



УДК 577.152.311'443

## ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ НА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СТЕРЕОИЗОМЕРОВ ТИОФОСФОНАТОВ С АСИММЕТРИЧЕСКИМ АТОМОМ ФОСФОРА

*Григорьева Г. М., Краснова Т. И., Абдувахабов А. А. \*,  
Абдукахаров В. С. \**

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Академии наук СССР, Ленинград;*

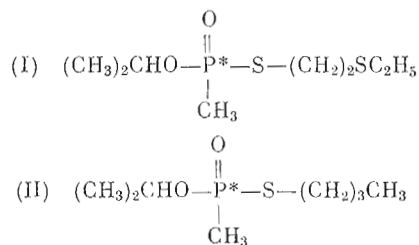
*\* Институт биохимической химии Академии наук УзССР, Ташкент*

Исследована кинетика ингибирующего действия оптических изомеров тиофосфонатов  $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}(\text{CH}_3)\overset{*}{\text{P}}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$  и  $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}(\text{CH}_3)\overset{*}{\text{P}}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$  на ацетилхолинэстеразу нервных ганглиев таракана, ацетилхолинэстеразу бычьих эритроцитов и бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади при pH 7,5 и температуре 25° С. Установлен комбинированный тип ингибирования холинэстераз, включающий нековалентное связывание ингибитора с ферментом и фосфорилирование фермента. Определены константы сродства ( $K_a$ ), константы скорости фосфорилирования ( $k_p$ ), константы бимолекулярной реакции ( $k_{11}$ ) взаимодействия ингибиторов с ферментами, а также константы диссоциации ( $K_{1,r}$ ) для непродуктивной сорбции ингибиторов. Показана более высокая избирательность действия (-)-изомеров тиофосфонатов по сравнению с (+)-изомерами на ацетилхолинэстеразы, в особенности на фермент таракана, и отсутствие существенных различий в связывании изомеров бутирилхолинэстеразой. Охарактеризована стереоспецифичность активных центров холинэстераз на разных стадиях взаимодействия с ингибитором.

При действии на холинэстеразы фосфорорганических ингибиторов решающую роль играет химическая структура последних. В то же время стереические особенности их молекул имеют существенное значение для антихолинэстеразного действия [1]. В связи с этим особый интерес представляет оптическая стереоизомерия ингибитора, обусловленная присутствием асимметрического центра в его молекуле [2]. Оптические изомеры фосфорорганических соединений избирательно ингибируют холинэстеразы, при этом энантиомеры могут действовать различно [1, 3, 4]. Это обусловлено асимметрией активных центров холинэстераз и присутствием в них стереоспецифических участков [5, 6].

При исследовании энантиомеров фосфорорганических ингибиторов с асимметрическим центром в различных частях молекулы (в алкильном радикале фосфорильной части, на атоме фосфора, в отщепляемой части) наибольшие различия в ингибирующем действии были получены для изомеров с центром асимметрии на атоме фосфора [6–8].

С целью поиска различий в стереоспецифичности холинэстераз у млекопитающих и насекомых и конструирования на этой основе избирательных инсектицидов нами исследовано действие на холинэстеразы производных метилтиофосфоновой кислоты, обладающих асимметрией в центральном атоме фосфора, (-)- и (+)-изомеров следующего строения:



Использованы ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) из нервных ганглиев таракана и из бычьих эритроцитов. Эти два фермента обладают сходной

субстратной специфичностью и мало различаются по отношению к действию ряда фосфорорганических ингибиторов [9]. Кроме указанных ферментов использована также бутирилхолинэстераза (КФ 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади.

Установлено, что соединения (I) и (II) обладают сложным типом действия на холинэстеразы: наряду с прогрессирующим во времени необратимым торможением наблюдалось торможение активности фермента в начальный момент реакции.

Ингибирующее действие фосфорорганических ингибиторов оценивалось величинами константы скорости ( $k_{11}$ ) бимолекулярной реакции фермента с ингибитором. Экспериментально определяемая величина ( $k_{II \text{ экс.}}$ ) уменьшалась при увеличении концентрации ингибитора.

