



УДК 577.151.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 1-НАФТОКСИАЛКАНТИОЛОВ  
С ЦИТОХРОМОМ P-450 *MUSCA DOMESTICA*  
И ИХ СИНЕРГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ  
К КАРБАРИЛУ

Сылько Н. М., Леонова И. Н., Салганик Р. И.\*

Новосибирский отдел ВНИИ химических средств защиты растений;

\* Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск

Для выяснения возможности усиления действия инсектицидов на насекомых исследовано взаимодействие соединений с общей формулой  $RO(CH_2)_nSH$  ( $R - \alpha$ -нафтил,  $n=2-7$ ) с микросомальным цитохромом P-450 *Musca domestica*. Показано, что наличие SH-группы значительно увеличивает ингибиторную активность этих соединений в сравнении с  $n$ -алкил-1-нафтиловыми эфирами. Степень ингибирования зависит от расстояния между ароматическим ядром и сульфгидрильной группой, достигая максимума при  $n=3$ . Полученные биохимические данные хорошо согласуются с увеличением этими соединениями токсичности карбарила для комнатной мухи.

Известно, что широкое применение химических средств защиты растений привело к возникновению у насекомых резистентности к инсектицидам; особо важную роль в ее развитии играет детоксикация инсектицидов за счет увеличения активности ферментных систем, ответственных за эти процессы, таких, как микросомальные монооксигеназы, эстеразы и трансферазы полярных остатков. Ранее нами было показано, что под действием разных инсектицидов происходит отбор мутантов насекомых, отличающихся высокой активностью некоторых из этих ферментных систем [1]. Этим явлением можно объяснить тот факт, что многие коммерческие инсектициды утратили свою активность.

Эмпирический поиск новых инсектицидов требует больших затрат, а эффективность его крайне низка [2]. Иным способом решения этой проблемы является применение синергистов, повышающих токсическое действие инсектицида и подавляющих резистентность к нему у насекомых. При исследовании механизма синергического действия некоторых продуктов переработки кунжутного масла Сун и Джонсон в 1960 г. впервые предположили, что они усиливают токсичность инсектицидов посредством ингибирования окислительного метаболизма последних [3]. Важнейший коммерческий представитель этого класса соединений, пиперонилбутоксид (ПШБ), используется в настоящее время в композициях с пиретроидными инсектицидами; однако высокая цена этого продукта ограничивает его применение.

В ряде работ в качестве заменителей ПШБ предлагаются такие классы соединений, как арил-2-пропилиловые эфиры [4], эфиры оксимов [5], замещенные имидазолы [6], 1,2,3-бензтриадиазолы [7].

Имеется настоятельная необходимость в разработке новых синергистов инсектицидов, отвечающих как экономическим требованиям, так и условиям безопасности и охраны окружающей среды. Способом решения этой проблемы является разработка ингибиторов ферментов детоксикации на основе рационального подхода: понимания устройства активного центра фермента, метаболизирующего инсектицид, особенностей субстратов и их взаимодействия с ферментом.

Недавно нами показано, что 1-нафтоксиалкантиолы тормозят активность микросомальных монооксигеназ из печени крыс, подавляя такие реакции, как ароматическое гидроксипирование бенз(*a*)пирена и анилина,

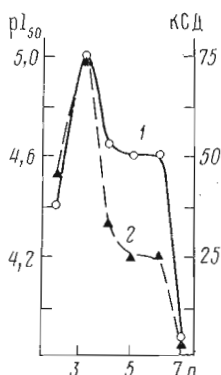


Рис. 1

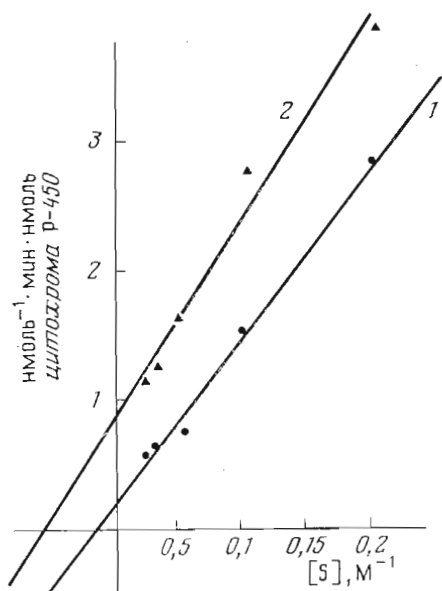


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степени ингибирования ( $pI_{50}$ ) активности бенз(*a*)пиренгидроксилазы *M. domestica* (1) и синергического действия по отношению к карбарилу (КСД) (2) от длины цепи 1-нафтоксиалкантолов (I) – (VI)

