



УДК 547.26'118:577.152.311.042:541.697

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИСФОСФОРИЛИРОВАННЫХ МЕТАНОВ С ЭСТЕРАЗАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

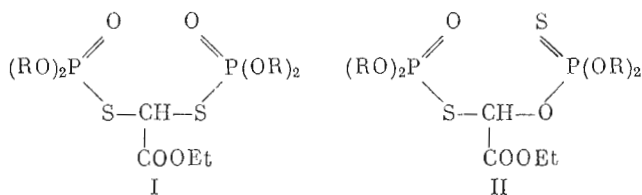
*Махаева Г.Ф., Шатаева Г.А., Янковская В.Л.,
Фетисов В.И., Лошадкин Н.А., Мартынов И.В.,
Хаскин Б.А.*, Шелученко О.Д.**

*Институт физиологически активных веществ
Академии наук СССР, Черноголовка;*

**Всесоюзный научно-исследовательский институт
химических средств защиты растений, Москва*

Изучено взаимодействие ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека, бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади, карбоксилэстеразы печени крысы с карбэтоксисибис (диалкоксифосфорилтио)метанами (I) и карбэтоксидиалкокситиофосфорилалкоксидиалкоксифосфорилтиофосфорилметанами (II). Установлено, что соединения типа I—II являются необратимыми ингибиторами эстераз и не гидролизуются карбоксилэстеразой. Сложный вид торможения активности холинэстераз данными соединениями обусловлен кинетическим проявлением образования фермент-ингибиторного комплекса. Исследованные соединения проявляют более высокую специфичность по отношению к бутирилхолинэстеразе по сравнению с ацетилхолинэстеразой и карбоксилэстеразой (k_{II} выше на два порядка), что обусловлено эффективным связыванием данных соединений в активном центре первого фермента (K_a 10^{-8} – 10^{-9} М) за счет гидрофобных взаимодействий. Установлена важная роль фрагмента молекулы ингибитора, содержащего тиофосфорильную группу, во взаимодействии соединений типа II с гидрофобными участками активного центра бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы.

В плане развития работ по поиску избирательных инсектицидов нами были синтезированы замещенные фосфорилированные метаны, содержащие карбэтоксильную группировку: карбэтоксисибис (диалкоксифосфорилтио)метаны (I) и карбэтоксидиалкокситиофосфорилалкоксидиалкоксифосфорилтиофосфорилметаны (II) [1]. Предполагалось, что такие соединения в отличие от ранее исследованных бис (диалкокситиофосфорилтио)метанов и диалкокситиофосфорилалкоксидиалкоксифосфорилтиофосфорилметанов [2, 3] будут гидролизываться под действием карбоксилэстераз млекопитающих, что должно привести к снижению их токсичности [4, 5].



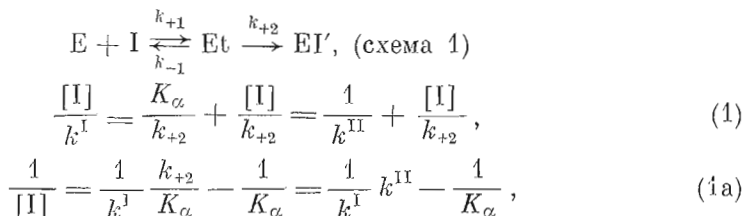
где R=Et, Pr, Prⁱ, Bu, Buⁱ.

В настоящей работе изучена антиферментативная активность соединений типа I—II в отношении эстераз млекопитающих: ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8), карбоксилэстеразы печени крысы (КФ 3.1.1.1), а также способность соединений типа I, II к гидролизу под действием карбоксилэстеразы печени крысы.