Кинетика ингибирования ферментов исследуемыми соединениями была проанализирована согласно двухстадийной схеме реакции, предполагающей образование нековалентного комплекса фермента с ингибитором [10, 11]:



где E — фермент, I — ингибитор, EI — нековалентный комплекс, аналогичный комплексу Михаэлиса, образуемому при взаимодействии фермента с субстратом, EI' — фосфорилированный фермент,  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_p$  — кинетические константы отдельных стадий реакции. Обратимая стадия характеризуется константой диссоциации комплекса (EI) или константой сродства ( $K_a$ ); вторая стадия характеризуется константой скорости фосфорилирования ( $k_p$ ).

Ингибирование ферментов проводили в условиях избытка ингибитора, когда  $[I] \gg [E]$  ( $[E]$  — концентрация активных центров фермента). При этом кинетика соответствует кинетике реакции псевдопервого порядка и константа скорости ( $k_{II \text{ экс.}}$ ) определяется уравнением

$$k_{II \text{ экс.}} = \frac{1}{t [I]} \cdot 2,3 \lg v_0/v_t, \quad (1)$$

где  $v_0$  — начальная скорость ферментативного гидролиза субстрата,  $v_t$  — скорость гидролиза субстрата после ингибирования фермента в течение времени  $t$  (мин).

Результаты обрабатывали по методу Мейна [10] согласно уравнению

$$k_{II \text{ экс.}} = \frac{k_p [I]}{K_a + [I]}. \quad (2)$$

Из уравнений (1) и (2) следует, что при определенной  $[I]$ , которая постоянна во времени, так как  $[I] \gg [E]$ , наблюдается равенство

$$2,3 \lg v_0/v_t = \frac{k_p [I] t}{K_a + [I]}, \quad (3)$$

из которого после соответствующей обработки получается уравнение

$$\frac{1}{[I]} = \frac{\Delta t}{2,3 \Delta (\lg v_0/v_t)} \frac{k_p}{K_a} - \frac{1}{K_a}, \quad (4)$$

или

$$\frac{1}{[I]} = \frac{1}{k_{II, i}} k_{II} - \frac{1}{K_a}, \quad (5)$$

так как при постоянной  $[I]$  и  $\Delta t = 1$  мин  $\Delta t / 2,3 \Delta (\lg v_0/v_t) = 1/k_{II, i}$ . Уравнение (5) позволяет графическим методом в координатах  $1/k_{II, i}$  от  $1/[I]$  определить величины  $K_a$  и  $k_p$ . В этом случае определяемая  $K_a$  аналогична константе Михаэлиса,  $K_a = (k_{-1} + k_p)/k_1$ . Точка пересечения соответствующей прямой с осью абсцисс дает величину  $-(1/K_a)$ , а с осью ординат —  $1/k_p$ .

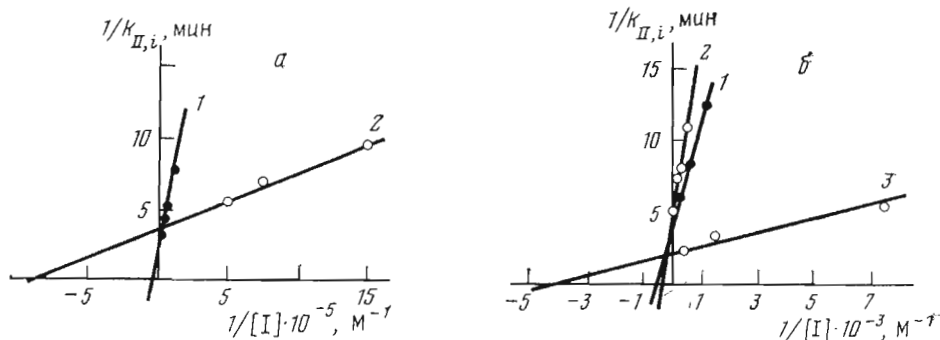
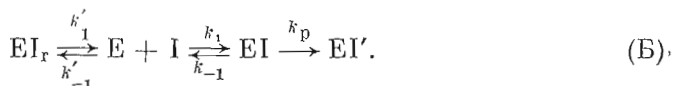


Рис. 1. Зависимость  $1/k_{II,i}$  от  $1/[I]$  при ингибировании (—) — изомером (I) (а) и (—) — изомером (II) (б) ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов (1), ацетилхолинэстеразы таракана (2), бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (3). Концентрации ацетилхолинэстераз  $2,3 \cdot 10^{-11}$  М, ацетилтиохолиниодида  $2 \cdot 10^{-3}$  М, бутирилхолинэстеразы  $7,0 \cdot 10^{-11}$  М, бутирилтиохолиниодида  $0,02$  М