Рис. 2. График Лайнуивера – Берка для реакции окисления бенз(*a*)пирена микросомальной фракции комнатной мухи, чувствительной к инсектицидам, без ингибитора (1) и с ингибитором (II) (2) в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 0,05 М трис-НСl-буфер, 5 мМ  $MgCl_2$ , 0,2–0,3 мг микросомального белка, [ $G^3H$ ]бенз(*a*)пирен в концентрациях, указанных на рисунке, рН 7,9

а также N-деметилирование аминопирина [8]. Ароматические ядра 1-нафтоксиалкантолов ввиду их гидрофобности обеспечивают взаимодействие с белковой зоной связывания в активном центре цитохрома Р-450, а высоконуклеофильная сульфгидрильная группа должна взаимодействовать с гемовым атомом железа и дополнительно блокировать активный центр фермента. Выбор оптимального расстояния между ароматическим ядром и SH-группой может сыграть решающую роль при оптимизации структуры синергиста.

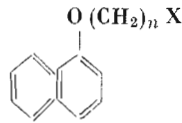
В настоящей работе нами исследовано взаимодействие разных соединений этого класса с цитохромом Р-450 *Musca domestica* и синергизм их по отношению к карбарилу (N-метил-1-нафтилкарбамату).

Как видно из табл. 1 и рис. 1, ингибиторная активность 1-нафтоксиалкантолов (I) – (VI) ( $pI_{50}$ ) зависит от расстояния между нафталиновым ядром и атомом серы: оптимальное взаимодействие с активным центром фермента проявляется в соединении (II) при  $n=3$ . При увеличении длины углеводородной цепи величина  $pI_{50}$  падает, возможно из-за стерических затруднений либо из-за связывания с другими гидрофобными зонами, которое меняет пространственную ориентацию молекулы ингибитора и нарушает его взаимодействие с цитохромом Р-450.

Известно, что для взаимодействия химических соединений с ферментами метаболизма ксенобиотиков имеет значение степень липофильности этих соединений [9]. Так, Уилкинсон и Хетнарски [6] показали, что с удлинением углеводородных цепей 1-алкилимидазолов и с возрастанием их липофильности растет и их способность тормозить активность микросомальных монооксигеназ насекомых и увеличивается их синергическое действие по отношению к карбарилу. Максимум синергизма обнаруживается при определенном значении липофильности ( $\pi$ ). Аналогичные данные были получены Девакумаром с сотр. [10] в отношении ряда бензо-1,3-диоксолов.

Нами показано, что липофильность – важный, но не единственный

Относительный показатель липофильности  $\Delta R_m$ , характеристики взаимодействия с микросомальным цитохромом P-450 комнатной мухи и синергическая активность по отношению к карбарилу соединений (I)–(VII), (IX)–(XIII) с общей формулой



Номер соединения	n	X	$\Delta R_m^*$	$pI_{50}$	LD <sub>50</sub> карбарила, мкг/г	БСД
I	2	SH	0,0403	4,41	109,0±20,5	45,9
II	3	SH	0,1204	5,01	67,5±4,5	74,1
III	4	SH	0,2361	4,65	151,5±31,5	33,0
IV	5	SH	0,3188	4,61	202,5±51,5	24,7
V	6	SH	0,4099	4,61	196,5±8,5	25,4
VI	7	SH	0,5105	3,88	1433,5±230,8	3,5
VII	3	CH <sub>3</sub> S	0,1513	3,84	243,0±31,3	20,6
IX	3	H	0,1427	<2,30	202,8±3,0	24,7
X	4	H	0,2950	<2,30	211,5±17,0	23,6
XI	5	H	0,4372	<2,30	>2000	—
XII	6	H	0,4929	<3,00	>2000	—
XIII	7	H	0,6298	<3,00	>2000	—

\* Относительный показатель липофильности  $\Delta R_m$  соединений (I)–(VII) и (IX)–(XIII) определен хроматографическим методом по [23] в сравнении с 1-этоксинафталином (VIII).

