

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

На правах рукопису

КИСЛОВА Ольга Володимирівна

ПОХІДНІ ЦИКЛОПРОПІЛЕТИЛВІСНИХ АМІНІВ -
МОДУЛЯТОРИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ ОБМІНУ ЕТАНОЛУ.

02.00.10-біоорганічна хімія, хімія природних
та фізіологічно активних речовин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00754091 (Q)

Інститут органічної хімії НАН України.

Наукові керівники: доктор біологічних наук,
професор Г.О.Пхакадзе
кандидат біологічних наук
К.Г.Виноградова

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор В.К.Кібірев
доктор біологічних наук,
професор С.О.Костерін

Провідна організація - Київський університет
ім.Тараса Шевченка

Захист відбудеться 30 вересня 1994 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (253660, Київ вул.Мурманська,1).

Автореферат розісланий "25" серпня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Федоряк Д.М.Федоряк

Загальна характеристика роботи.

Актуальність проблеми. Останнім часом велика увага приділяється використанню специфічних інгібіторів для спрямованої регуляції ферментативної активності, що має значну цінність для практичної медицини, в тому числі й для наркології. Так, з інгібуванням активності ферментів основного шляху метаболізму етанолу - алкогольдегідрогенази (алкоголь: NAD^+ -оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.1., АДГ) та альдегіддегідрогенази (альдегід: NAD^+ -оксидоредуктаза; КФ 1.2.1.3., АЛЬДГ) - головним чином пов'язаний біохімічний механізм дії антиалкогольних препаратів сенсibiliзуючого типу [Brien, Loomis, 1965; Vasilion et al., 1986; Peaschey, Annis, 1985; Jorvall et al., 1987, 1988]. Йх незначний арсенал приводить до необхідності цілеспрямованого пошуку нових хімічних речовин аналогічної дії.

Відомо, що різноманітну біологічну активність, в тому числі й антиалкогольну, проявляють сполуки, в структурі яких є циклопропільний фрагмент [Яновская и др., 1960; Walsh, 1982; Marchner, Tottmann, 1983;]. Так, чутливість до етанолу підвищують структурні аналоги паргіліну, в яких пропаргільна група замінена на циклопропільний фрагмент, а також N^5 -(1-гідроксициклопропіл)-L-глутамін (коприн), виділений із гриба *Coprinus atramentarius* [Wiseman et al., 1980; Nagasawa et al., 1984].

Проте недоліками цих речовин, а також препаратів сенсibiliзуючого типу, які вживаються в клінічній практиці (тетраетилтіуррамдисульфід (ТЕТД), ціанамід кальцію), є низька селективність, токсичність, необоротність взаємодії з ферментами.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчення впливу ряду циклопропілетилвмісних амінів та їх похідних на активність ферментів етанолокислюючої системи - АДГ та АЛЬДГ. Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

- 1) ідентифікувати ферменти основного шляху метаболізму етанолу печінки щурів та розрахувати їх кінетичні характеристики;
- 2) дослідити дію похідних циклопропілетилвмісних амінів та деяких їх структурних фрагментів - амідів бензойних кислот - на швидкість прямої та зворотної АДГ-реакцій та активність форм АЛЬДГ в умовах *in vitro*;
- 3) на прикладі одного з виявлених в умовах *in vitro* ефективних інгібіторів АЛЬДГ та його структурних фрагментів (можливих метаболітів) вивчити вплив сполук на активність ферментів обміну етанолу після внутрішньошлункового введення, а також на

добровільне вживання розчину етанолу щурами з II-ю стадією хронічного алкоголізму;

4) використовуючи метод k-найближчих сусідів з оптимізацією ознакового простору за допомогою еволюційної стратегії [Тетко, 1994], розрахувати набір фізико-хімічних та топологічних параметрів для передбачення на основі структурної формули циклопропілетилвмісної сполуки можливості інгібування активності АльДГ матриксу мітохондрій;

5) дослідити кінетику інгібування ферментів метаболізму етанолу виявленими ефективними модуляторами.

Наукова новизна роботи. В представленій роботі вперше досліджено вплив нових циклопропілетилвмісних сполук на ферменти етанолокислюючої системи. Виявлено ефективні інгібітори активності різних форм АльДГ. Вони відрізняються від відомих препаратів сенсibiliзуючого типу по структурі та характеру взаємодії з ферментом. На моделі експериментального хронічного алкоголізму показано, що внутрішньошлункове введення одного з ефективних інгібіторів АльДГ - N-феніл-N-(1-циклопропілетил)-аміду 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти - приводить до такого ж зниження добровільного вживання етанолу, як і ТЕТД. Проте оборотний характер взаємодії циклопропілетилвмісних амідів бензойних кислот з АльДГ має ряд переваг перед необоротною інактивацією ферменту ТЕТД. Використовуючи один із методів сучасної теоретичної хімії, розраховано набір фізико-хімічних параметрів, який дозволяє на основі структурної формули сполуки даного ряду передбачати можливість інгібування активності АльДГ матриксу мітохондрій, що відіграє провідну роль в окисленні ацетальдегіду при фізіологічних умовах. Знайдено кількісну залежність між ефективністю інгібування активності цієї форми ферменту та двома топологічними індексами.

