. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов, І. І. Романовська, Е. А. Семеншина, В. І. Павловський. Гідроліз складних ефірів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-она мікросомальної фракції печини свині // *Вісник ОНУ, Сер. Хімія.* - 2008. - Т.13, № 11. - С. 37-45.
12. Корнши-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. – 280 с.

### 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-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою виділеної методом низькошвидкісної седиментації в присутності  $\text{Ca}^{2+}$  мікросомальної фракції печинки свині. Показано повне інгібування естеразної активності мікросомальної фракції печинки 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-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-они, мікросомальна 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-BENZDIAZEPINE-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  $\text{Ca}^{2+}$ -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,  $V_{\text{max}}$ , 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  $V_{\text{max}}$  lowering due to substituents 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.

Стаття надійшла до редакції 11.04.2012