



УДК 547.26'118:577.152.311.042:541.697+519.237.5

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИАЛКИЛ( $\alpha$ -КАРБОМЕТОКСИ- $\beta,\beta,\beta$ -ТРИФТОРЭТИЛ) ФОСФАТОВ С ЭСТЕРАЗАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Махаева Г.Ф., Фетисов В.И., Соколов В.Б.,  
Янковская В.Л., Горева Т.В., Малыгин В.В.,  
Безноско Б.К., Галенко Т.Г., Коломиец А.Ф.,  
Мартынов И.В.*

*Институт физиологически активных веществ Академии наук СССР,  
Черноголовка*

Исследована кинетика взаимодействия диалкил( $\alpha$ -карбометокси- $\beta,\beta,\beta$ -трифторэтил)фосфатов  $(RO)_2P(O)OCH(CF_3)COOMe$  (I)–(VIII) ( $R=Me, Et, Pr, Pr^i, Bu, Bu^i, Am, Hex$ ) с ацетилхолинэстеразой эритроцитов человека, бутирилхолинэстеразой сыворотки лошади, карбоксилэстеразой печени свиньи и определена острая токсичность соединений для белых мышей. Соединения (I)–(VIII) не гидролизуются карбоксилэстеразой, являются слабыми необратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы ( $k^{II}=10^2-10^4 M^{-1}\cdot min^{-1}$ ) и значительно эффективнее ингибируют бутирилхолинэстеразу и карбоксилэстеразу ( $k^{II}=10^3-10^7 M^{-1}\cdot min^{-1}$ ). Методами математического моделирования проведен анализ зависимости антиферментативной активности от структуры. Показано, что при ингибировании карбоксилэстеразы и бутирилхолинэстеразы данными соединениями вклад гидрофобных взаимодействий одинаков и значительно выше, чем при ингибировании ацетилхолинэстеразы. Наличие алкоксильных заместителей с разветвленным в  $\alpha$ -положении приводит к резкому снижению констант ингибирования холинэстераз и изменению механизма ингибирования на обратимый в случае карбоксилэстеразы. Методом многомерного регрессионного анализа с применением билинейной модели типа Кубичи установлено, что влияние стерических факторов проявляется на стадии фосфорилирования фермента. Показано, что низкая токсичность соединений (I)–(VIII) и отсутствие ее зависимости от гидрофобности обусловлены как невысокой собственной антиацетилхолинэстеразной активностью соединений, так и значительно возрастающей по мере увеличения гидрофобности разницей между средством ингибиторов к ферментам, являющимся «местами потери», и их антиацетилхолинэстеразной активностью.

С целью поиска избирательных инсектицидов, малотоксичных для теплокровных, нами исследован ряд диалкил( $\alpha$ -карбометокси- $\beta,\beta,\beta$ -трифторэтил)фосфатов  $(RO)_2P(O)OCH(CF_3)COOCH_3$  ( $R=Me$  (I),  $Et$  (II),  $Pr$  (III),  $Pr^i$  (IV),  $Bu$  (V),  $Bu^i$  (VI),  $Am$  (VII),  $Hex$  (VIII)) \*.

Известно, что токсичность фосфорорганических соединений определяется как их собственной антиацетилхолинэстеразной активностью, так и процессами, происходящими с веществом в организме на пути к биомишени [1]. Связывание с бутирилхолинэстеразой и особенно с карбоксилэстеразой представляет собой существенные «места потери» фосфорорганических соединений на пути к биомишени. Возможен и карбоксилэстеразный гидролиз фосфорорганических соединений, содержащих карбалкоксильные группировки, в результате которого образуются нетоксичные продукты [2, 3].

В настоящей работе проведено исследование способности соединений (I)–(VIII) к гидролизу под действием карбоксилэстеразы печени свиньи (КФ 3.1.1.1) и изучена их антиферментативная активность в отношении ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади (КФ 3.1.1.8) и карбоксилэстеразы печени свиньи. Антиферментативную активность необратимых ингибиторов оценивали по величине бимолекулярной константы скорости ( $k^{II}$ ) взаимодействия соединений с ферментом. Была исследована также острая токсичность синтезированных соединений.

Установлено, что исследуемые соединения необратимо ингибируют все

\* Синтез соединений (I)–(VIII) будет опубликован отдельно.