Практична цінність роботи. Проведені дослідження дозволяють запропонувати найбільш ефективні інгібітори для подальшого їх вивчення як антиалкогольних препаратів. Інгібітори активності АДГ можуть застосовуватись як своєрідні антидоти при отруєннях токсичними спиртами, а також для підвищення рівня ендogenous етанолу, оскільки зниження цього показника обумовлює розвиток пристрасті до алкоголю. Виявлені інгібітори АльДГ можуть бути використані як речовини, що підвищують чутливість до етанолу та запропоновані для подальшого вивчення.

Ці сполуки можуть застосовуватись для з'ясування структур-

них особливостей різних форм ферментів обміну етанолу, поліморфізм яких зумовлює розвиток алкоголізму.

Розрахований набір фізико-хімічних параметрів дає можливість вести спрямований синтез циклопропілетильмісних сполук з антиалкогольними властивостями та передбачати ефективність їх дії.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1993); XXVIII конференції молодих учених та спеціалістів Інституту органічної хімії НАН України (Київ, 1992); IX конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії (Київ, 1994).

Публікації. З теми дисертації опубліковано 5 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури (3 розділи), опису методів досліджень (1 розділ), викладу та обговорення одержаних результатів (1 розділ), заключення, висновків та списку використаної літератури, який включає 159 бібліографічних назви. Робота викладена на 141 сторінці машинописного тексту, ілюстрована 17 рисунками та 19 таблицями.

Результати досліджень та їх обговорення.

Об'єктом для здійснення скринінгу сполук з антиалкогольними властивостями були ферменти основного шляху метаболізму етанолу, виділені з печінки шурів методом диференційного центрифугування [Скоупс, 1985]. Активність ферментів визначали на спектрофотометрі "Бекман DU-6" [Коноплицька, 1987] та виражали в нмолях NADH/(мг білку.хв).

Внаслідок проведених досліджень ідентифіковано наступні ферменти: цитоплазматична АДГ, яка каталізує оборотний процес окислення етанолу, та мітохондріальні й мікросомальна форми АЛЬДГ (табл.1).

Дані таблиці свідчать, що АДГ з печінки шурів належить до класу 3 [Herrera et al., 1983; Lad, Leffert, 1983], представленому групою катодних форм, які зустрічаються, головним чином, у печінці, інгібуються піразолом та відіграють провідну роль у окисленні етанолу. Подальше перетворення ацетальдегіду при фізіологічних умовах каталізується АЛЬДГ мітохондріального матриксу, про що свідчить значно вища величина константи уявної специфічності V_{max}/K_m [Harrington et al., 1988; Tsutsumi et al., 1988]. В умовах хронічної алкогольної інтоксикації зростає

Уявні кінетичні характеристики ферментів етанол-
окислюючої системи печінки щурів ($M \pm m, n=6$).

	V_{\max} нмоль NADH / мг білку · хв		V_{\max} / K_m нмоль NADH / мг білку · хв · мкм	
	субстрат		кофактор	
А Л К О Г О Л Ь Д Е Г І Д Р О Г Е Н А З А				
Пряма реакція	10,00±2,39		<0,005	
Зворотна реакція	18,00±4,87		47,37±8,96	
А Л Ь Д Е Г І Д Д Е Г І Д Р О Г Е Н А З А				
Матрикс мітохондрій	14,00±1,08		1077±72	
Мембрана мітохондрій	16,70±1,15		24±1	
Мембрана мікросом	13,40±0,90		11±2	

внесок мембранних форм мітохондрій і мікросом, які характеризуються значно нижчою спорідненістю до ацетальдегіду [Aoki, Itoh, 1989; Островский и др., 1988].

Таким чином, описані вище ферменти відповідають за метаболізм етанолу при фізіологічних умовах та при хронічній алкоголізації. Спрямована регуляція модуляторами активності АДГ та АльДГ має велике значення для наркологічної практики.

Як модулятори активності цих ферментів у даній роботі досліджено ряд похідних циклопропілетилвімісних амінів. Вони синтезовані в відділі органічного та нафтохімічного синтезу ІБОНХ НАН України. Внаслідок проведених досліджень сполуки розділені на 4 групи залежно від структури та впливу на ферменти основного шляху метаболізму етанолу.

До першої групи входять N-заміщені-N-(1-циклопропілетил)-аміни та аміді пропіонової кислоти (рис.1А), які незначно впливали на швидкість прямої та зворотної АДГ-реакцій та на активність форм АльДГ. На цьому та наступних рисунках розташування стовпчиків зверху від горизонтальної осі відповідає активації, знизу – інгібуванню активності ферментів.

