



УДК 547.26'118:577.152.311.042:541.697+519.237.5

АНТИЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ТОКСИЧНОСТЬ O,O-ДИАЛКИЛ-S-ЭТОКСИКАРБОНИЛБРОММЕТИЛТИОФОСФАТОВ

© 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.

Изучено взаимодействие экспериментальных пестицидов O,O-диалкил-S-этоксикарбонилбромметилтиофосфатов $(RO)_2P(O)SCH(Br)COOC_2H_5$ (Ia)–(Ie), R = C₂H₅, *i*-C₃H₇, C₃H₇, C₄H₉, C₅H₁₁, C₆H₁₃ с эстеразами теплокровных: ацетилхолин- (АХЭ), бутирилхолин- (БХЭ) и карбоксилэстеразой (КЭ). Определена их острая токсичность для мышей. Соединения (Ia)–(Ie) не гидролизуются КЭ и необратимо ингибируют все три эстеразы. Значения k_i (M⁻¹ мин⁻¹) равны: для АХЭ 1.2×10^5 – 6.0×10^6 , для БХЭ 2.0×10^6 – 1.4×10^8 , для КЭ $> 2.0 \times 10^8$. С использованием многомерного регрессионного анализа установлено, что при ингибировании АХЭ велика роль стерического фактора, и стерические препятствия проявляются уже на стадии сорбции, тогда как при ингибировании БХЭ определяющими являются гидрофобные взаимодействия, а стерические свойства заместителей оказывают заметно меньшее влияние и проявляются преимущественно на стадии фосфорилирования. Высказано предположение о наличии в активном центре АХЭ электрофильного участка, с которым взаимодействует этоксикарбонильная группа тиофосфатов (Ia)–(Ie). Снижение токсичности соединений с увеличением длины алкильного остатка R нормального строения коррелирует с возрастанием их сродства к бутирилхолинэстеразе и карбоксилэстеразе, что позволяет предположить существенную роль неспецифических эстераз как буферной системы в формировании токсического эффекта тиофосфатов (Ia)–(Ie).

Ключевые слова: O,O-диалкил-S-этоксикарбонилбромметилтиофосфаты; ацетилхолинэстераза; бутирилхолинэстераза; карбоксилэстераза; ингибирование; острая токсичность; количественный анализ связи "структура-антиферментативная активность".

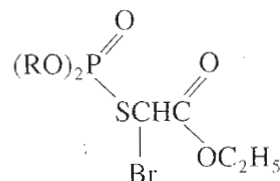
Токсичность фосфорорганических пестицидов (ФОП) определяется не только их собственной антиацетилхолинэстеразной активностью, но и, в значительной степени, процессами, происходящими с соединением на токсико-кинетической стадии [1–3]. Важный токсикообразующий фактор – метаболические превращения. В частности, для ФОП, содержащих карбалкокисильные группы, существенным является их гидролиз под действием карбоксилэстераз [2–5], приводящий к снижению токсичности соединений. Кроме того, неспецифические эстеразы карбоксил- и бутирилхолинэстераза могут выступать в роли "мест потери" ФОП на пути к биомишени – ацетилхолинэстеразе, и, соответственно, влиять на токсичность соединения [6–10].

В продолжение исследования роли эстераз в формировании токсического действия ФОП [8–11]

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

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

нами изучена способность синтезированных в качестве потенциальных пестицидов O,O-диалкил-S-этоксикарбонилбромметилтиофосфатов [12] (Ia)–(Ie) к карбоксилэстеразному гидролизу, исследована их антиферментативная активность в отношении эстераз теплокровных – ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади (КФ 3.1.1.8) и карбоксилэстеразы печени свиньи (КФ 3.1.1.1), показана острая токсичность для мышей и проанализированы структурные факторы, определяющие эффективность взаимодействия исследуемых соединений с ферментом-мишенью и ферментами-"местами потери".