**Бимолекулярные константы скорости ингибирования ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека, бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади, карбоксилэстеразы печени свиньи диалкил ( $\alpha$ -карбометокси- $\beta,\beta,\beta$ -трифторэтил) фосфатами, острая токсичность ингибиторов, аддитивные константы гидрофобности ( $\Sigma\pi$ ) алкильных заместителей и стерические константы Чартона алкоксильных заместителей ( $\Sigma E_s^V(RO)$ )\***

Соединение	R	$k^{II} \cdot 10^{-5}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$			LD <sub>50</sub> , мг·кг <sup>-1</sup>	$\Sigma\pi$	$\Sigma E_s^V(RO)$
		ацетилхолинэстераза	бутирилхолинэстераза	карбоксилэстераза			
I	Me	0,00435	0,0249	0,05	1040	1,0	0,72
II	Et	0,0138	0,299	0,20	2000	2,0	0,96
III	Pr	0,0343	2,45	4,98	1140	3,0	1,12
IV	Pr <sup>i</sup>	0,00297	0,360	**	1500	2,6	1,50
V	Bu	0,233	16,6	19,95	1460	4,0	1,16
VI	Bu <sup>i</sup>	0,135	12,2	6,16	890	3,6	1,24
VII	Am	0,598	26,2	123,0	1140	5,0	1,16
VIII	Hex	0,058	0,467	315,0	1000	6,0	1,32

\* Среднеквадратичное отклонение полученных величин констант не превышает 10 %.

\*\* Обратимый ингибитор карбоксилэстеразы  $K_1 = 9,5 \cdot 10^{-4} M$ .

три фермента. Исключением является взаимодействие изопропильного производного (IV) с карбоксилэстеразой, где наблюдается обратимое конкурентное торможение. Карбоксилэстеразный гидролиз соединений (I) — (VIII) не обнаружен, что может быть обусловлено высокими скоростями конкурирующего процесса ингибирования карбоксилэстеразы данными соединениями. Константы скорости ингибирования эстераз млекопитающих соединениями (I) — (VIII) приведены в таблице.

Как видно из таблицы, исследованные соединения являются слабыми или средней силы ингибиторами ацетилхолинэстеразы ( $k^{II} = 10^2 - 10^4 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ) и значительно сильнее ингибируют бутирилхолинэстеразу и карбоксилэстеразу ( $k^{II} = 10^3 - 10^7 M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ), причем константы ингибирования двух последних ферментов близки.

С увеличением длины алкоксильных радикалов происходит возрастание ингибиторной активности соединений в отношении всех трех ферментов. Для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы наблюдается максимум при  $n=5$ . При этом возрастает различие между ингибированием ацетилхолинэстеразы — «фермента-мишени» и других эстераз — бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы. Так, для соединения (I)  $\Delta \lg k^{II} = 1,06$ , а для соединения (VII)  $\Delta \lg k^{II} = 2,31$  ( $\Delta \lg k^{II} = \lg k_A^{II} - \lg k_B^{II}$ ). Здесь и далее константы с индексом А, Б, К соответствуют значениям, полученным для ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы.

С целью нахождения количественных закономерностей, связывающих структуру изученных соединений с их антиферментативной активностью, методами математического моделирования нами исследована связь расчетных констант гидрофобности заместителей ( $\Sigma\pi$  — сумма констант гидрофобности заместителей по Хэнчу [4]) с константами скорости ингибирования  $k^{II}$ .

Зависимость  $\lg k^{II}$  от гидрофобности хорошо описывается линейными уравнениями (1) — (3) для соединений с нормальными алкоксильными радикалами и с алкоксильными радикалами, не содержащими разветвлений у  $\alpha$ -углеродного атома (R=Me, Et, Pr, Bu, Bu<sup>i</sup>, Am в случае ацетилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы и R=Me, Et, Pr, Bu, Bu<sup>i</sup> для бутирилхолинэстеразы). При дальнейшем повышении гидрофобности зависимости становятся нелинейными.

$$\lg k_A^{II} = 2,176 + (0,527 \pm 0,049) \cdot (\Sigma\pi) \quad (1)$$

$$n=6, \quad r=0,983, \quad s=0,156, \quad F=116,7 \quad (p<0,01)$$

$$\lg k_B^{II} = 2,487 + (0,966 \pm 0,046) \cdot (\Sigma\pi) \quad (2)$$

$$n=5, \quad r=0,997, \quad s=0,113$$

$$\lg k_{\text{K}}^{\text{II}} = 2,793 + (0,860 \pm 0,063) \cdot (\Sigma\pi) \quad (3)$$

$$n=6, \quad r=0,989, \quad s=0,203$$

где  $n$  — количество точек (количество анализируемых соединений),  $r$  — коэффициент корреляции;  $s$  — стандартное отклонение,  $F$  — критерий Фишера,  $p$  — доверительная вероятность для критерия Фишера.

