



***O,O*-ДИАЛКИЛ-*S*-БРОММЕТИЛТИОФОСФАТЫ – ИНГИБИТОРЫ ХОЛИН- И КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: СВЯЗЬ “СТРУКТУРА–АКТИВНОСТЬ”**

© 1999 г. Г. Ф. Махаева[#], В. Л. Янковская, Н. В. Ковалева, В. И. Фетисов,
В. В. Малыгин, Н. А. Торгашева*, Б. А. Хаскин*

Институт физиологически активных веществ РАН,
142432, Черноголовка, Московской обл.;

* Научно-исследовательский институт химических средств защиты растений, Москва
Поступила в редакцию 17.03.98 г. Принята к печати 08.04.98 г.

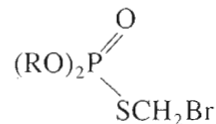
Изучена кинетика взаимодействия экспериментальных пестицидов *O,O*-диалкил-*S*-бромметилтиофосфатов (RO)₂P(O)SCH₂Br, (I)–(V), R = C₂H₅, *i*-C₃H₇, C₃H₇, C₄H₉, C₅H₁₁ с эстеразами теплокровных: ацетилхолинэстеразой, бутирилхолинэстеразой, карбоксилэстеразой. Соединения (I)–(V) необратимо ингибируют ацетилхолинэстеразу (k_i 1.8 × 10⁴–1.9 × 10⁶ M⁻¹ мин⁻¹), также необратимо, но более эффективно ингибируют бутирилхолинэстеразу (k_i 2.0 × 10⁶–4.1 × 10⁷ M⁻¹ мин⁻¹) и проявляют очень высокую ингибиторную способность в отношении карбоксилэстеразы (k_i от 2.3 × 10⁷ до 2.3 × 10⁸ M⁻¹ мин⁻¹ и выше). С применением многомерного регрессионного анализа (модели Хэнча и Кубиньи) проведен количественный анализ связи между структурой и ингибиторной активностью исследуемых соединений по отношению к ацетилхолинэстеразе и бутирилхолинэстеразе. Показано, что гидрофобные взаимодействия играют существенную роль при ингибировании обоих ферментов, но в случае бутирилхолинэстеразы их вклад более значителен. Роль стерического фактора при взаимодействии данных соединений с ацетилхолинэстеразой значительно выше, чем с бутирилхолинэстеразой, причем стерические препятствия проявляются на стадии фосфорилирования обоих ферментов.

Ключевые слова: *O,O*-диалкил-*S*-бромметилтиофосфаты; ацетилхолинэстераза; бутирилхолинэстераза; карбоксилэстераза; ингибирование; количественный анализ связи “структура-антиферментативная активность”.

Одно из перспективных направлений создания химических средств защиты растений, безопасных для человека и животных – исследование биохимических механизмов, лежащих в основе токсического действия [1]. Токсичность фосфорорганических пестицидов (ФОП) определяется рядом факторов, из которых важнейшим является взаимодействие с ферментом-мишенью – ацетилхолинэстеразой [1–3]. Существенным образом может отражаться на токсичности ФОП и фосфорилирование других эстераз, структурно сходных с основной биомишенью, – бутирилхолинэстеразы и особенно карбоксилэстераз [3–8]. Эти ферменты, в значительных количествах присутствующие в крови и печени теплокровных, могут выступать в качестве мест потери ФОП на пути к биомишени, выполняя таким образом защитную, буферную функцию. Анализ эстеразного профиля соединений [9], т.е. набора кинетических констант,

характеризующих эффективность ингибирования данным ФОП эстераз различной функциональной значимости, позволяет оценить (и предсказать) как степень проявления токсического эффекта, так и тенденции изменения токсичности с изменением структуры соединений [5–7, 10].

O,O-Диалкил-*S*-бромметилтиофосфаты (I)–(V) были синтезированы в качестве потенциальных пестицидов [11].