Наявність залишків морфоліну та піперидину в структурі циклопропілетилвімісних амідів оцтової кислоти (рис.1Б)

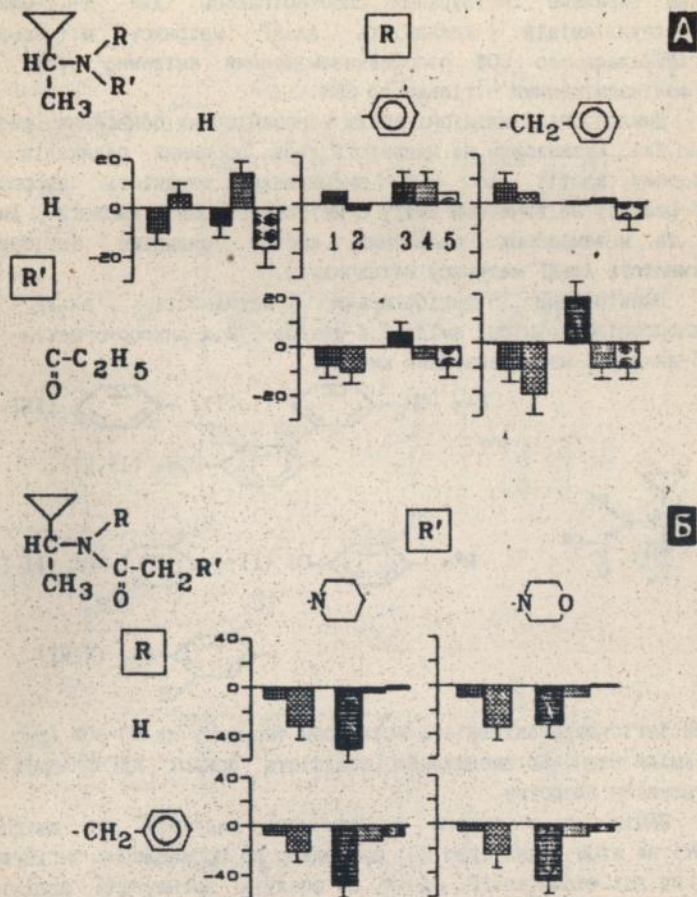
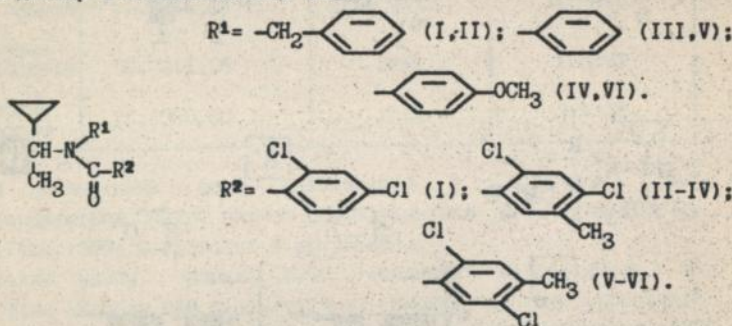


Рис.1. Вплив циклопропілетиламінів, амідів пропіонової кислоти (А) та амідів 2-заміщеної оцтової кислоти (Б) на активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу (на осі ординат узказано процент активації (стовпчики вгору) або інгібування (стовпчики вниз)): 1,2 - пряма та зворотна АДФ-реакції; 3 - АльДГ матриксу мітохондрій; 4,5 - мембранні АльДГ мітохондрій та мікросом.

приводить до зменшення швидкості зворотної АДГ-реакції, причому більш виражене інгібування спостерігалось для N-(1-циклопропіл)етил)амідів. Активність АльДГ матриксу мітохондрій інгібувалась до 50% піперидинзаміщеними амідями, тоді як морфолінзаміщеними - тільки до 35%.

Циклопропілетилвмісні амідні монозаміщених бензойних кислот (рис.2А), незважаючи на наявність двох об'ємних радикалів при амідному азоті, до 50% зменшували швидкість зворотної АДГ-реакції за винятком амиду о-метоксibenзойної кислоти. Амідні о- та м-заміщених бензойних кислот сильніше інгібували активність АльДГ матриксу мітохондрій.

Ефективними інгібіторами активності АльДГ є циклопропілетилвмісні амідні 2,4-дихлор-, 2,4-дихлор-5-метил- та 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот:



Вони інгібували активність усіх форм ферменту на 50-80% (рис.2Б). Ці амідні незначно зменшували швидкість прямої АДГ-реакції та активували зворотну.

Заміщення об'ємного ароматичного радикалу при амідному азоті на атом водню (рис.2Б) приводило до послаблення інгібувочої дії на всі форми АльДГ. Однак, ці сполуки зменшували швидкість зворотної АДГ-реакції на 40-60%.