Сопоставление коэффициентов при  $(\Sigma\pi)$  в уравнениях (1) — (3) позволяет оценить роль гидрофобных взаимодействий в процессе ингибирования ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы синтезированными фосфатами. Видно, что коэффициенты при  $\Sigma\pi$  в случае карбоксилэстеразы и бутирилхолинэстеразы статистически неотличимы (доверительные интервалы перекрываются) и существенно выше, чем в случае ацетилхолинэстеразы, что свидетельствует о более выраженном вкладе гидрофобных взаимодействий при ингибировании первых двух ферментов по сравнению с ингибированием ацетилхолинэстеразы.

Нами обнаружено влияние стерических факторов на ингибиторную способность соединений. Так, появление разветвления в  $\alpha$ -положении (изопропильный заместитель) приводит к резкому снижению констант ингибирования ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы и изменению механизма ингибирования на обратимый в случае карбоксилэстеразы.

Детальный анализ влияния структуры на ингибиторную способность исследуемых соединений удобно проводить с использованием многомерного регрессионного анализа связи «структура — активность». Нами построен ряд моделей «гидрофобность — ингибиторная способность» типа Кубиньи [5, 6] с включением в модель стерических факторов, в качестве которых использовались стерические константы заместителей Чартона ( $E_s^v$ ) [4, 7]. Предварительные расчеты показали, что при использовании других констант заместителей (стерические константы Тафта, Хенкока, Пальма [4, 7]) статистические показатели модели ухудшаются.

В проведенном анализе для данного ряда соединений не удается выявить влияния электронных свойств заместителей на ингибиторную способность соединений, что, по-видимому, можно объяснить двумя причинами: 1) незначительной вариацией электронных свойств заместителей — все они не содержат гетероатомов или кратных связей, 2) наличием существенной корреляции между  $\sigma$ -константами алкильных заместителей (до  $C_6$ ) и их гидрофобными и стерическими константами.

Последовательность анализа и влияние вышеупомянутых факторов хорошо иллюстрируются следующими уравнениями (проводится сопоставление параболических моделей и моделей типа Кубиньи с учетом стерических факторов): в случае ацетилхолинэстеразы

$$\lg k^{\text{II}} = 0,999 + (1,463 \pm 0,799) \Sigma\pi - (0,178 \pm 0,110) \cdot (\Sigma\pi)^2 \quad (4)$$

$$n=8, \quad r=0,665, \quad s=0,756, \quad F=1,99 \quad (p < 0,10)$$

$$\lg k^{\text{II}} = 2,312 + (0,781 \pm 0,248) \Sigma\pi - (3,078 \pm 1,049) \lg(1 + 10^{\Sigma\pi-5}) - (0,636 \pm 0,985) \Sigma E_s^v (R) \quad (5)$$

$$n=8, \quad r=0,859, \quad s=0,579, \quad F=3,8 \quad (p < 0,05)$$

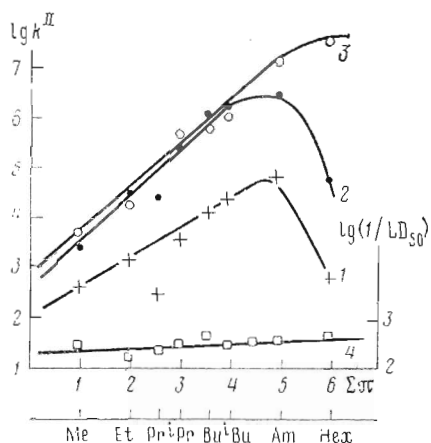
$$\lg k^{\text{II}} = 3,427 + (0,987 \pm 0,094) \Sigma\pi - (3,326 \pm 0,361) \lg(1 + 10^{\Sigma\pi-5}) - (2,341 \pm 0,430) \Sigma E_s^v (RO) \quad (6)$$

$$n=8, \quad r=0,983, \quad s=0,210, \quad F=37,5 \quad (p < 0,01)$$

В случае бутирилхолинэстеразы

$$\lg k^{\text{II}} = 0,964 + (2,355 \pm 0,577) \Sigma\pi - (0,277 \pm 0,80) \cdot (\Sigma\pi)^2 \quad (7)$$