фактор, определяющий взаимодействие 1-нафтоксиалкантиолов с активным центром цитохрома P-450 и увеличене токсического действия карбарила. Действительно, тиолы (I)–(VI) и алкилнафтиловые эфиры (IX)–(XIV) при одинаковых значениях  $n$  имеют сходные значения относительного показателя липофильности  $\Delta R_m$  и сходную структуру (табл. 1), однако соединения (I)–(VI) являются более сильными ингибиторами активности цитохрома P-450 и более эффективными синергистами инсектицидного действия карбарила.

Единственная разница в структуре 1-нафтоксиалкантиолов и алкилнафтиловых эфиров связана с наличием у соединений первой группы SH-фрагмента, который при оптимальном удалении от гидрофобного ароматического ядра способен блокировать активный центр цитохрома P-450. Замена тиольного атома водорода препятствует взаимодействию атома серы с гемовым железом. Так, тиоэфир (VII) значительно слабее тиола (II) тормозит каталитическую активность цитохрома P-450 при сходных значениях липофильности и аналогичной геометрии молекулы.

Для соединения (II), обладающего наиболее выраженной ингибиторной активностью, был записан дифференциальный спектр поглощения его комплекса с микросомальным цитохромом P-450 комнатной мухи. Этот спектр с  $\lambda_{\max}$  436,5 нм и  $\lambda_{\min}$  414 нм нельзя отнести ни к одному из известных типов спектров поглощения цитохрома P-450 в комплексе с субстратами. Для  $n$ -бутил-1-нафтилового эфира (X) в этих же условиях не удалось получить дифференциальный спектр его комплекса с цитохромом P-450. Ранее было показано, что алкил-1-нафтиловые эфиры связываются с микросомальным цитохромом P-450 из печени крыс по типу 1 [8]. Отсутствие у этого ряда химических соединений спектров поглощения, характеризующих связывание их с цитохромом P-450 мух, по-видимому, объясняется различиями в геометрии активного центра этих ферментов или в их окружении в микросомальной мембране.

Рядом авторов было показано, что у чувствительных к инсектицидам линий насекомых отсутствует связывание с цитохромом P-450 по типу 1 [11, 12]. Предполагают, что зона связывания по типу 1 у цитохрома P-450 насекомых таких линий имеется, но она, возможно, более удалена

Кинетические параметры реакции гидроксипирования бенз(*a*)пирена цитохромом P-450 микросомальной фракции броек комнатной мухи в присутствии соединения (II)

Концентрация соединения (I)	$K_m$ , мкМ	$V_{max}$ , нмоль/(мин·нмоль P-450)
—		
(Контроль)	76,9	5,5
$10^{-5}$ M	32,4	2,86
$5 \cdot 10^{-5}$ M	20,2	1,21

от гемового железа, чем в активном центре того же фермента, выделенного из других источников [13]. Совпадение оптимальных значений  $n$  в ряду соединений (I)–(VI) при ингибировании ими активности микросом печени крыс [8] и домашней мухи и, следовательно, вполне сопоставимое расстояние от гемового железа до зоны связывания по типу 1 в этих ферментах не подтверждает это предположение. Появление для 1-нафтоксилалкантиолов необычных спектров поглощения, характеризующих их связывание с цитохромом P-450 *M. domestica*, обусловлено, очевидно, наличием тиольной группы у этих соединений.

При определении кинетических параметров ингибирования бенз(*a*)пиренгидроксилазы микросом мух соединением (II) показано, что добавление этого соединения уменьшает в сравнении с контролем как величину  $K_m$ , так и  $V_{max}$  (табл. 2); следовательно, ингибирование происходит по смешанному механизму. График Лайнуивера — Берка, полученный для этой реакции (рис. 2), также типичен для ингибирования смешанного типа [14], который допускает участие активных метаболитов в этом процессе. Из литературы известно, что окислительный метаболизм алкилнафтиловых эфиров приводит преимущественно к их деалкилированию [15]. Однако если бы подобная реакция протекала при инкубации изучаемых соединений (I)–(VI) с микросомами, то ингибиторные свойства 1-нафтоксилалкантиолов и *n*-алкил-1-нафтиловых эфиров в значительной степени обеспечивались бы промежуточным образованием  $\alpha$ -нафтола и были бы вполне сравнимы.