Таким чином, серед розглянутих похідних циклопропілетилвмісних амінів виявлено групу ефективних інгібіторів активності АльДГ матриксу мітохондрій та мембранних форм мітохондрій та мікросом - N-заміщені-N-(1-циклопропілетил)амідні 2,4-дихлор-, 2,4-дихлор-5-метил- та 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот.

Застосування методу k-найближчих сусідів з оптимізацією ознакового простору за допомогою еволюційної стратегії дозволило

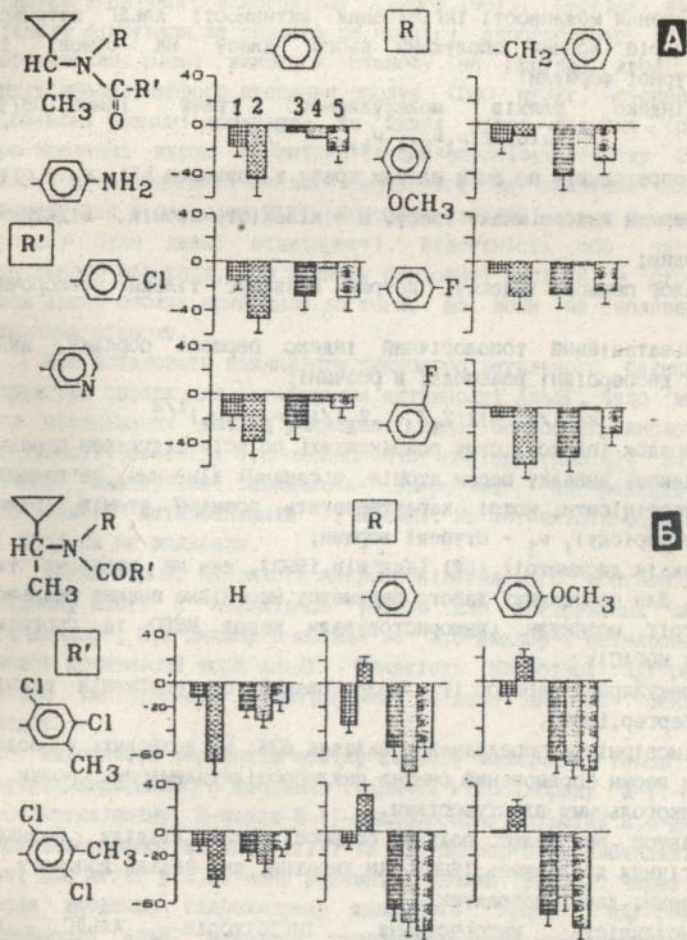


Рис.2. Вплив циклопропілетилвісних амідів монозаміщених бензойних кислот (А) та амідів 2,4-дихлор-5-метил-, 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот (Б) на активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу (на осі ординат узказано процент активації (стовпчики вгору) або інгібування (стовпчики вниз)): 1,2 - пряма та зворотна АДГ-реакції; 3 - АльДГ матриксу мітохондрій; 4,5 - мембранні АльДГ мітохондрій та мікросом.

розрахувати наступний набір фізико - хімічних параметрів для передбачення можливості інгібування активності АльДГ матриксу мітохондрій новими сполуками цього класу на основі їх структурної формули:

1) Індекс шляхів молекулярного графу [Кинг,1987]:

$$h_x(G) = \sum (\nu_1 \nu_2 \dots \nu_{h+1})^{-1/2} / N$$

суму розраховують по всім шляхам графу з довжиною $h > 1$, ν_1 - ступені вершин вздовж шляху графу, N - кількість атомів, відмінних від водню;

2) аналог першого індексу, котрий враховує тільки найкоротші шляхи;

3) сольватаційний топологічний індекс першого порядку, який описує дисперсійні взаємодії в розчині:

$$m_x s = (1/2^{m+1}) \sum (Z_1 Z_2 \dots Z_k) / (\nu_1 \nu_2 \dots \nu_k)^{1/2}$$

m - порядок індексу, суму розраховують по всім підграфам порядку m (у даному випадку парам атомів, з'єднаних хімічним зв'язком), Z_1 - коефіцієнти, котрі характеризують розміри атомів (рівні номеру періоду), ν_1 - ступені вершин;

4) функція дисиметрії (DF) [Kuz'min,1992], яка не враховує тип атому. Для розрахунку даного параметру необхідне знання реальної геометрії молекули (використовували метод MNDO та програми пакету MORAC);

5) молекулярний парахор (P), розрахований по адитивній схемі [Вайсбергер,1950].

Імовірність передбачення складає 83%. Це дозволить у подальшому вести спрямований синтез циклопропілетиламічних сполук з антиалкогольними властивостями.

Автор висловлює подяку співробітникам відділу медико-біологічних досліджень ІБОНХ НАН України, які надали допомогу в проведенні даних розрахунків.