$$n=8, \quad r=0,902, \quad s=0,546, \quad F=10,9 \quad (p < 0,05)$$



Зависимость логарифмов констант ингибирования ацетилхолинэстеразы (1), бутирилхолинэстеразы (2) и карбоксилэстеразы (3) соединениями (I)–(VIII) и острой токсичности этих соединений (4) от гидрофобности. Кривые 1–3 получены по уравнениям (6), (9), (11) соответственно. Зависимость 4 рассчитана методом линейной регрессии

$$\lg k^{\text{II}} = 2,403 + (1,171 \pm 0,178) \Sigma \pi - (2,768 \pm 0,508) \lg(1 + 10^{\Sigma \pi - 1,5}) - (0,312 \pm 0,638) \Sigma E_s^{\text{V}}(\text{R}) \quad (8)$$

$$n=8, \quad r=0,967, \quad s=0,360, \quad F=19,2 \quad (p < 0,05)$$

$$\lg k^{\text{II}} = 3,122 + (1,325 \pm 0,076) \Sigma \pi - (2,953 \pm 0,196) \lg(1 + 10^{\Sigma \pi - 4,5}) - (1,425 \pm 0,312) \Sigma E_s^{\text{V}}(\text{RO}) \quad (9)$$

$$n=8, \quad r=0,994, \quad s=0,149, \quad F=119,1 \quad (p < 0,01)$$

В случае карбоксилэстеразы ( $\alpha$ -неразветвленные заместители)

$$\lg k^{\text{II}} = 2,995 + (0,795 \pm 0,055) \Sigma \pi \quad (10)$$

$$n=7, \quad r=0,988, \quad s=0,233, \quad F=205,6 \quad (p < 0,01)$$

$$\lg k^{\text{II}} = 2,553 + (1,085 \pm 0,236) \Sigma \pi - (0,042 \pm 0,033) \cdot (\Sigma \pi)^2 \quad (11)$$

$$n=7, \quad r=0,991, \quad s=0,220, \quad F=115,7 \quad (p < 0,01)$$

Построение модели типа Кубиньи для ингибирования карбоксилэстеразы не представлялось возможным, так как все точки легли на одну ветвь параболы ( $\Sigma \pi_{\text{обр}} = 25,5$  по ур-нию (11); ср. (10) и (11)).

Анализ уравнений (4)–(9) позволяет сделать вывод об адекватности моделей типа Кубиньи для анализа связи «структура – антиэстеразная активность». В отличие от параболических моделей (4), (7), (11) в модели Кубиньи автоматически учитывается неравноценность (различная величина тангенса угла наклона) ветвей кривой  $\lg k^{\text{II}} = f(\Sigma \pi)$  [8], что дает более адекватное описание экспериментальных данных (рисунки). При этом, как видно из сопоставления уравнений (5) и (6), (8) и (9), наилучшие результаты моделирования получаются при использовании: суммы стерических констант Чартона для алкоксильных ( $E_s^{\text{V}}(\text{RO})$ ), а не алкильных ( $E_s^{\text{V}}(\text{R})$ ) заместителей. Это свидетельствует о существенном влиянии стерических свойств заместителей на стадии фосфорилирования фермента (ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза), которое особенно сильно сказывается – вплоть до смены механизма на обратимый в случае карбоксилэстеразы.

При исследовании токсичности соединений (I) – (VIII) установлено, что для всех соединений, за исключением изобутильного производного (VI),  $\text{LD}_{50}$  превышает  $1000 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  (таблица), что позволяет отнести их к малотоксичным соединениям. Следует отметить, что в ряду фосфатов (I)–(VIII) практически отсутствует зависимость токсичности от природы алкоксильного радикала. Низкая токсичность данных соединений и отсутствие зависимости ее от гидрофобности, по-видимому, обусловлены как невысокой собственной антиацетилхолинэстеразной активностью со-

единений, так и значительно возрастающей по мере увеличения гидрофобности разницей между сродством к ферментам, являющимся «местами потери», и их антиацетилхолинэстеразной активностью.

### Экспериментальная часть

Использовали коммерческие препараты ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы отечественного производства с уд. акт. 4 и 9,6 Е/мг белка соответственно и препарат карбоксилэстеразы печени свиньи с уд. акт. 100 Е/мг белка (Sigma, США).