R = C₂H₅ (I), *i*-C₃H₇ (II), C₃H₇ (III),
C₄H₉ (IV), C₅H₁₁ (V)

В данной работе нами изучена кинетика взаимодействия соединений (I)–(V) с эстеразами теплокровных: ацетилхолинэстеразой эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразой сыворотки лошади (КФ 3.1.1.8), карбоксилэстеразой печени свиньи (КФ 3.1.1.1), и проанализи-

Сокращения: АХЭ, БХЭ, КЭ – ацетилхолин-, бутирилхолин- и карбоксилэстеразы.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 962-80-61; e-mail: makh@pharm.unicon.msk.su).

Бимолекулярные константы ингибирования ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы соединениями $(RO)_2P(O)SCH_2Br$ и параметры, используемые для корреляции*

Соединение	R	$k_i, M^{-1} \text{ мин}^{-1}$			$\sum \pi$	$\sum E_s^v(R)$	$\sum E_s^v(RO)$
		АХЭ	БХЭ	КЭ			
(I)	C_2H_5	$(3.42 \pm 0.21) \times 10^4$	$(2.00 \pm 0.08) \times 10^6$	$(2.30 \pm 0.11) \times 10^7$	2.0	1.12	0.96
(II)	$i-C_3H_7$	$(1.82 \pm 0.09) \times 10^4$	$(2.82 \pm 0.11) \times 10^6$	$(2.81 \pm 0.14) \times 10^7$	2.6	1.52	1.50
(III)	C_3H_7	$(7.16 \pm 0.29) \times 10^5$	$(4.12 \pm 0.20) \times 10^7$	$(2.64 \pm 0.16) \times 10^8$	3.0	1.36	1.12
(IV)	C_4H_9	$(1.89 \pm 0.08) \times 10^6$	$(1.93 \pm 0.12) \times 10^7$	$>10^9$	4.0	1.36	1.16
(V)	C_5H_{11}	$(1.52 \pm 0.06) \times 10^6$	$(1.00 \pm 0.04) \times 10^7$	$>10^9$	5.0	1.36	1.16

* Каждая величина k_i представляет собой среднее значение $\pm SD$ из трех независимых экспериментов; $\sum \pi$ – аддитивные константы гидрофобности алкильных заместителей; $\sum E_s^v(R)$ и $\sum E_s^v(RO)$ – стерические константы Чартона алкильных и алкоксильных заместителей.

рована связь между их структурой и антиферментативной активностью.

Установлено, что исследуемые соединения необратимо ингибируют все три эстеразы. Как видно из таблицы, соединения (I)–(V) являются эффективными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (k_i изменяется в пределах 1.8×10^4 – $1.9 \times 10^6 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$) в зависимости от заместителя, ингибиторная способность в отношении бутирилхолинэстеразы выше на 1–3 порядка. Следует отметить очень высокую активность данных соединений по отношению к карбоксилэстеразе: величина k_i для диэтилфосфата (I) равна $2.3 \times 10^7 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$, для дипропильного производного (III) – на порядок выше – $2.6 \times 10^8 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Используемый в работе метод не позволил точно определить константы ингибирования карбоксилэстеразы бутил- и пентилфосфатами, так как антикарбоксилэстеразная активность очень высока. Высокая ингибиторная активность исследованных соединений в отношении

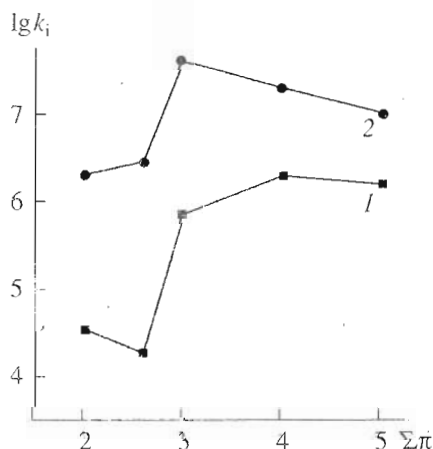
неспецифических эстераз – бутирилхолинэстеразы и, особенно, карбоксилэстеразы позволяет предположить существенную роль этих ферментов как буферной системы в формировании токсического эффекта *O,O*-диалкил-*S*-бромметилтиофосфатов.