Константы  $k_{II \text{ экс}}$  (уравнение (4)) и  $k_{II}$  (уравнение (5)) имеют различный смысл:  $k_{II \text{ экс}}$  — это простая константа скорости ингибирования, когда схема реакции рассматривается как  $E + I \xrightarrow{k_{II \text{ экс}}} EI'$ , а  $k_{II} = k_p/K_a$  (уравнение (5)) включает константы двух стадий процесса ингибирования согласно схеме (А), константу равновесия ( $K_a$ ) и константу скорости фосфорилирования ( $k_p$ ), поэтому термин «скорость» к этой константе не применим. Она является константой бимолекулярной реакции [10] и характеризует суммарную ингибирующую способность соединения, которая не зависит от его концентрации (в отличие от  $k_{II \text{ экс}}$ ). Из прямолинейности зависимости  $1/k_{II,i}$  от  $1/[I]$  для взаимодействия (—) — изомера (I) и (—) — изомера (II) с холинэстеразами (рис. 1) следует, что экспериментальные данные подчиняются уравнению (5) для схемы (А), и это свидетельствует об образовании промежуточного нековалентного комплекса. Параметры реакции, полученные согласно схеме (А), представлены в табл. 1.

Кинетика взаимодействия стереоизомеров (I) и (II) с холинэстеразами была проанализирована также по схеме, предполагающей образование непродуктивного комплекса фермента с ингибитором  $EI_r$ , [11–13]:



В отличие от комплекса  $EI$  комплекс  $EI_r$  не подвергается дальнейшему превращению в фосфорилированный фермент. Согласно схеме (В), определяемая экспериментально  $k_{II \text{ экс}}$  зависит от константы равновесия  $K_{i,r} = k_{-1}'/k_1'$  и применяемой концентрации ингибитора и связана

#### Кинетические параметры ингибирования холинэстераз Расчет

Ингибитор	Изомер	Ацетилхолинэстераза таракана			
		$K_a$ , М	$k_p$ , мин <sup>-1</sup>	$(k_p/K_a) = k_{II}$ , М <sup>-1</sup> .мин <sup>-1</sup>	$\tau_a^*$
(I)	(—)	$1,06 \cdot 10^{-6}$	0,27	$2,52 \cdot 10^5$	3111
	(+)	$2,33 \cdot 10^{-3}$	0,19	$8,10 \cdot 10^1$	
(II)	(—)	$3,25 \cdot 10^{-4}$	0,36	$1,10 \cdot 10^3$	450
	(+)	$2,50 \cdot 10^{-1}$	0,58	2,43	

\*  $\tau_a$  — отношение констант  $k_{II}$  более активного (—) — изомера к константам (+) — изомера.

с ними соотношением

$$k_{II \text{ энс}} = k_{II}^0 / \left( 1 + \frac{[I]}{K_{i, r}} \right)^{-1}, \quad (6)$$

которое после преобразования в обратные величины

$$\frac{1}{k_{II \text{ энс}}} = \frac{1}{k_{II}^0} + \frac{[I]}{k_{II}^0 \cdot K_{i, r}}$$

должно давать прямую в координатах  $1/k_{II \text{ энс}} - [I]$ .

На рис. 2 представлена зависимость  $1/k_{II \text{ энс}}$  от  $[I]$  для торможения ацетилхолинэстеразы (—)-изомером (I). Прямая отсекает на оси абсцисс отрезок, соответствующий  $-K_{i, r}$ ,

а на оси ординат  $-1/k_{II \text{ энс}}^0$ , обратную величину истинной  $k_{II}^0$ , которая не зависит от концентрации ингибитора.

Прямолинейность этой зависимости указывает на конкурентный характер взаимодействия фермента с ингибитором.

Отсюда следует, что комплекс  $E \cdot I_r$  образуется в активном центре фермента, при этом происходит полное блокирование последнего, что препятствует эффективной сорбции ингибитора.