R = C₂H₅ (Ia), *i*-C₃H₇ (Iб), C₃H₇ (Iв),
C₄H₉ (Iг), C₅H₁₁ (Iд), C₆H₁₃ (Iе)

Бимолекулярные константы ингибирования ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы соединениями (RO)₂P(O)SCH(Br)COOC₂H₅, острая токсичность соединений и параметры, используемые для корреляции*

Со-единение	R	$k_i, M^{-1} \text{ мин}^{-1}$			LD ₅₀ , мг/кг	$\sum \pi$	$\sum E_s^v$ (R)	$\sum E_s^v$ (RO)
		АХЭ	БХЭ	КЭ				
(Ia)	C ₂ H ₅	$(3.34 \pm 0.16) \times 10^6$	$(5.41 \pm 0.23) \times 10^6$	$(2.00 \pm 0.11) \times 10^8$	24.2 (16.0–36.5)	2.0	1.12	0.96
(Iб)	<i>i</i> -C ₃ H ₇	$(1.18 \pm 0.07) \times 10^5$	$(2.04 \pm 0.11) \times 10^6$	$>2 \times 10^8$	199.9 (150.5–265.5)	2.6	1.52	1.50
(Iв)	C ₃ H ₇	$(1.75 \pm 0.09) \times 10^6$	$(5.38 \pm 0.22) \times 10^7$	$>10^9$	88.6 (67.3–123.3)	3.0	1.36	1.12
(Iг)	C ₄ H ₉	$(3.94 \pm 0.22) \times 10^6$	$(1.36 \pm 0.08) \times 10^8$	$>10^9$	162.5 (82.6–319.7)	4.0	1.36	1.16
I(д)	C ₅ H ₁₁	$(5.98 \pm 0.34) \times 10^6$	$(4.60 \pm 0.19) \times 10^7$	$>10^9$	371.8 (275.6–501.6)	5.0	1.36	1.16
I(е)	C ₆ H ₁₃	$(1.00 \pm 0.04) \times 10^6$	$(2.40 \pm 0.11) \times 10^7$	$>10^9$	386.5 (271.5–550.1)	6.0	1.46	1.22

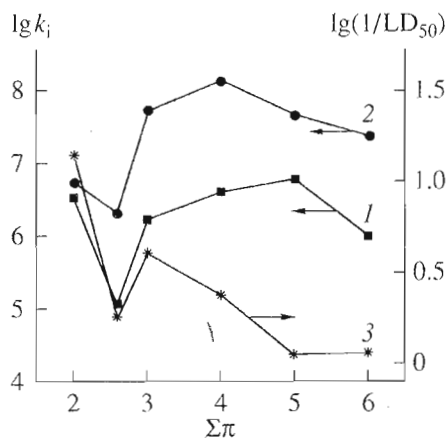
* Каждая величина k_i представляет собой среднее значение \pm SD из трех независимых экспериментов; $\sum \pi$ – аддитивные константы гидрофобности алкильных заместителей; $\sum E_s^v$ (R) и $\sum E_s^v$ (RO) – стерические константы Чартона алкильных и алкоксильных заместителей.

Исследование способности соединений (Ia)–(Ie) гидролизоваться под действием карбоксилэстеразы показало, что, как и ранее изученные нами *O,O*-диалкил-*S*-этоксикарбонилхлорметилтиофосфаты (II) [11], данные соединения устойчивы к карбоксилэстеразному гидролизу. Соединения (Ia)–(Ie) необратимо ингибируют все три эстеразы – ацетилхолинэстеразу, бутирилхолинэстеразу и карбоксилэстеразу – и проявляют при этом высокую ингибиторную способность, особенно в отношении карбоксилэстеразы (таблица). Для диэтилфосфата (Ia) $k_i(\text{КЭ}) = 2.0 \times 10^8 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$, и с увеличением длины радикала ингибиторная способность соединений в отношении карбоксилэстеразы возрастает. Столь высокая скорость ингибирования этого фермента не позволила точно определить используемым в работе методом кинетические константы ингибирования для более высоких гомологов. Следует отметить, что присутствие в молекуле этоксикарбонильной группы повышает ингибиторную способность исследуемых соединений по сравнению с изученными ранее *O,O*-диалкил-*S*-бромметилтиофосфатами (III) [13].

Высокая скорость ингибирования карбоксилэстеразы данными соединениями (Ia)–(Ie), вероятно, основная причина их устойчивости к карбоксилэстеразному гидролизу. Такая устойчивость для фосфорильных (P=O) соединений, содержащих в своей структуре карбалкокисильные группы, в отличие от их тионфосфорильных (P=S) аналогов, подверженных расщеплению, отмечалась нами ранее [4, 5, 8, 11]. Полученные в данной работе результаты подтверждают высказанное нами ранее [5] предположение о том, что обладающие высокой антикарбоксилэстеразной активностью продукты окислительной десульфурации тионфосфорильных соединений (P=O-метабо-

ты) в организме не могут подвергаться гидролитической детоксикации.