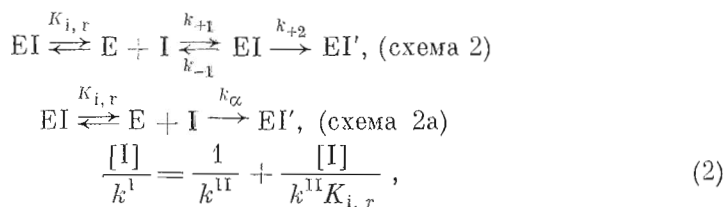
Установлено, что исследуемые соединения ингибируют все три фермента. Гидролиз соединений (I)—(II) карбоксилэстеразой не обнаружен. Это может быть обусловлено как высокими скоростями конкурирующего процесса ингибирования карбоксилэстеразы (см. ниже), так и устойчивостью изучаемых соединений к ферментативному гидролизу из-за стер-

ческих препятствий — разветвление у α -углеродного атома карбоксильной группировки [6].

Исследование кинетики ингибирования соединениями типа I, II показало, что ингибирование карбоксилэстеразы является чисто необратимым [7, 8], а при ингибировании ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы наблюдается сложный вид торможения, т. е. наряду с необратимым, прогрессирующим во времени угнетением наблюдается обратимое торможение. Последнее может иметь место при кинетическом проявлении наличия фермент-ингибиторного комплекса (см. схему 1, ур-ния 1, 1а) [7, 9, 10].



или в случае комбинированного торможения (схемы 2, 2а, ур-ние 2) [7, 11, 12]



где E — фермент, I — ингибитор (фосфорорганическое соединение), EI — промежуточный фермент-ингибиторный комплекс, EI' — фосфорилированный фермент, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} — константы скорости промежуточных стадий. Константа сродства ингибитора к ферменту K_α равна отношению $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1} \approx k_{-1}/k_{+1}$. Бимолекулярная константа скорости угнетения второго порядка (k^{II}) равна $k_{+1}k_{+2}/(k_{-1} + k_{+2}) = k_{+2}/K_\alpha$.

Следует отметить, что константы, характеризующие необратимое (k^{II}) и обратимое (K_α , $K_{i,r}$) торможения, независимо от выбранной схемы и уравнения получаются одинаковыми. В качестве примера в табл. 1 представлены данные по взаимодействию с бутирилхолинэстеразой *n*-пропильного производного соединения типа II (концентрация ингибитора менялась от 0,85 до 3,4 мМ).

Как видно из табл. 1, константы, характеризующие необратимое и обратимое торможения, рассчитанные по уравнениям (1), (1а), (2), практически не различаются. В то же время смысл констант K_α и $K_{i,r}$ разный. В соответствии со схемой 1 предполагается, что ингибитор сорбируется в активном центре фермента с образованием комплекса Михаэлиса и кинетическое проявление сложного вида торможения связано с тем, что $k_2 \leq k_{-1}$ и $[I] \geq K_\alpha$ [7]. Согласно же схеме 2, ингибитор образует с фер-

Таблица 1

Константы ингибирования бутирилхолинэстеразы соединением $(PrO)_2P(O)SCH(COOEt)OP(S)(OPr)_2$, рассчитанные по схемам 1 и 2*

Константы	Уравнение		
	1а [9]	1 [10]	2 [11, 12]
$K_\alpha(K_{i,r}) \cdot 10^9, M$	1,0	0,8	0,8
$k^{II}(k_\alpha) \cdot 10^{-8}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	2,2	2,5	2,5
$k_{+2}, \text{мин}^{-1}$	0,22	0,20	—

* Среднеквадратичное отклонение полученных величин констант не превышает 10%.