Кинетические измерения проводили потенциометрическим методом в режиме рН-статирования на автотитраторе RTS-822 (Radiometer, Дания) в стандартных условиях (25° С, 0,1 М КСl, 1,33 мМ фосфатный буфер, рН 7,5 для холинэстераз с использованием в качестве субстрата ацетилхолина и рН 7,8 для карбоксилэстеразы, субстрат — этилбутират). Бимолекулярные константы скорости взаимодействия эстераз с ингибиторами ( $k^{\text{II}}$ ) определяли по методу [9] в условиях  $[I]_0 \gg [E]_0$ , контролируя остаточную активность фермента после инкубации с ингибитором. Тип обратимого ингибирования и величины констант ингибирования ( $K_i$ ) определяли методом Лайнуивера — Берка.

Острую токсичность определяли в опытах на белых беспородных мышах массой 18–24 г. Все вещества растворяли в ацетоне и вводили внутривенно в объеме не более 50 мкл. Срок наблюдения 14 сут. LD<sub>50</sub> определяли расчетным способом на ЭВМ Nord-10 по методу [10].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. М.: Мир, 1971, с. 66–94.
2. Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Наука, 1978, с. 95–97.
3. Махаева Г. Ф., Веселова В. Л., Мазуркова Т. А., Шипов А. Э., Жданова Г. В., Кабачник М. И. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 920–925.
4. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N. Y.: Wiley, 1979. 339 p.
5. Kubinyi H. Arzneimittel — Forsch., 1976, В. 26, № 11, S. 1991–1997.
6. Фетисов В. И., Махаева Г. Ф., Лошадкин Н. А., Мартынов И. В., Хаскин Б. А. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1353–1358.
7. Пальм В. А. Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977, с. 226–237.
8. Balaz S., Sturdik E., Hrmova M., Breza M., Liptaj T. Eur. J. Med. Chem.—Chim. Ther., 1984, в. 19, № 2, p. 167–171.
9. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965, с. 115–117.
10. Litchfield J. T., Wilcoxon F. J. Pharm. Exp. Therap., 1949, в. 96, № 2, p. 99–113.

Поступила в редакцию 17.II.1986

После доработки 18.IV.1986

### INTERACTION OF DIALKYL( $\alpha$ -CARBOMETOXY- $\beta,\beta,\beta$ -TRIFLUOROETHYL) PHOSPHATES WITH MAMMALIAN ESTERASES

МАКНАЕВА Г. Ф., ФЕТИСОВ В. И., СОКОЛОВ В. В., ЯНКОВСКАЯ В. Л., ГОРЕВА Т. В., МАЙГИН В. В., БЕЗНОСКО В. К., ГАЛЕНКО Т. Г., КОЛОМЫЦ А. Ф., МАРТЫНОВ И. В.

*Institute of Physiologically Active Substances, Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka*

The interaction of dialkyl( $\alpha$ -carbomethoxy- $\beta,\beta,\beta$ -trifluoroethyl)phosphates (RO)<sub>2</sub>P(O)·OCH(CF<sub>3</sub>)COOMe (R=Me, Et, Pr, Pr<sup>i</sup>, Bu, Bu<sup>i</sup>, Am, Hex) (I–VIII) with human erythrocyte acetylcholinesterase, horse serum butyrylcholinesterase, pig liver carboxylesterase was studied and acute toxicity in mice was estimated. Compounds (I)–(VIII) were not hydrolyzed by carboxylesterase, slowly and irreversibly inhibited acetylcholinesterase ( $k^{\text{II}}=10^2-10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) and more efficiently inhibited butyrylcholinesterase and carboxylesterase ( $k^{\text{II}}=10^3-10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). The structure — antienzymatic activity relationships were investigated. With increasing of hydrophobicity of alkoxy groups, antienzymatic activity to butyrylcholinesterase and carboxylesterase («sites of loss») rises equally and more significantly, than antiacetylcholinesterase activity ( $\Delta \lg k^{\text{II}}$  1,0 and 2,4 for R=CH<sub>3</sub> and C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> resp.). Branching at the  $\alpha$ -position of alkoxy groups leads to sharp reducing of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition constants, the carboxylesterase inhibition mechanism becoming reversible. Multiple regression analysis (the Kubinyi model) showed that influence of steric hindrances is revealed at the phosphorylation stage. It was found that phosphates (I)–(VIII) possess low acute toxicity in mice (900–2000 mg/kg). The toxicity of this homologous series appears to be independent of the hydrophobicity. Role of esterases in toxicological effect of compounds (I)–(VIII) is discussed.