Характер зависимости антиферментативной активности соединений от гидрофобности алкоксильных радикалов существенно отличается для ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы (рисунок). В то время как антибутирилхолинэстеразная активность растет с увеличением числа метиленовых групп, проходя через максимум при R = C₄H₉, т. е. имеет традиционный вид [8, 9, 11; 13], то в отношении антиацетилхолинэстеразы для соединений (Ia)–(Ie), как и в случае ранее изученных *O,O*-диалкил-*S*-этоксикарбонилхлорметилтиофосфатов (II) [11], отсутствует четко выраженная зависимость от гидрофобности. Введение изопропильных заместителей приводит к снижению ингибирующей активности в отношении обоих ферментов.



Зависимость логарифмов констант ингибирования ацетилхолинэстеразы (1) и бутирилхолинэстеразы (2), и острой токсичности (3) соединений (Ia)–(Ie) от гидрофобности.

С использованием моделей Хэнча и Кубиньи [14–16] для соединений (Ia)–(Ie) нами проведен количественный анализ зависимости их антиферментативной активности от гидрофобности ($\sum \pi$ Хэнча) и стерических свойств ($\sum E_s^v$ Чартона) *O*-алкильных заместителей [15]. Обоснование выбора физико-химических дескрипторов для описания связи структура–антиферментативная активность приведено в предыдущей работе [13].

При моделировании зависимости антиацетилхолинэстеразной активности от структуры оказалось, что значения $\lg k_i$ не коррелируют в отдельности ни с одним из используемых параметров: $\sum \pi$, $(\sum \pi)^2$, $\sum E_s^v(R)$ или $\sum E_s^v(RO)$. Не обнаружено удовлетворительной корреляции и при использовании следующих комбинаций параметров: $\sum \pi + (\sum \pi)^2$ или $\sum \pi + \lg(1 + 10^{\sum \pi - \pi_{\text{отг}}})$, $\sum \pi + \sum E_s^v(R)$, $\sum \pi + \sum E_s^v(RO)$. Статистически значимую корреляцию удалось получить только при одновременном включении параметров, характеризующих гидрофобность: $\sum \pi + (\sum \pi)^2$ или $\sum \pi + \lg(1 + 10^{\sum \pi - \pi_{\text{отг}}})$, и стерические свойства заместителей. При этом параболическая модель Хэнча дает более адекватное описание зависимости структура – антиацетилхолинэстеразная активность по сравнению с билинейной моделью Кубиньи, и лучшая корреляция наблюдается при использовании стерических констант алкильных $\sum E_s^v(R)$, а не алкоксильных $\sum E_s^v(RO)$ заместителей (уравнения (1)–(4)).

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{АХЭ}) = & 9.312 + (1.758 \pm 0.148) \sum \pi - \\ & - (0.183 \pm 0.018) (\sum \pi)^2 - (4.970 \pm 0.246) \sum E_s^v(R) \\ n = 6 \quad r = 0.998 \quad s = 0.0646 \quad (1) \\ F_{3,2} = & 151.34 (P < 0.01) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{АХЭ}) = & 7.635 + (1.250 \pm 0.494) \sum \pi - \\ & - (0.140 \pm 0.061) (\sum \pi)^2 - (3.369 \pm 0.579) \sum E_s^v(RO) \\ n = 6 \quad r = 0.973 \quad s = 0.225 \quad (2) \\ F_{3,2} = & 11.89 (P < 0.05) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{АХЭ}) = & 10.299 + (0.809 \pm 0.090) \sum \pi - \\ & - (1.059 \pm 0.171) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - \\ & - (4.799 \pm 0.391) \sum E_s^v(R) \quad (3) \\ n = 6 \quad r = 0.994 \quad s = 0.230 \\ F_{3,2} = & 54.57 (P < 0.01) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{АХЭ}) = & 8.437 + (0.534 \pm 0.196) \sum \pi - \\ & - (0.821 \pm 0.369) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - \\ & - (3.187 \pm 0.588) \sum E_s^v(RO) \quad (4) \\ n = 6 \quad r = 0.972 \quad s = 0.230 \\ F_{3,2} = & 11.33 (P < 0.05) \end{aligned}$$

Наилучшим уравнением, описывающим зависимость антиацетилхолинэстеразной активности от структуры данных соединений, согласно статистическим показателям, является параболическое уравнение (1), следующим по значимости – билинейное уравнение (3), причем в обоих случаях используются стерические константы алкильных заместителей.

Изменение антибутирилхолинэстеразной активности в данном ряду ингибиторов удовлетворительно коррелирует с гидрофобностью алкильных заместителей (уравнения (5)–(6)).