Антиэстеразная активность исследованных соединений возрастает с увеличением гидрофобности их алкильных радикалов, причем для ацетил- и бутирилхолинэстеразы зависимости величины $\lg k_i$ от гидрофобности проходят через максимум (рисунок). Введение изопропильных заместителей, имеющих разветвление в α -положении, приводит к снижению антиферментативной активности, причем этот эффект наиболее выражен в случае ацетилхолинэстеразы.

С применением многомерного регрессионного анализа получена количественная оценка связи между структурой и ингибиторной активностью исследуемых соединений. При этом, учитывая характер зависимостей $\lg k_i$ от гидрофобности (рисунок), мы использовали модели “гидрофобность – ингибиторная активность” типа Хэнча [12] (параболическая модель, где $\lg k_i = a_1 + b_1 \sum \pi + c_1 (\sum \pi)^2$) и Кубиньи [13] (билинейная модель,

где $\lg k_i = a_2 + b_2 \sum \pi + c_2 \lg(1 + 10^{\sum \pi - \sum \pi_{\text{max}}})$) с включением в них стерических факторов. В качестве физико-химических дескрипторов алкильных заместителей использовали их константы гидрофобности Хэнча, стерические константы Чартона, Тафта, Хенкока, Пальма и индукционные константы Тафта [12, 14]. Ранее нами была показана применимость модели Кубиньи для анализа связи “структура–антиэстеразная активность” [5, 10, 15].

Для данного ряда соединений, как и в случае ранее исследованных нами гомологических рядов фосфатов и фосфонатов [5, 10, 15, 16], установлено, что электронные свойства заместителей не



Зависимость логарифмов констант ингибирования ацетилхолинэстеразы (1) и бутирилхолинэстеразы (2) соединениями (I)–(V) от их гидрофобности.

вливают на ингибиторную способность. Кроме того, как показали предварительные расчеты, модели с лучшими статистическими показателями получаются при использовании стерических констант заместителей Чартона ($\sum E_s^v$) по сравнению с константами Тафта, Хенкока и Пальма.

Ниже приведена последовательность анализа с использованием различных комбинаций параметров, характеризующих гидрофобность ($\sum \pi$ Хэнча) и стерические свойства алкильных $\sum E_s^v(R)$ и алкоксильных $\sum E_s^v(RO)$ заместителей (см. эксперимент. часть).

Ингибирование ацетилхолинэстеразы:

$$\lg k_i(AXЭ) = 3.828 + 0.538 \sum \pi \quad (1)$$

(для нормальных R) $n = 4$ $r = 0.859$

$$\lg k_i(AXЭ) = 0.199 + (2.558 \pm 2.311) \sum \pi - (0.269 \pm 0.325) (\sum \pi)^2 \quad (2)$$

$n = 5$ $r = 0.871$ $s = 0.661$ $F_{2,2} = 3.15$

$$\lg k_i(AXЭ) = 1.729 + (1.262 \pm 0.649) \sum \pi - (1.769 \pm 1.744) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) \quad (3)$$

$n = 5$ $r = 0.887$ $s = 0.623$ $F_{2,2} = 3.69$

Как показывают уравнения (1)–(3), в данном ряду наблюдается удовлетворительная корреляция между антиацетилхолинэстеразной активностью соединений и гидрофобностью алкильных заместителей. Вместе с тем, корреляция значительно улучшается при включении параметров, характеризующих стерические свойства заместителей (уравнения 4–7):

$$\lg k_i(AXЭ) = 1.518 + (4.944 \pm 1.373) \sum \pi - (0.587 \pm 0.189) (\sum \pi)^2 - (4.002 \pm 1.409) \sum E_s^v(R) \quad (4)$$