Ингибирование бутирилхолинэстеразы соединениями типа I и II *

R	I				II			
	$k_{\text{экср}}^{\text{II}} \cdot 10^{-7},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} **$	$k_{+2},$ мин^{-1}	$K_{\alpha}, 10^7, M$	$k_{\text{II}} \cdot 10^{-7},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$k_{\text{экср}}^{\text{II}} \cdot 10^{-8},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} **$	$k_{+2},$ мин^{-1}	$K_{\alpha}, 10^7, M$	$k_{\text{II}} \cdot 10^{-8},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
Et	0,51	0,49	0,53	0,91	0,91	2,22	1,79	1,24
Pr	3,40	2,77	0,48	5,7	1,24	0,20	0,08	2,5
Pr ⁱ	0,24	0,67	1,66	0,4	0,18	1,00	4,30	0,23
Bu	8,30	1,00	0,1	9,5	0,38	0,93	1,20	0,75
Bu ⁱ	8,60	—	—	—	0,22	0,17	0,33	0,50

* См. примечание к табл. 1.

** Величины $k_{\text{экср}}^{\text{II}}$, определенные из зависимости $\lg(v_0/v_1) = f(I)$, связаны с k^{II} , рассчитанными по методу [10], уравнением $k_{\text{экср}}^{\text{II}} = 0,664 (k^{\text{II}}_{\text{расч}})^{1,022} (n=17, r=0,997)$.

Таблица 3

Ингибирование ацетилхолинэстеразы соединениями типа I и II *

R	I				II			
	$k_{\text{экср}}^{\text{II}} \cdot 10^{-6},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} **$	$k_{+2},$ мин^{-1}	$K, 10^6, M$	$k_{\text{II}} \cdot 10^{-6},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$k_{\text{экср}}^{\text{II}} \cdot 10^{-6},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} **$	$k_{+2},$ мин^{-1}	$K_{\alpha}, 10^6, M$	$k_{\text{II}} \cdot 10^{-6},$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
Et	0,23	0,70	3,5	2,0	1,92	2,86	14,6	2,0
Pr	4,45	0,70	0,45	15,4	3,45	0,75	0,15	5,0
Pr ⁱ	0,14	1,51	39,2	0,38	0,54	2,04	26,9	0,75
Bu	6,9	—	—	—	5,5	1,60	1,50	10,6
Bu ⁱ	6,9	—	—	—	2,67	0,82	1,23	6,6

* См. примечание к табл. 1.

** См. примечание к табл. 2.

Таблица 4

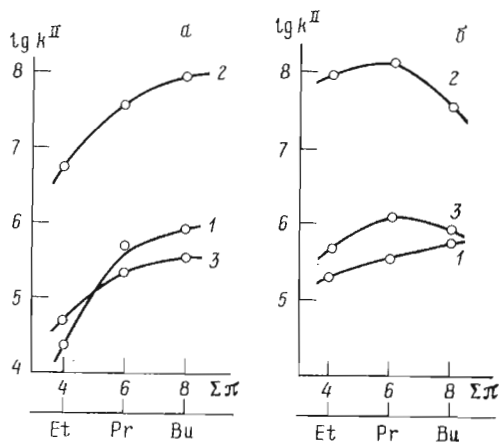
Ингибирование карбоксилэстеразы печени крысы соединениями типа I—II *

R	I	II
	$k^{\text{II}}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$k^{\text{II}}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
Et	$4,75 \cdot 10^4$	$4,55 \cdot 10^5$
Pr	$2,30 \cdot 10^5$	$1,23 \cdot 10^6$
Pr ⁱ	$4,31 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^4$
Bu	$2,93 \cdot 10^5$	$8,05 \cdot 10^5$
Bu ⁱ	$3,14 \cdot 10^6$	$1,06 \cdot 10^6$

* См. примечание к табл. 1.

ментом кроме михаэлисовского комплекса также комплекс, не являющийся комплексом Михаэлиса [7, 11], т. е. схема 1 предусматривает лишь «продуктивную», а схема 2 — и «непродуктивную» сорбцию ингибитора.