Этот процесс аналогичен тому, который происходит при взаимодействии фосфорорганического ингибитора с холинэстеразой в присутствии таких конкурентных ингибиторов обратного действия, как ионы тетраалкиламмония, которые, присоединяясь к активному центру, вызывают конформационные изменения фермента [14, 15].

Известно также, что связывание лигандов может происходить и на периферическом участке, ответственном за субстратное торможение, при этом присоединение любого реагента к периферическому участку предотвращает фосфорилирование каталитического центра [16].

Однако если ионы тетраалкиламмония присоединяются к анионным группировкам фермента, то местом связывания изомеров соединений (I) и (II) должны быть некие гидрофобные участки, а для соединения (I), возможно, и полярная группировка (вследствие высокой электрофильности атома серы, имеющегося в его структуре).

Сопоставление величин  $K_a$  (табл. 1) и  $K_{i, r}$  (табл. 2) показывает, что они очень близки. Это соответствует литературным данным для других фосфорорганических ингибиторов [12, 13, 17]. По-видимому, эффективная сорбция ингибитора и его непродуктивная сорбция с образованием

стереоизомерами тиофосфонатов по схеме А

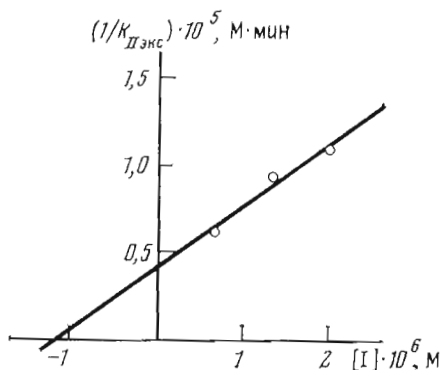


Рис. 2. Зависимость  $1/k_{II \text{ энс}}$  от  $[I]$  при ингибировании ацетилхолинэстеразы таракана (—)-изомером (I). Величины  $[E]_0$  и  $[S]$  как на рис. 1

стереоизомерами тиофосфонатов по схеме А

Таблица 1

Ацетилхолинэстераза бычьих эритроцитов				Бутирилхолинэстераза сыворотки крови лошади			
$K_a, \text{ M}$	$k_p, \text{ мин}^{-1}$	$(k_p/K_a) = k_{II}, \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$\tau_a^*$	$K_a, \text{ M}$	$k_p, \text{ мин}^{-1}$	$(k_p/K_a) = k_{II}, \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$\tau_a^*$
$3,03 \cdot 10^{-5}$	0,75	$2,40 \cdot 10^4$	161	$1,47 \cdot 10^{-4}$	0,32	$2,11 \cdot 10^3$	1,2
$1,60 \cdot 10^{-3}$	0,24	$1,50 \cdot 10^2$		$2,50 \cdot 10^{-4}$	0,43	$1,71 \cdot 10^3$	
$4,40 \cdot 10^{-4}$	0,58	$1,33 \cdot 10^3$	44,5	$7,94 \cdot 10^{-3}$	0,48	$1,50 \cdot 10^2$	1,7
$3,70 \cdot 10^{-3}$	0,11	$3,00 \cdot 10^1$		$4,60 \cdot 10^{-3}$	0,44	$0,87 \cdot 10^2$	

Константы  $K_{i,r}$  (М) ингибирования холинэстераз стереоизомерами соединений (I) и (II)  
Расчет по схеме Б

Ингибитор	Изомер	Ацетилхолинэстераза таракана	Ацетилхолинэстераза эритроцитов быка	Бутирилхолинэстераза сыворожки лошади
(I)	(-)	$1,14 \cdot 10^{-6}$	$1,07 \cdot 10^{-5}$	$1,15 \cdot 10^{-4}$
	(+)	$2,20 \cdot 10^{-3}$	$1,20 \cdot 10^{-1}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$
(II)	(-)	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \cdot 10^{-4}$	$1,20 \cdot 10^{-3}$
	(+)	$7,90 \cdot 10^{-2}$	$1,85 \cdot 10^{-3}$	$5,00 \cdot 10^{-2}$

комплекса EI<sub>r</sub> происходит на одном и том же участке фермента, при этом вклад непродуктивной сорбции зависит от концентрации ингибитора и величины  $K_{i,r}$ . Кроме того, из сравнения уравнений (5) и (6) видно, что вклад константы  $k_p$  не влияет существенно на величину  $K_a$ .