$n = 5$ $r = 0.987$ $s = 0.311$

$F_{3,1} = 12.21$ ($P < 0.05$)

$$\lg k_i(AXЭ) = 1.054 + (3.883 \pm 0.499) \sum \pi - (0.455 \pm 0.070) (\sum \pi)^2 - (2.540 \pm 0.362) \sum E_s^v(RO) \quad (5)$$

$n = 5$ $r = 0.996$ $s = 0.132$

$F_{3,1} = 69.02$ ($P < 0.01$)

$$\lg k_i(AXЭ) = 4.628 + (1.744 \pm 0.544) \sum \pi - (2.857 \pm 1.404) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - (3.120 \pm 1.833) \sum E_s^v(R) \quad (6)$$

$n = 5$ $r = 0.972$ $s = 0.446$

$F_{3,1} = 5.75$ ($P < 0.1$)

$$\lg k_i(AXЭ) = 3.762 + (1.485 \pm 0.287) \sum \pi - (2.386 \pm 0.777) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - (2.202 \pm 0.704) \sum E_s^v(RO) \quad (7)$$

$n = 5$ $r = 0.990$ $s = 0.268$

$F_{3,1} = 16.48$ ($P < 0.05$)

Это свидетельствует о важной роли обоих факторов – гидрофобных взаимодействий и стерического фактора – при ингибировании ацетилхолинэстеразы диалкил-S-бромметилтиофосфатами. Уравнение (5) является наилучшим уравнением, описывающим зависимость антиацетилхолинэстеразной активности данных соединений от гидрофобности и стерических свойств заместителей. Как показывает сравнение статистических показателей уравнений (4) и (6), (5) и (7), использование параболической модели Хэнча позволяет получить более адекватное описание зависимости по сравнению с моделью Кубиньи. При этом, как видно из сопоставления уравнений (4) и (5), (6) и (7), значительно лучшие результаты моделирования, согласно статистическим показателям, получаются при использовании стерических констант алкоксильных, а не алкильных заместителей.

Ингибирование бутирилхолинэстеразы:

$$\lg k_i(BXЭ) = 2.172 + (2.727 \pm 1.572) \sum \pi - (0.353 \pm 0.21) (\sum \pi)^2 \quad (8)$$

$n = 5$ $r = 0.819$ $s = 0.450$ $F_{2,2} = 2.04$

$$\lg k_i(BXЭ) = 3.071 + (1.589 \pm 0.824) \sum \pi - (2.004 \pm 1.187) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 3}) \quad (9)$$

$n = 5$ $r = 0.831$ $s = 0.436$ $F_{2,2} = 2.23$

Результаты моделирования показывают, что изменение антибутирилхолинэстеразной активности в ряду соединений (I)–(V) удовлетворительно коррелирует с гидрофобностью алкильных заместителей (уравнения (8), (9)). Включение стерических

ких характеристик заместителей заметно улучша-
ет корреляцию (уравнения (10)–(13)).

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 2.278 + (0.823 \pm 2.168) \sum \pi - \\ & - (0.499 \pm 0.299) (\sum \pi)^2 - \\ & - (1.839 \pm 2.235) \sum E_s^v(\text{R}) \end{aligned} \quad (10)$$

$$n = 5 \quad r = 0.897 \quad s = 0.490 \quad F_{3,1} = 1.37$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 2.627 + (3.433 \pm 1.517) \sum \pi - \\ & - (0.452 \pm 0.213) (\sum \pi)^2 - \\ & - (1.354 \pm 1.102) \sum E_s^v(\text{RO}) \end{aligned} \quad (11)$$

$$n = 5 \quad r = 0.932 \quad s = 0.402 \quad F_{3,1} = 2.21$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 4.255 + (2.525 \pm 0.867) \sum \pi - \\ & - (3.254 \pm 1.206) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 3}) - \\ & - (2.535 \pm 1.620) \sum E_s^v(\text{R}) \end{aligned} \quad (12)$$