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 3.070 + (2.167 \pm 1.172) \sum \pi - \\ & - (0.242 \pm 0.145) (\sum \pi)^2 \quad (5) \\ n = 6 \quad r = 0.785 \quad s = 0.542 \quad F_{2,3} = & 2.42 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 4.455 + (0.995 \pm 0.426) \sum \pi - \\ & - (1.547 \pm 0.805) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) \quad (6) \\ n = 6 \quad r = 0.818 \quad s = 0.505 \quad F_{2,3} = & 3.03 \end{aligned}$$

Учет стерических характеристик заместителей значительно улучшает корреляцию (уравнения (7)–(10)).

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 5.614 + (2.728 \pm 0.978) \sum \pi - \\ & - (0.299 \pm 0.119) (\sum \pi)^2 - (2.749 \pm 1.622) \sum E_s^v(R) \quad (7) \\ n = 6 \quad r = 0.918 \quad s = 0.426 \quad F_{3,2} = & 3.57 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 5.020 + (2.505 \pm 0.635) \sum \pi - \\ & - (0.282 \pm 0.078) (\sum \pi)^2 - (2.181 \pm 0.744) \sum E_s^v(RO) \\ n = 6 \quad r = 0.963 \quad s = 0.289 \quad (8) \\ F_{3,2} = & 8.45 (P < 0.1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 7.180 + (1.213 \pm 0.361) \sum \pi - \\ & - (1.787 \pm 0.652) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - \\ & - (2.501 \pm 1.496) \sum E_s^v(R) \quad (9) \\ n = 6 \quad r = 0.928 \quad s = 0.399 \quad F_{3,2} = & 4.16 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \lg k_i(\text{БХЭ}) = & 6.591 + (1.086 \pm 0.233) \sum \pi - \\ & - (1.688 \pm 0.421) \lg(1 + 10^{\sum \pi - 4}) - \\ & - (2.022 \pm 0.670) \sum E_s^v(\text{RO}) \quad (10) \\ n = & 6 \quad r = 0.970 \quad s = 0.262 \\ F_{3,2} = & 10.52 \quad (P < 0.05) \end{aligned}$$

Как видно из сопоставления статистических показателей уравнений (7) и (8), (9) и (10), лучшие результаты моделирования получаются при использовании стерических констант алкокисильных, а не алкильных заместителей, что может свидетельствовать о преимущественном влиянии стерических свойств заместителей на стадии фосфорилирования бутирилхолинэстеразы. Применение модели Кубины, учитывающей неравноценность ветвей кривой $\lg k_i = f(\sum \pi)$, в данном случае дает более адекватное описание зависимости антиферментативной активности от гидрофобности и стерических свойств заместителей по сравнению с моделью Хэнча, и наилучшим является уравнение (10).

Таким образом, полученные результаты показывают, что при ингибировании бутирилхолинэстеразы соединениями (Ia)–(Ie) определяющими являются гидрофобные взаимодействия, а стерический фактор оказывает заметно меньшее влияние, тогда как при ингибировании ацетилхолинэстеразы теми же соединениями чрезвычайно велика роль стерического фактора и стерические препятствия проявляются уже на стадии сорбции. Полученные выводы согласуются с известными представлениями об объемной и протяженной гидрофобной области в районе активного центра бутирилхолинэстеразы и ограниченных размерах гидрофобного участка в активном центре ацетилхолинэстеразы [17, 18].

Мы сопоставили данные по антиферментативной активности трех изученных нами рядов *O,O*-диалкил-*S*-галогенметилтиофосфатов: $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}(\text{Br})\text{COOC}_2\text{H}_5$ (I), их хлорных аналогов $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}(\text{Cl})\text{COOC}_2\text{H}_5$ (II) [11] и *S*-бромметилтиофосфатов $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{Br}$ (III) [13].