Сопоставление параметров для взаимодействия (+)- и (-)-изомеров соединений (I) и (II) с холинэстеразами показывает, что (-)-изомеры избирательно ингибируют ацетилхолинэстеразы и слабо отличаются от (+)-изомеров при ингибировании бутирилхолинэстеразы (табл. 1). Самые низкие величины  $K_a$  получены для (-)-изомера (I). При этом ацетилхолинэстераза таракана проявляет наиболее высокое сродство к (-)-изомеру (I).

Избирательность действия стереоизомеров оценивали отношением ( $r_a$ ) констант  $k_{i1}$  более активного (-)-изомера к константам для (+)-изомера (табл. 1). При сравнении констант, характеризующих отдельные стадии взаимодействия холинэстераз со стереоизомерами, видно, что избирательность действия последних проявляется в основном через величины  $K_a$ . При взаимодействии стереоизомеров с ацетилхолинэстеразой таракана различия констант  $K_a$  особенно велики (около трех порядков), тогда как значения  $k_p$  довольно близки. Это значит, что активные центры ацетилхолинэстераз, в особенности ацетилхолинэстеразы таракана, обладают высокой стереоспецифичностью, которая проявляется в основном на первой стадии взаимодействия фермента с ингибитором, т. е. при образовании нековалентного комплекса EI. Для фермента таракана дальнейшее превращение комплекса EI в фосфорилированное производное не зависит от стереоизомерии ингибитора (отсутствуют существенные различия в величинах  $k_p$  для (-)- и (+)-изомеров, табл. 1). В случае ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов для стереоизомеров наблюдается различие не только величин  $K_a$ , но и величин  $k_p$  (в 3–5 раз), при этом более высокие величины характеризуют (-)-изомеры (I) и (II). Следовательно, стереоспецифичность активного центра этого фермента проявляется на обеих стадиях взаимодействия с ингибитором при значительном преобладании роли стерического фактора на стадии образования нековалентного комплекса EI.

Трудно представить, что стереоизомеры ингибиторов обладают различной реакционной способностью. Если бы это имело место, то величина  $k_p$  менялась бы для (-)- и (+)-изомера сходным образом у всех холинэстераз. Скорее можно предположить, что конформационные изменения активного центра фермента, которые имеют место в переходном состоянии, различны у разных холинэстераз и по-разному влияют на стереоспецифичность. При этом у ацетилхолинэстеразы эритроцитов, по-видимому, частично сохраняется роль стереоспецифического участка в поддержании структуры переходного комплекса (или фосфорилированного фермента), тогда как у ацетилхолинэстеразы насекомого при соответствующем конформационном изменении активного центра фермента его топография нарушается и стереоспецифичность утрачивается.

Низкие величины  $r_a$  для бутирилхолинэстеразы (табл. 1) указывают на крайне низкую стереоспецифичность этого фермента, что соответствует ранее полученным данным [3, 4, 7, 8].

Кинетические параметры ингибирования каждой из исследованных холинэстераз соединениями (I) и (II) заметно различаются. Это связано с различием в строении ингибиторов. Они имеют одинаковую структуру радикалов при атоме фосфора и различаются строением отщепляемой части. Более сильным ингибитором является соединение (I), имеющее в отщепляемой части сульфидную серу, которая, обладая выраженной электроотрицательностью, способна соединяться с полярными группировками в активном центре фермента. По-видимому, в нековалентном комплексе с ферментом отщепляемая часть соединения (I) связывается с активным центром не только за счет гидрофобных взаимодействий, как бутильный радикал соединения (II), но и за счет полярных взаимодействий, что делает этот комплекс более прочным. Различие в величинах  $K_a$  и  $k_{11}$  для оптических антиподов соединения (I) выше, чем для изомеров (II) при взаимодействии ингибиторов с ацетилхолинэстеразой. Еще более резкое различие антиацетилхолинэстеразного действия показано для оптических изомеров зарина, имеющего ту же структуру фосфорильной части, что и исследованные соединения, а в качестве отщепляемого остатка содержащего  $F^-$  [3]. Роль строения отщепляемой части в избирательности действия стереоизомеров показана и для других соединений с центром асимметрии на атоме фосфора [8].