Можливість використання інгібіторів АльДГ як антиалкогольних препаратів сенсифілізуючого типу тісно пов'язана з їх токсичністю. Встановлено, що для амідів II та V величина LD_{50} перевищує 2000 мг/кг. Для ТЕТД вона становить 1400 мг/кг [Кораблев,1971].

Скринінг нових фармакологічних засобів з антиалкогольними властивостями передбачає вивчення впливу сполук на основні прояви алкоголізму. Так, наявність у хімічної речовини

антиалкогольної активності можна ідентифікувати по зменшенню добровільного вживання 15%-ного розчину етанолу щурами з II-ю стадією хронічного алкоголізму [Буров, 1981]. Середнє вживання етанолу фіксували за тиждень до початку експерименту і з ним порівнювали рівні вживання етанолу на протязі двох тижнів внутрішньощлункового введення сполук (200 мг/кг, суспензія в 2,5%-ному розчині крохмалю) та тижня після відміни (рис.3). При введенні щурам N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти спостерігалось зниження вживання етанолу, як і під дією ТЕТД [Коноплицька, 1992], хоча в динаміці процесу були деякі відмінності. Відсутність або об'ємного фенільного радикалу, або залишку бензойної кислоти в структурі двох інших сполук приводила до того, що вони не впливали на вживання етанолу.

Щоб встановити важливість циклопропілетильного радикалу в структурі сполук для інгібування активності АльДГ, було вивчено дію незаміщених амідів описаних вище бензойних кислот на активність ферментів етанолокислючої системи (рис.4). Вони на 50-80% зменшували швидкість зворотної АДГ-реакції, а 2,4-дихлор-5-метилбензамід - і прямої. На активність форм АльДГ ці сполуки не впливали.

Таким чином, наявність циклопропілетильного фрагменту при амідному азоті є необхідною умовою для інгібування амідами 2,4-дихлор-, 2,4-дихлор-5-метил- та 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот активності форм АльДГ. Швидкість зворотної АДГ-реакції значно інгібувалась незаміщеними амідами цих же бензойних кислот.

Активність ферментів обміну етанолу визначали також після внутрішньощлункового введення тваринам гідрохлориду N-(1-циклопропілетил)аміну, N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,4-дихлор-5-метилбензойної кислоти (III) та 2,4-дихлор-5-метилбензаміду в дозі 200 мг/кг у 2,5%-ному розчині крохмалю (рис.5). Через 3 год після введення гідрохлориду швидкість прямої АДГ-реакції, активності АльДГ матриксу мітохондрій та мембранної форми мікросом інгібувались до 20%, а швидкість зворотної АДГ-реакції та активність мембранної АльДГ мітохондрій зростали до 10%. Після введення 2,4-дихлор-5-метилбензаміду швидкості прямої та зворотної АДГ-реакцій зменшувались на 40%. Під дією N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,4-дихлор-5-метилбензойної кислоти (III) спостерігалась активація зворотної АДГ-реакції на 35%, а

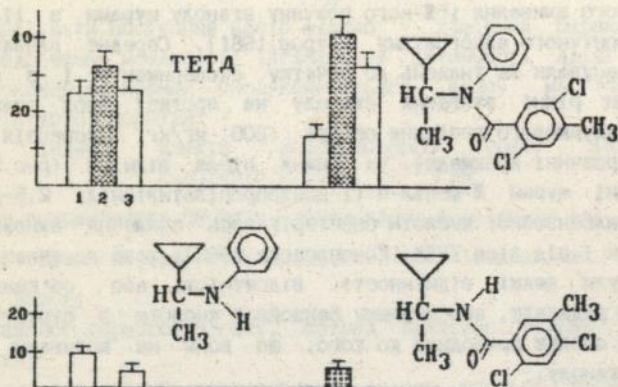


Рис.3. Зниження вживання етанолу (в процентах) щурами з II-ю стадією хронічного алкоголізму після внутрішньошлункового введення циклопропілетиламінічних сполук: 1,2 - на протязі першого та другого тижнів введення сполук, 3 - після відміни введення.

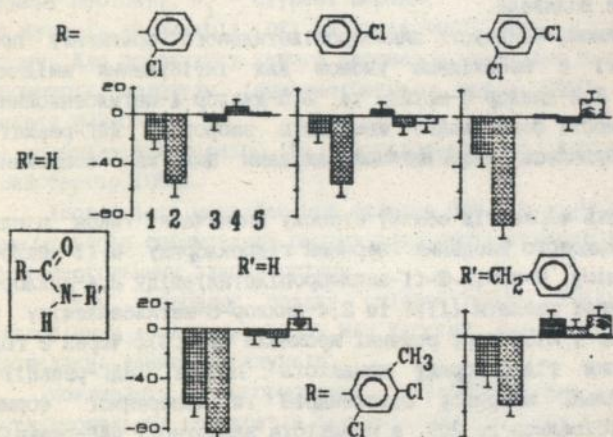


Рис.4. Вплив амідів бензойних кислот на активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу (на осі ординат указано процент активації (стовпчики вгору) або інгібування (стовпчики вниз)): 1,2 - пряма та зворотна АДГ-реакції; 3 - АльДГ матриксу мітохондрій; 4,5 - мембранні АльДГ мітохондрій та мікросом.