Зависимости антиацетилхолинэстеразной активности от гидрофобности для фосфатов (I) и (II), содержащих этоксикарбонильную группу, практически одинаковы и отличаются от “нормальной” (рост с увеличением R с прохождением через максимум), которую мы наблюдаем для *S*-бромметилтиофосфатов (III), не содержащих этоксикарбонильной группы. Ранее на основании результатов QSAR-анализа [19, 20] и молекулярного моделирования взаимосвязи между пространственной структурой и антиацетилхолинэстеразной активностью [21] нескольких рядов *O*-фосфорилиро-

ванных оксимов нами было высказано предположение, что в активном центре ацетилхолинэстеразы как раз в области сорбции “уходящей” группы фосфорорганического ингибитора имеется участок с дефицитом электронной плотности, который может обеспечивать аттрактивный характер взаимодействия с электроотрицательными заместителями в “уходящей” группе *O*-фосфорилированных оксимов. Можно предположить, что нетипичная зависимость антиацетилхолинэстеразной активности от гидрофобности для тиофосфатов (I) и (II) обусловлена взаимодействием этоксикарбонильной группы данных соединений именно с этим электрофильным участком, которое и оказывает влияние на ориентацию молекулы ингибитора в активном центре фермента. Косвенное подтверждение этой гипотезы – сходный характер антибутирилхолинэстеразной активности для обоих типов исследованных соединений, поскольку в активном центре бутирилхолинэстеразы предполагаемый электрофильный участок отсутствует.

Исследование острой токсичности соединений (Ia)–(Ie) на мышах показало, что соединение (Iб), $\text{R} = i\text{-C}_3\text{H}_7$, значительно менее токсично, чем соответствующий диэтильный аналог (Ia) (LD_{50} 199.9 и 24.2 мг/кг соответственно), что согласуется с их относительной антиацетилхолинэстеразной активностью (таблица). В ряду соединений с нормальными алкильными радикалами антиацетилхолинэстеразная активность с увеличением длины радикала меняется незначительно, тогда как токсичность снижается (рисунок). Исследуемые соединения проявляют очень высокую ингибиторную активность по отношению к бутирилхолинэстеразе и, особенно, к карбоксилэстеразе (таблица). Снижение токсичности соединений с увеличением длины радикала коррелирует с возрастанием сродства к указанным ферментам, что позволяет предположить существенную роль неспецифических эстераз как буферной системы в формировании токсического эффекта соединений (Ia)–(Ie).

Таким образом, как показали результаты проведенного исследования, введение этоксикарбонильной группы в молекулы *O,O*-диалкил-*S*-бромметилтиофосфатов (III) приводит к получению соединений (I) – мощных ингибиторов карбоксилэстеразы, не гидролизующихся этим ферментом. Высокоэффективное связывание с карбоксилэстеразой и с бутирилхолинэстеразой и является, по видимому, причиной снижения токсичности более высоких гомологов в ряду *O,O*-диалкил-*S*-этоксикарбонилбромметилтиофосфатов (I).

Представленные данные об определяющем влиянии гидрофобности ФОР на эффективность их взаимодействия с бутирилхолинэстеразой, согласуются с полученными нами ранее результата-

ми по взаимодействию ФОП различной структуры с бутирилхолинэстеразой и карбоксилэстеразой [8–11, 13] и подтверждают возможную роль этих “неспецифических эстераз” как одной из буферных, защитных систем организма.

Результаты исследования связи структура–антиацетилхолинэстеразная активность в нескольких рядах *O,O*-диалкил-*S*-галогенметилтиофосфатов (см. также работы [11, 13]), наряду с ранее полученными нами данными для *O*-фосфорилированных оксимов [19–21], указывают на присутствие в активном центре фермента-мишени – ацетилхолинэстеразы, электрофильного участка, локализованного в области сорбции “уходящей” группы фосфорорганического ингибитора.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (Ia)–(Ie) синтезировали по методу, описанному в работе [12].

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 КЭ 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; для холинэстераз: рН 7.5, субстрат – ацетилхолин; для карбоксилэстеразы: рН 7.8, субстрат – этилбутират). Бимолекулярные константы скорости ингибирования эстераз k_i определяли по методу [22] 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 [23].