Избирательность действия стереоизомеров зависит также и от структуры радикалов при атоме фосфора. При ингибировании ацетилхолинэстеразы эритроцитов соединением, аналогичным по строению (I), но содержащим в фосфорильной части этоксигруппу вместо изопропилоксигруппы, в сходных условиях эксперимента наблюдалось значительно меньшее различие величин  $k_{11}$  для (-) и (+)-изомеров (всего лишь в 9 раз) [8]. Только определенная структура молекулы ингибитора, имеющая наибольшую комплементарность стереоспецифическим участкам активного центра, обеспечивает высокую избирательность действия стереоизомеров. Так, из исследованных стереоизомеров метилтиофосфонатов (-)-изомер (I) является избирательным ингибитором ацетилхолинэстеразы таракана.

Принимая во внимание, что ингибирование активного центра ацетилхолинэстеразы нервной системы является основным звеном в механизме действия фосфорорганических инсектицидов, использование более высокой стереоспецифичности ацетилхолинэстеразы насекомого по сравнению с ферментом млекопитающих можно рассматривать в качестве одного из направлений поиска избирательных инсектицидов.

### Экспериментальная часть

Использован растворимый препарат ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) таракана *Periplaneta americana*, выделенной из нервных ганглиев и частично очищенной с помощью ультрацентрифугирования при 100 000 *g* и гель-хроматографии на колонках с сефадексом G-200 по методике, описанной ранее [18]. Препарат не содержал других холинэстераз, а также карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1.). Растворы фермента имели уд. акт. 0,3–0,7 ед. акт./мг белка (рН 7,5; 0,05 М фосфатный буфер, 0,002 М ацетилтиохолиндиодид \*). Источником ацетилхолинэстеразы из бычьих эритроцитов был растворимый препарат отечественного производства с уд. акт. 0,8 ед. акт./мг белка (2 мМ ацетилтиохолиндиодид). Перед использованием в опытах фермент подвергался дополнительной очистке гель-хроматографией на колонках с сефадексом G-200. Использовался отечественный препарат бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади с активностью 8,6 ед. акт./мг белка (0,02 М бутирилтиохолиндиодид).

Оптически активные фосфорорганические соединения — О-изопропил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонат (I) и О-изопропил-S-*n*-бутилметилтиофосфонат (II) — были синтезированы взаимодействием соответствующих натриевых солей хиральных кислот фосфора с галоидалкилами по известной методике [17].

\* Под действием фермента таракана ацетилтиохолин гидролизуетсся с большей скоростью, чем пропионтиохолин, при оптимальной концентрации этих субстратов, равной 2 мМ; бутирилтиохолин не гидролизуетсся.

*Кинетика ингибирования* холинэстераз фосфорорганическими соединениями исследовалась при 25°С в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5. Фермент инкубировали с ингибитором в течение определенного времени (1–5 мин), по истечении которого определяли остаточную активность по методу Эллмана и др. [19]. В качестве хромогена использовали 5,5'-ди-тиобис(2-нитробензойную) кислоту (Sigma). Исследование проводили при 3–4 концентрациях ингибитора. Величины  $k_{II \text{ энс}}$  определяли графически [12]. В системе координат  $\lg v_0/v_t - t \cdot [I]$  были получены прямые, наклон которых ( $\text{tg } \alpha$ ) при данной  $[I]$  соответствовал  $k_{II \text{ энс}}/2,3$ . Для оценки параметров по схеме (А) использовали величины  $1/k_{II, i} = \Delta t/2,3 \text{ tg } \alpha$  при  $\Delta t = 1$  мин. Величины  $k_{II, i}$  для схемы (А) рассчитывали также по уравнению (1), при этом вместо  $v_0$  определяли начальную скорость гидролиза субстрата  $v_{0, i}$  в присутствии концентрации ингибитора  $[I]$ , используемой для определения  $k_{II, i}$ . Использование величины  $v_{0, i}$  позволило исключить вклад непродуктивной сорбции в торможение исходной активности фермента. Величины кинетических параметров, полученные двумя способами, имели хорошее совпадение.