$$n = 5 \quad r = 0.954 \quad s = 0.332 \quad F_{3,1} = 3.39$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 3.772 + (2.102 \pm 0.524) \sum \pi - \\ & - (2.750 \pm 0.757) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 3}) - \\ & - (1.591 \pm 0.706) \sum E_s^v(\text{RO}) \end{aligned} \quad (13)$$

$$n = 5 \quad r = 0.974 \quad s = 0.250$$

$$F_{3,1} = 6.22 \quad (P < 0.1)$$

При этом в отличие от ацетилхолинэстеразы более адекватное описание зависимости антибутирилхолинэстеразной активности от структуры соединений дает билинейная модель Кубиньи (уравнения (12), (13)), а лучшие результаты моделирования, как и в случае ингибирования ацетилхолинэстеразы, получаются при использовании стерических констант алкокисильных, а не алкильных заместителей. Наилучшим является уравнение (13).

Сопоставление коэффициентов при $\sum \pi$ и $\sum E_s^v$ в полученных корреляционных уравнениях для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы позволяет оценить вклад гидрофобных взаимодействий и стерического фактора в реакцию исследуемых соединений с этими ферментами. Как видно из уравнений (7) и (13) – сравниваем статистически значимые билинейные уравнения для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы – гидрофобные взаимодействия играют существенную роль при ингибировании обоих ферментов, но в случае бутирилхолинэстеразы их вклад более значителен. Роль стерического фактора значительно выше при взаимодействии дан-

ных соединений с ацетилхолинэстеразой, чем с бутирилхолинэстеразой, что согласуется с известными представлениями о гидрофобных участках в активных центрах этих ферментов [17, 18] и показанными недавно [19] различиями в размерах активных центров. Четко выраженное улучшение корреляции при использовании стерических констант алкокисильных заместителей по сравнению с алкильными может свидетельствовать о проявлении стерических препятствий на стадии фосфорилирования обоих ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (I)–(V) синтезировали по методу, описанному в работе [11].

Для кинетических исследований использовали коммерческие препараты ацетилхолинэстеразы из эритроцитов человека и бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади производства Пермского НИИ вакцин и сывороток (Россия) с удельной активностью 4 и 9.6 ед. акт./мг белка соответственно и препарат карбоксилэстеразы из печени свиньи с удельной активностью 100 ед. акт./мг белка (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, США). Ацетилхолинбромид производства Chemapol (Prague, Чехия).

Кинетические измерения проводили потенциометрическим методом в режиме рН-статирования на автотитраторе "Radiometer" RTS-822 (Дания) в стандартных условиях 25°C, 0.1 М КСl, 1.33 мМ фосфатный буфер, рН 7.5 для холинэстераз (субстрат – ацетилхолин) и рН 7.8 для карбоксилэстеразы (субстрат – этилбутират). Бимолекулярные константы скорости ингибирования эстераз k_i определяли по методу [20] в условиях $[I]_0 \gg [E]_0$, контролируя остаточную активность фермента после инкубации с ингибитором.

Значимость полученных корреляционных уравнений оценивали по величине r – коэффициента множественной корреляции, s – стандартного отклонения и F – секвенциального критерия Фишера, характеризующего уровень значимости r при выбранном значении доверительного интервала [21].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 96-04-50252).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Наука, 1978.
2. Каган Ю.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1977.