Острую токсичность определяли в опытах на белых беспородных мышах массой 18–24 г. Все вещества растворяли в ацетоне и вводили внутривентриально в объеме не более 50 мкл. Срок наблюдения 1 сутки. Величины LD₅₀ определяли расчетным способом на РС-486 по методу [24].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казан Ю.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1977.
2. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Наука, 1978.
3. Matsumura F. Toxicology of Insecticides. New York & London: Plenum Press, 1985.
4. Махаева Г.Ф., Веселова В.Л., Мاستрюкова Т.А., Шипов А.Э., Жданова Г.В., Кабачник М.И. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. С. 920–925.
5. Махаева Г.Ф., Янковская В.Л., Одоева Г.А., Шестакова Н.Н., Хованских А.Е., Мастрюкова Т.А., Шипов А.Э., Жданова Г.В., Кабачник М.И. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. С. 957–962.
6. Fonnum F., Sterri S.H., Aas P., Johnsen H. // Fundam. Appl. Toxicol. 1985. V. 5. P. 29–38.
7. Russel R.W., Overstreet D.H. // Progress in Neurobiology. 1987. V. 28. P. 97–129.
8. Махаева Г.Ф., Фетисов В.И., Соколов В.Б., Янковская В.Л., Горева Т.В., Малыгин В.В., Безносико Б.К., Галенко Т.Г., Коломиец А.Ф., Мартынов И.В. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. С. 33–37.
9. Махаева Г.Ф., Янковская В.Л., Кочетова Л.М., Безносико Б.К., Соколов В.Б., Брель В.К., Малыгин В.В., Мартынов И.В. // Физиол. активные вещества. 1989. Т. 21. С. 68–74.
10. Malygin V., Makhaeva G. // Toxicol. Lett. 1995. V. 78 (Suppl. 1). P. 56.
11. 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.
12. Хаскин Б.А., Торгашева Н.А., Ишмуратов А.С. // Журн. общ. химии. 1991. Т. 61. С. 1090–1095.
13. Махаева Г.Ф., Янковская В.Л., Ковалева Н.В., Фетисов В.И., Малыгин В.В., Торгашева Н.А., Хаскин Б.А. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 3–7.
14. Фетисов В.И., Махаева Г.Ф., Лошадкин Н.А., Мартынов И.В., Хаскин Б.А. // Биоорганич. химия. 1984. Т. 10. С. 1353–1358.
15. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. N.Y.: Wiley, 1979.
16. Kubinyi H. // Arzneimittel-Forsch. 1976. V. 26. P. 1991–1997.
17. 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.
18. Tailor P., Radic Z., Hosea N.A., Camp S., Marchot P., Berman H.A. // Toxicol. Lett. 1995. V. 82/83. P. 453–458.
19. Махаева Г.Ф., Малыгин В.В., Якубов Ш.М., Горбунов С.М. // Хим.-фарм. ж. 1994. Т. 28. С. 6–9.
20. Махаева Г.Ф., Малыгин В.В., Якубов Ш.М., Горбунов С.М. // Хим.-фарм. ж. 1994. Т. 28. С. 14–18.

21. Плямоватый А.Х., Вандюкова И.И., Шагидуллин Р.Р., Махаева Г.Ф., Малыгин В.В. // Хим.-фарм. ж. 1997. Т. 31. С. 38–43.
22. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. С. 115–117.
23. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул. М.: Высшая школа, 1988.
24. Litchfield J.T., Wilcoxon F. // J. Pharm. Exp. Therap. 1949. V. 96. P. 99–113.

The Esterase Inhibiting Activity and Toxicity of *O,O*-Dialkyl *S*-Ethoxycarbonylbromomethylthiophosphates

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 of potential pesticides, *O,O*-dialkyl *S*-ethoxycarbonylbromomethylthiophosphates (RO)₂P(O)SCH(Br)COOC₂H₅ (R = Et, *i*-Pr, *n*-Pr, *n*-Bu, *n*-Am, or *n*-Hx) with the esterases of warm-blooded animals [acetylcholinesterase (ACE), butyryl cholinesterase (BCE), and carboxyl esterase (CE)] was studied. The acute toxicities of these compounds for mice were determined. All the compounds were non-hydrolyzable by CE and capable of irreversible inhibition of all these esterases with k_i (M⁻¹ min⁻¹) of 1.2×10^5 – 6×10^6 , 2.0×10^6 – 1.5×10^8 , and 2.0×10^8 , respectively. By using multiple regression analysis, we found that the steric factor plays a significant role in the inhibition of ACE, with the steric hindrances manifesting themselves even at the sorption stage. On the other hand, hydrophobic interactions predominate in the case of BCE, while steric properties of its substituents exert a markedly weaker effect and manifest themselves at the phosphorylation stage. We suggested the presence of an electrophilic region in the active site of ACE, which can interact with the ethoxycarbonyl group of the thiophosphates under study. The decrease in toxicities and the affinities to BCE and CE were found to correlate with an increase in the length of *n*-alkyl substituents of the compounds studied. This suggests that the unspecific esterases play a significant role as a buffer system in the exhibition of toxic effects by the thiophosphates under consideration.

Key words: acetylcholinesterase; butyryl cholinesterase; carboxyl esterase; *O,O*-dialkyl *S*-ethoxycarbonylbromomethylthiophosphates, acute toxicity, 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.