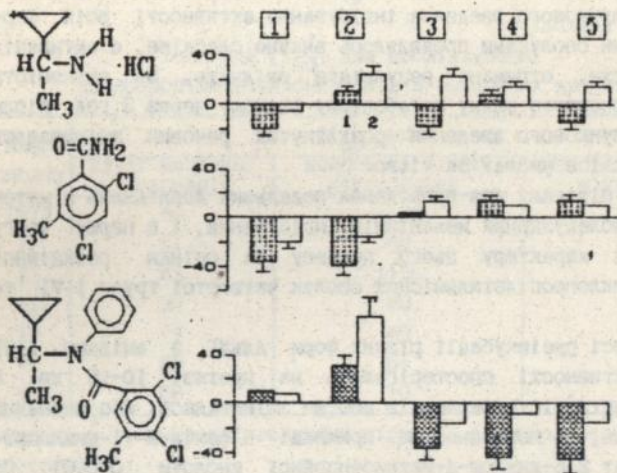


Рис.5. Зміна досліджуваними сполуками активності ферментів основного шляху метаболізму етанолу після внутрішньошлункового введення на 3 год (1) та 18 год (2) (на осі ординат узасано процент активації (стовпчики вгору) або інгібування (стовпчики вниз)): [1] [2] - пряма та зворотна АДГ-реакції; [3] - АльДГ матриксу мітохондрій; [4], [5] - мембранні АльДГ мітохондрій та мікросом.

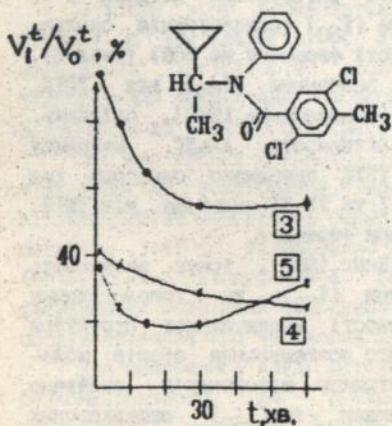


Рис.6. Залежність залишкової активності АльДГ матриксу мітохондрій [3], мембранних форм мітохондрій [4] та мікросом [5] від часу преінкубації з N-феніл-N-(1-циклопропілетил)амідом 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти.

активності форм АльДГ інгібувались на 40%. Через 18 год після внутрішньошлункового введення інгібування активності всіх ферментів даними сполуками проявлялось значно слабкіше, а активація зростала. Отже, отримані результати свідчать, що активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу через 3 год після внутрішньошлункового введення розглянутих речовин змінювалась так само, як і в умовах *in vitro*.

Це дає підставу для проведення подальших досліджень з метою з'ясування молекулярних механізмів інгібування, і в першу чергу встановлення характеру цього процесу та оцінки реакційної здатності циклопропілетилвісних сполук четвертої групи I-VI та бензамідів.

У процесі преінкубації різних форм АльДГ з амідами I-VI зниження активності спостерігалось на протязі 10-15 хв. У подальшому активність ферментів або не змінювалась, або незначно підвищувалась, що показано на прикладі N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти (рис.6). Це дозволяє припустити, що дані сполуки є оборотними інгібіторами активності АльДГ. Такий висновок підтверджується відновленням активності ферментів при проведенні експериментів по розведенню. Оборотний характер взаємодії інгібіторів з ферментом має певні фізіологічні переваги перед необоротною інактивацією АльДГ відомими антиалкогольними препаратами, оскільки відновлення активності ферменту в випадку оборотного інгібування відбувається без синтезу білка *de novo*.

Критерієм оцінки ефективності інгібування амідами I-VI активності форм АльДГ була величина $[I_{50}]$ (концентрація сполук, яка приводить до зменшення активності ферменту на 50%) (табл.2).

Порівняння цих величин із значенням $[I_{50}]$ для ТЕТД, отриманих при аналогічних умовах [Коноплицька, 1992], свідчить, що ефективність інгібування активності АльДГ матриксу мітохондрій новими сполуками і ТЕТД приблизно однакова (за винятком амідів III та IV). Аміді I та IV-VI сильніше, ніж ТЕТД, інгібують активність мембранних форм ферменту.

Згідно з даними літератури [Кинг, 1967], існує залежність між від'ємним логарифмом величини $[I_{50}]$ та топологічними індексами, які відображають особливості молекулярної структури без урахування точного геометричного розташування атомів молекули в просторі. Для АльДГ матриксу мітохондрій знайдено кількісну залежність між величинами $-\log[I_{50}]$ вищевказаних

Таблиця 2.

Величини $[I_{50}]$ для досліджуваних
циклопропілетилвісних амідів бензойних кислот.