Между биологической активностью исследованных соединений *in vitro* и в целом организме могут быть значительные различия вследствие существования тканевых и клеточных барьеров, промежуточных мишеней и других факторов. Однако мы наблюдали хорошее соответствие между ингибирующим действием соединений (I)–(VI) и их синергической активностью в отношении карбарила (рис. 1).

Наличие гидрофобного ядра в тиоле (II), сульфгидрильной группы, способной взаимодействовать с гемовым железом цитохрома P-450, и полиметиленового мостика оптимальной длины обеспечивает атаку гема цитохрома P-450 и его инактивацию. С этим свойством, очевидно, и связана высокая эффективность соединения (II) как ингибитора каталитической активности цитохрома P-450, способность его служить синергистом карбарила.

Представляется вероятным, что конструирование и использование ингибиторов ферментов, инактивирующих пестициды, на основе понимания структуры их активных центров может послужить эффективным способом усиления токсического действия инсектицидов и преодоления резистентности членистоногих вредителей сельского хозяйства к средствам химической борьбы с ними.

#### Экспериментальная часть

Использованные в работе 1-нафтоксилалкантиолы (II), (IV)–(VI) синтезированы по методу [16], *n*-алкилнафтиловые эфиры (VII)–(XII) — по методу [17], точки кипения полученных соединений соответствовали литературным значениям. Соединение (I) получено из 1-( $\alpha$ -нафтоксил)-2-бромэтана по методике [16], т.пл. 28,0–29,5° С (из этанола); аналогично из 1-( $\alpha$ -нафтоксил)-4-бромбутана получено со-

единение (III), т. пл. 44–46° С (из этанола). Сульфид (VII) синтезирован реакцией глиола (II) с метилиодидом в присутствии  $K_2CO_3$ ; т. кип. 148–149° С/1 мм рт. ст. Элементные составы соединений (I), (III) и (VII) определены из масс-спектров высокого разрешения, снятых на приборе MS-902.

Использованы следующие коммерческие химические реактивы: NADPH (Reanal, ВНР), 3,4-бенз(*a*)пирен (Fluka, Швейцария), [ $G\text{-}^3H$ ]бенз(*a*)пирен (уд. акт. 40 мКи/ммоль; Amersham, Англия) и карбарил (United Carbide, США).

**Методы биохимического анализа.** Микросомальную фракцию выделяли из брюшек мух, чувствительных к инсектицидам, методом дифференциального центрифугирования, как описано нами ранее [18]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [19], содержание цитохрома P-450 — по методу Омурэ и Сато [20] на дифференциальном спектрометре Spesord M40 (ГДР). Каталитическую активность цитохрома P-450 оценивали по скорости гидроксирования [ $G\text{-}^3H$ ]бенз(*a*)пирена [21]. Величину  $rI_{50}$  рассчитывали графическим методом, при этом на оси ординат откладывали скорость реакции в процентах, на оси абсцисс — логарифм концентрации ингибитора. Для определения типа ингибирования  $K_m$  и  $V_{max}$  использовали бенз(*a*)пирен в концентрациях 20–80 мкМ. Расчет кинетических параметров проводили графическим методом Лайнуивера — Берка [14].

**Токсикологические эксперименты.** Синергическую активность соединений (I)–(XIII) определяли по увеличению токсичности карбарила на 3–4-дневных самках имаго комнатной мухи *M. domestica*, чувствительной к инсектицидам. Растворы карбарила и этих соединений в ацетоне готовили в соотношении 1 : 5 и наносили топикально по 1 мкл на дорсальную поверхность спинки насекомого, анестезированного диэтиловым эфиром. Использовали пять концентраций смеси карбарил — синергист и по 40 насекомых на каждую концентрацию.