*Концентрацию активных центров* фермента определяли методом титрования высокоспецифическим ингибитором (метилсульфометилатом О-этил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфоната, синтезированным Н. Н. Годовиковым в лаборатории М. И. Кабачника, ИНЭОС АН СССР, Москва).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фукуто Т. Р. Бюл. ВОЗ, 1972, т. 44, ч. 1, № 1–3, с. 33–43.
2. Aaron H. S., Michel H. O., Witten B., Miller J. I. J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 1, p. 456–458.
3. Boter H. L., van Dijk C. Biochem. Pharmacol., 1969, v. 18, № 10, p. 2403–2407.
4. Вайсберг М. С., Шипов А. Э., Мазрюкова Т. А., Мандельштам Ю. Е., Брик И. Л., Федин А. Н., Каган Ю. С., Ершова Е. А., Савченко К. Н. В кн.: Химия физиологически активных веществ. Вып. 2. Нальчик, 1978, с. 68–75.
5. Auditore J. V. Int. J. Neuropharmacol., 1964, v. 3, № 6, p. 599–603.
6. Умс А. Дж. Дж. Бюл. ВОЗ, 1972, т. 44, ч. 1, № 1–3, с. 118–119.
7. Kabachnik M. I., Mazyukova T. A. In: Adv. in Pesticide Sci. Pergamon Press, 1979, v. 21, part 2, p. 120–129.
8. Волкова Р. И., Бресткин А. П., Кочерова Л. М. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 5, с. 803–809.
9. Brick I. L., Brestkin A. P., Mandelsham Yu. E. Insect. Biochem., 1979, v. 9, p. 397–401.
10. Main A. R. Science, 1964, v. 144, № 3621, p. 992–993.
11. Aldridge W. N., Reiner E. Biochem. J., 1969, v. 115, № 2, p. 147–160.
12. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалиев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. Докл. АН СССР, 1971, т. 200, № 1, с. 103–106.
13. Попов С. П., Годовиков Н. Н., Любимов В. С., Кабачник М. И. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 289–294.
14. Григорьева Г. М. Биохимия, 1965, т. 30, вып. 2, с. 415–422.
15. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. 248 с.
16. Reiner E. In: Second international meeting on cholinesterases. Bled, Jugoslavia, Sept. 17–21, 1983, Abstracts, p. 10.
17. Махаева Г. Ф., Шагаева Г. А., Янковская В. Л., Фетисов В. П., Лошадкин Н. А., Маргыннов И. В., Хаскин Б. А., Шелученко О. Д. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1347–1352.
18. Григорьева Г. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 1982, т. 18, № 2, с. 205–206.
19. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstoun R. M. Biochem. Pharmac., 1961, v. 7, № 1, p. 88–95.

Поступила в редакцию

4.X.1985

После доработки

27.I.1986

SELECTIVITY OF THE ACTION OF STEREOISOMERS OF THIOPHOSPHONATES:  
WITH ASYMMETRIC PHOSPHORUS ATOM ON CHOLINESTERASES

GRIGORJEVA G. M., KRASNOVA T. I., ABDUVAKHABOV A. A. \*,  
ABDUKAKHAROV V. S. \*

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad; \*Institute of Bioorganic  
Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent*

The inhibitory action of stereoisomers of organophosphorous compounds with asymmetric phosphorus atom,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}(\text{CH}_3)\overset{*}{\text{P}}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$  and  $(\text{CH}_3)_2\text{CHO}(\text{CH}_3)\cdot\overset{*}{\text{P}}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , on acetylcholinesterase from nervous ganglia of cockroach *Periplaneta americana* and bovine erythrocytes as well as on horse serum butyrylcholinesterase was studied at pH 7,5 and 25° C. It was found that the interaction of the inhibitors with cholinesterases has a complex type and includes reversible and irreversible stages resulting in the formation of noncovalent enzyme-inhibitor complex and phosphorylation of the enzyme, respectively. The affinity constants  $K_a$ , phosphorylation rate-constants  $k_p$ , bimolecular reaction constants  $k_{II}$  for enzyme inhibition, as well as the dissociation constants  $K_{i,r}$  for unproductive sorbtion of inhibitor were determined. Much greater selectivity in the action of (-)isomers of both thiophosphonates, as compared to (+)isomers, on acetylcholinesterases was observed, the effect being most pronounced for the cockroach enzyme. On the other hand, no marked differences were discerned between isomers in their binding to butyrylcholinesterase. The stereospecificity of the enzymes under study at different stages of interaction with the inhibitors was characterized.