3. Russel R.W., Overstreet D.H. // Progress in Neurobiology. 1987. V. 28. P. 97–129.
4. Fonnum F., Sterri S.H., Aas P., Johnsen H. // Fundam. Appl. Toxicol. 1985. V. 5. P. 29–38.
5. 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. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. С. 33–37.
6. Махаева Г.Ф., Янковская В.Л., Кочетова Л.М., Безноско Б.К., Соколов В.Б., Брель В.К., Малыгин В.В., Мартынов И.В. // Физиол. активные вещества. 1989. Т. 21. С. 68–74.
7. Malygin V., Makhaeva G. // Toxicol. Lett. 1995. V. 78 (Suppl. 1). P. 56.
8. Jokanović M., Kozanović M., Maksimović M. // Arch. Toxicol. 1996. V. 70. P. 444–450.
9. Makhaeva G., Filonenko I., Fomicheva S., Malygin V. // Toxicol. Lett. 1996. V. 88 (Suppl. 1). P. 25.
10. Хаскин Б.А., Махаева Г.Ф., Торгашева Н.А., Ишмуратов А.С., Янковская В.Л., Фетисов В.И., Малыгин В.В., Мартынов И.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1989. № 12. С. 2741–2746.
11. Хаскин Б.А., Торгашева Н.А., Ишмуратов А.С. // Журн. общ. химии. 1991. Т. 61. С. 1090–1095.
12. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N.Y.: Wiley, 1979.
13. Kubinyi H. // Arzneimittel-Forsch. 1976. V. 26. P. 1991–1997.
14. Пальм В.А. Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977. С. 226–237.
15. Фетисов В.И., Махаева Г.Ф., Лошадкин Н.А., Мартынов И.В., Хаскин Б.А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. С. 1353–1358.
16. Махаева Г.Ф., Кононова И.В., Малыгин В.В., Лященко Ю.Е., Соколов В.Б., Мартынов И.В. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 317. С. 1009–1013.
17. Кабачник М.И., Абдувахобов А.А., Агабекова И.И., Бресткин А.П., Волкова Р.И., Годовиков Н.Н., Годына Е.И., Михайлов С.С., Михельсон М.Я., Розенгарт В.И., Розенгарт Е.В., Ситкевич Р.В. // Успехи химии. 1970. Т. 39. С. 1050–1073.
18. Kabachnik M.I., Brestkin A.P., Godovikov N.N., Michelson M.J., Rosengart E.V., Rosengart V.I. // Pharmacol. Rev. 1970. V. 22. P. 355–388.
19. Taylor P., Radic Z., Hosea N.A., Camp S., Marchot P., Berman H.A. // Toxicol. Lett. 1995. V. 82/83. P. 453–458.
20. Яковлев В. А. Кинстика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. С. 115–117.
21. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул. М.: Высшая школа, 1988.

O,O-Dialkyl S-Bromomethylthiophosphates, Inhibitors of Mammalian Choline and Carboxyl Esterases: Structure–Activity Relationship

G. F. Makhaeva[#], V. L. Yankovskaya*, N. V. Kovaleva*, V. I. Fetisov*,
V. V. Malygin*, N. A. Torgaseva**, and B. A. Khaskin**

*Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

**Research Institute of Plant Protection Chemicals, Moscow, Russia

The interaction kinetics of potential pesticides, O,O-dialkyl S-bromomethylthiophosphates (RO)₂P(O)SCH₂Br (R = Et, *i*-Pr, *n*-Pr, *n*-Bu, or *n*-Am) with acetylcholinesterase, butyryl cholinesterase, and carboxyl esterase from warm-blooded animals was studied. All the compounds irreversibly inhibit these esterases, with *k*₁ (M⁻¹ min⁻¹) being 1.8 × 10⁴–1.9 × 10⁶ for acetylcholinesterase, 2.0 × 10⁶–4.1 × 10⁷ for the more sensitive butyryl cholinesterase, and 2.3 × 10⁷–2.3 × 10⁸ and higher for the most sensitive carboxyl esterase. By using the Hansch and Kubinyi technique of multiple regression analysis, we quantitatively analyzed the relationship between the structure and inhibiting activity of these substances toward acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase. Hydrophobic interactions were found to be important for the inhibition of both enzymes but are more pronounced in the case of butyryl cholinesterase. On the other hand, steric factors were much more significant in the inhibition of acetylcholinesterase. For both enzymes, the steric hindrances affect the phosphorylation stage of the enzyme.

Key words: acetylcholinesterase; butyryl cholinesterase; carboxyl esterase; O,O-dialkyl S-bromomethylthiophosphates, enzyme inhibition; structure–enzyme-inhibiting activity, quantitative analysis

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 962-8061; e-mail: makh@pharm.unicon.msk.su.