Шифр сполук	$[I_{50}], \text{мкМ}$		
	АЛЬДГ матриксу мітохондрій	мембранна АЛЬДГ мітохондрій	мембранна АЛЬДГ мікросом
ТЕТД*	50	100	>100
I	51	69	56
II	63	>100	71
III	94	80	91
IV	71	69	64
V	60	64	38
VI	58	70	48

Примітка.* - приведені величини отримані без врахування типу інгібування.

амідів та двома топологічними індексами - індексом форми 0-го порядку I [Kier, 1987] та загальним топологічним індексом τ [Hall, Kier, 1990]:

$$-\log[I_{50}] = 0,029I - 0,035\tau + 0,832.$$

Отримана кореляція дає змогу на основі структурної формули сполук передбачати можливу ефективність їх дії.

Оборотними інгібіторами активності АЛДГ є й розглянуті аміді бензойних кислот (величини I_{50} становлять 35-45 мкМ).

З точки зору ферментативної кінетики реакції окислення етанолу й ацетальдегіду є двосубстратними. Для виявлених ефективних інгібіторів досліджено характер взаємодії з відповідними ферментами основного шляху метаболізму етанолу по відношенню до кожного субстрату.

При варіюванні концентрації NAD^+ та насичувчих концентраціях ацетальдегіду встановлено, що інгібування АЛЬДГ матриксу мітохондрій та мембранної форми мікросом циклопропілетилвісними амідами I-VI відповідало феноменології конкурентного інгібування. Гіперболічна залежність нахилів прямих в координатах подвійних обернених величин від концентрації цих сполук свідчила про частковий характер розглянутого процесу.

Для мембранної АЛЬДГ мітохондрій спостерігався перехід від безконкурентного до псевдоінгібування при підвищенні концентрації циклопропілетилвісних амідів 2,4-дихлор- та

2,4-дихлор-5-метилбензойних кислот (I-IV) і до змішаного - для амідів 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот (V,VI).

При насиченій концентрації NAD^+ і варіюванні концентрації ацетальдегіду встановлено, що для амідів 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот (V,VI) спостерігався частково безконкурентний характер інгібування з гіперболічною залежністю відрізків, які відсікаються на осі ординат у координатах подвійних обернених величин, від концентрації модулаторів. Характер взаємодії амідів 2,4-дихлор- та 2,4-дихлор-5-метилбензойних кислот (I-IV) з АЛЬДГ матриксу мітохондрій змінювався від безконкурентного до змішаного.

Для мембранних форм мітохондрій та мікросом характер взаємодії з усіма амідами відповідав феноменології конкурентного інгібування з уявними константами інгібування в мікромолярному діапазоні (табл.3).

Таблиця 3.

Уявні константи інгібування K_1 циклопропілетил-
вмісними амідами бензойних кислот мембранних форм АЛЬДГ.

шифр сполук форма ферменту	I	II	III	IV	V	VI
	K_1 , мкМ					
мітохондрій	18	27	20	19	17	19
мікросом	16	23	30	21	12	15

Кінетичні дослідження дають можливість припустити існування конформаційних відмінностей активних центрів форм АЛЬДГ. Так, для мембранних форм АЛЬДГ спостерігається структурна схожість ділянок адсорбції ацетальдегіду, що узгоджується з їх близькою субстратною специфічністю та подібністю кінетичних характеристик. Відмінність характеру інгібування мембранної форми мітохондрій по відношенню до першого субстрату реакції NAD^+ від характеру інгібування АЛЬДГ матриксу мітохондрій та мембранної форми мікросом може свідчити про більш гідрофобний характер першої.

Інгібування швидкості прямої АДГ-реакції 2,4-дихлор-5-метилбензамідом при варіюванні концентрації етанолу мало змішаний характер з уявною K_1 35 мкМ, а при зміні концентрації NAD^+ -

псевдоінгібування з уявною K_1 8 мкМ.

Інгібування швидкості зворотної АДГ-реакції 2,4-дихлор- та 2,4-дихлор-5-метилбензамідами при зміні концентрації ацетальдегіду відповідало псевдоінгібуванню з параболічною залежністю $K_{1/2}^0 / K_{1/2}^0$ від концентрації сполук; а при зміні концентрації бензальдегіду - частково безконкурентному характеру з параболічною залежністю відрізків, які відсікаються на осі ординат у координатах подвійних обернених величин, від концентрації модуляторів.

При варіюванні концентрації NADH спостерігався безконкурентний характер інгібування. Більш низькі величини уявних констант інгібування отримані з використанням ацетальдегіду як субстрату.

Проведені дослідження показали, що наявність в ароматичному кільці бензамідів декількох замісників приводить до ускладнення характеру інгібування активності АДГ у порівнянні з монозаміщеними бензамідами [Sarma, Woronick, 1972].