Контрольные группы насекомых обрабатывали эквивалентным количеством растворителя. Насекомых помещали в отдельные стаканы и снабжали питьем в виде сахарного сиропа. Учет смертности проводили через 24 ч. Летальную дозу, вызывающую смертность 50% насекомых ( $LD_{50}$ ), рассчитывали по линиям регрессии в координатах пробит смертности — логарифм концентрации инсектицида [22]. Синергическую активность оценивали по коэффициенту синергического действия (КСД), который рассчитывали по соотношению  $LD_{50}$  карбарила к  $LD_{50}$  карбарила с синергистом. Из-за высокой толерантности насекомых к карбарилу нельзя было точно определить значение его  $LD_{50}$ . Экстраполяция показала, что  $LD_{50}$  карбарила составляет 5000 мкг/г веса. Это значение  $LD_{50}$  использовали для расчета КСД.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nedelkina S. V., Leonova I. N., Slynko N. M., Salganik R. I. The 5th International conference on biochemistry, biophysics and induction of cytochrome P-450. Budapest, 1985, p. 144.
2. Sun Y. P., Johnson E. R. J. Agric. Food Chem., 1960, v. 8, № 5, p. 261–266.
3. Мельников Н. Н. Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1984, т. 29, № 1, с. 3–9.
4. Sacher A., Reuwen M., Metcalf R. L., Fukuto T. R. J. Agric. Food Chem., 1968, v. 16, № 5, p. 779–786.
5. Hennessy D. J. In: Biochemical toxicology of insecticides/Eds O'Brien R. D., Iamamoto I. N. Y.: Acad. Press, 1970, p. 105–114.
6. Wilkinson C. F., Helnarski K., Cantwell G. P., Di Carlo F. J. Biochem. Pharmacol., 1974, v. 23, № 17, p. 2377–2386.
7. Gil D. L., Wilkinson C. F. Pestic. Biochem. and Physiol., 1976, v. 6, № 4, p. 338–344.
8. Slynko N. M., Leonova I. N., Slepneva I. A., Krainev A. G., Weiner L. M. The 5th International conference on biochemistry, biophysics and induction of cytochrome P-450. Budapest, 1985, p. 83.
9. Hansch C. Drug Metab. Revs., 1972, v. 1, № 1, p. 1–56.
10. Devakumar C., Saxena V. S., Mukerjee S. K. Agric. Biol. Chem., 1985, v. 49, № 3, p. 725–730.
11. Kulkarni A. P., Mailman B. B., Hodgson E. J. Agric. Food Chem., 1975, v. 23, № 2, p. 177–183.
12. Hodgson E., Tate L. G., Kulkarni A. P., Plapp F. W., Jr. J. Agric. Food Chem., 1974, v. 22, № 3, p. 360–366.
13. Hodgson E., Motoyama N. CIBA Found Symp./Eds Evered D., Collins J. M. London: Pitman Books, 1984, v. 102, p. 167–189.

14. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982, с. 481—545.
15. Hunter W. H., Wilson P. Xenobiotica, 1981, v. 11, № 3, p. 179—183.
16. Алферьев И. С., Вайнер Л. М., Крайнев А. Г., Слышко И. М. Докл. АН СССР, 1984, т. 277, № 2, с. 371—374.
17. Gray C. W., Jones B. J. Chem. Soc., 1954, p. 678—683.
18. Pankova T. G., Leonova I. N., Igonina T. M. In: Application of biochemical micro-methods for the investigation of tropical disease pathogens. Geneva: WHO, 1981, p. 159—163.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. Y. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 2, p. 265—275.
20. Omura T., Sato R. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 3, p. 2375—2385.
21. Depierre J. V., Morron M. S., Johanneson K. A. N., Ernster L. A. Anal. Biochem., 1975, v. 63, № 2, p. 470—484.
22. Попов П. В. Химия в сел. хоз-ве, 1965, № 10, с. 72—79.
23. Burke M. D., Mayer R. T. Chem.-Biol. Interact., 1983, v. 45, № 3, p. 243—258.

Поступила в редакцию  
16.1.1986

## THE INTERACTION OF 1-NAPHTHOXYALKANETHIOLS WITH CYTOCHROME P-450 *MUSCA DOMESTICA* AND THEIR SYNERGISTIC ACTIVITY WITH CARBARYL

SLYNKO N. M., LEONOVA I. N., SALGANIK R. I.\*

*Novosibirsk's Department of Institute of Chemical Means for  
Plant Protection;*

*\*Institute of Cytology and Gene'ics, Siberian Branch of Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The interaction of microsomal cytochrome P-450 *Musca domestica* and compounds  $RO(CH_2)_nSH$  ( $R=1$ -naphthyl,  $n=2-7$ ) was studied to enhance the toxicity of insecticides. It was shown that SH-group considerably increases the inhibitory activity of the compounds as compared with 1-*n*-alkoxynaphthalenes. The inhibitory potency depends on the distance between naphthalene nucleus and SH-group, with the maximum at  $n=3$ . The data obtained are in a good agreement with the increase of the carbaryl toxicity on the houseflies by these compounds.