Таким чином, у результаті виконання роботи серед ряду циклопропілетилвісних сполук виявлено ефективні інгібітори активності АльДГ: N-заміщені-N-(1-циклопропілетил)аміди 2,4-дихлор-, 2,4-дихлор-5-метил- та 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот. N-феніл-N-(1-циклопропілетил)амід 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти може бути запропонований для подальших досліджень як потенційний антиалкогольний препарат сенсibiliзуючого типу. Перспективним є пошук нових сполук даного ряду з антиалкогольними властивостями, користуючись розрахованим набором фізико-хімічних параметрів. Найдені модулятори активності можуть бути використані як інструменти для вивчення тонких структурних особливостей різних форм АльДГ.

Автор з великою вдячністю згадує поради, практичні зауваження, підтримку Ксенії Леонідівни Коноплицької, якої, на жаль, зараз вже нема серед нас.

В И С Н О В К И

1. N-заміщені-N-(1-циклопропілетил)аміди 2,4-дихлор-, 2,4-дихлор-5-метил- та 2,5-дихлор-4-метилбензойних кислот є ефективними оборотними інгібіторами активності АЛЬДГ матриксу мітохондрій і мембранної форми мікросом (величина I_{50} становить 40-90 мкМ) та мембранної форми мітохондрій (величина I_{50} становить 70-100 мкМ). Показано, що наявність циклопропілетильного фрагменту в їх структурі є необхідною умовою для інгібування активності АЛЬДГ.

2. Виявлено схожість характеру взаємодії наведених вище сполук з АЛЬДГ матриксу мітохондрій та мембранною формою мікросом при варіюванні концентрації NAD^+ та з мембранними формами мітохондрій та мікросом при варіюванні концентрації ацетальдегіду.

3. Ефективними оборотними інгібіторами швидкості зворотної АДГ-реакції є 2,4-дихлор- та 2,4-дихлор-5-метилбензаміди (величини I_{50} становлять 36 та 43 мкМ відповідно). Наявність циклопропілетильного фрагменту при амідному азоті значно послаблює інгібування швидкості прямої та зворотної АДГ-реакцій.

4. Встановлено, що активність ферментів основного шляху метаболізму етанолу через 3 год після внутрішньошлункового введення гідрохлориду N-(1-циклопропілетил)аміну, N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,4-дихлор-5-метилбензойної кислоти та 2,4-дихлор-5-метилбензаміду в дозі 200 мг/кг змінювалась так само, як і в умовах *in vitro*.

5. Показано, що внутрішньошлункове введення N-феніл-N-(1-циклопропілетил)аміду 2,5-дихлор-4-метилбензойної кислоти в дозі 200 мг/кг приводило до зниження вживання етанолу щурами з II-ю стадією хронічного алкоголізму на 40% на протязі другого тижня введення сполуки та на 32% після відміни введення.

6. Знайдено набір фізико-хімічних, топологічних, а також враховуваних геометричну будову молекули параметрів, який дозволяє на основі структурної формули сполуки передбачати можливість інгібування активності АЛЬДГ матриксу мітохондрій.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Коноплицька К.Л., Виноградова К.Г., Кислова О.В. Розділення та очищення ізоформ альдегіддегідрогенази печінки щурів з використанням тетраетилтіурамдисульфід у як селективного реагенту // VI Укр. біохім. з'їзд: Тези доп. - Київ, 1992. - ч.1, С. 113.

2. Кислова О.В.; Виноградова Е.Г., Коноплицька К.Л., Щербина Ф.Ф. Ингибирование активности альдегиддегидрогеназы печени крыс циклопропилэтилсодержащими амидами бензойных кислот // Укр.биохим. журн. - 1993. - 65, N 6. - С. 50-56.

3. Коноплицька К.Л., Кислова О.В., Виноградова Е.Г., Щербина Ф.Ф., Язловицкий А.В., Хринюк Н.М., Ральчук И.А. Влияние циклопропилэтилсодержащих аминов и амидов на изоферментные формы альдегиддегидрогеназы печени крыс // Хим.-фарм. журн. - 1994. - 28, N 1. - С. 7-10.

4. Кислова О.В., Виноградова Е.Г., Пхакадзе Г.А. Мембрано-связанные формы альдегиддегидрогеназы. Новый класс ингибиторов их активности // Докл. НАН Украины, сер. Б. - 1994. - N 8. - С. 57-60.

5. Кислова О.В., Виноградова Е.Г., Коноплицька К.Л., Щербина Ф.Ф., Язловицкий А.В., Хринюк Н.М., Ральчук И.А. Синтез и влияние на активность ферментов обмена этанола циклопропилэтилсодержащих аминов и амидов // Сб. "физиологически активные вещества". - 1994. - вып. 26. - С. 36-42.

Ю

Подписано к печати 29.06.94 Зак. 1413 тир. 100
размножено ГВЦ Минстата Украины ООП

ЛНБ ім. В. Стефани
АН України

457994

AB 30.595

AB 30.595