Для того чтобы отнести наблюдаемый сложный вид торможения к схеме 1 или 2, мы провели оценку зависимости изменения констант, характеризующих необратимое торможение, от констант, характеризующих обратимое торможение. Для исследованных соединений наблюдается хорошая корреляция между величинами $\lg k^{\text{II}} (\lg k_{\alpha})$ и $\lg K_{\alpha} (\lg K_{1,r})$: $\lg k^{\text{II}} = 1,081 - 0,829 \lg K_{\alpha}$ ($n=17, r=0,947$). Величина тангенса угла наклона, близкая к единице, свидетельствует о выраженной зависимости k^{II} от K_{α} . Это позволяет наблюдаемый сложный вид торможения отнести



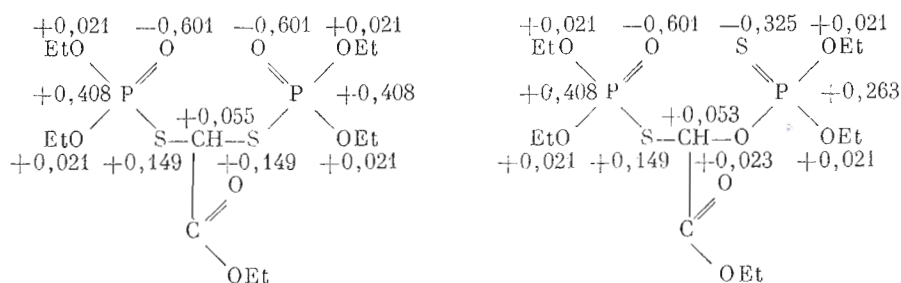
Зависимость логарифма константы ингибирования ацетилхолинэстеразы (1), бутирилхолинэстеразы (2) и карбоксилэстеразы (3) соединениями типа I (а) и II (б) от гидрофобности

к необратимому торможению с образованием промежуточного фермент-ингибиторного комплекса (схема 1), т. е. имеет место «продуктивная» сорбция фосфорорганического ингибитора в активных центрах холинэстераз. Поэтому данные по ингибированию холинэстераз соединениями типа I и II (табл. 2, 3) можно трактовать таким образом, что величина K_a отражает обратимую стадию в схеме 1.

Как видно из табл. 2–4, исследуемые соединения более специфические ингибиторы бутирилхолинэстеразы, чем ацетилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы: величины бимолекулярных констант скорости взаимодействия соединений типа I и II с первым ферментом ($k^{II} \approx 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, табл. 2) на два порядка выше, чем значения соответствующих констант в случае двух других ферментов (табл. 3 и 4). Из сопоставления величин K_a для холинэстераз следует, что высокие значения константы ингибирования бутирилхолинэстеразы обусловлены эффективным связыванием молекулы ингибитора в активном центре этого фермента ($K_a \sim 10^{-8} - 10^{-9} \text{ M}$), т. е. наиболее сильно гидрофобные взаимодействия проявляются при ингибировании исследуемыми соединениями именно бутирилхолинэстеразы. Это согласуется с литературными данными [13] о том, что гидрофобные участки в активном центре холинэстераз имеют большее значение для бутирилхолинэстеразы, чем для ацетилхолинэстеразы.

Во всех случаях изопропильные производные являются более слабыми ингибиторами эстераз, чем их изомеры нормального строения. Согласно табл. 2, 3, снижение антиэстеразной активности при введении изопропильной группы обусловлено увеличением константы K_a , т. е. менее эффективным связыванием фермента с ингибитором.

Сопоставление влияния гидрофобности исследуемых соединений на антиферментативную активность по отношению к различным ферментам показывает (рисунок), что с увеличением длины радикала нормального строения при взаимодействии эстераз с соединениями типа I увеличиваются константы ингибирования для всех трех ферментов (рисунок, а). Что же касается соединений типа II (рисунок, б), то возрастание k^{II} с увеличением длины заместителя от этила до *n*-бутила наблюдается только в случае ингибирования ацетилхолинэстеразы; в случае ингибирования бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы при переходе от пропильных заместителей к *n*-бутильным антиферментативная активность соединений снижается. Столь различное поведение ингибиторов типа I и II объясняется, вероятно, различием во влиянии их структуры на стадию образования фермент-ингибиторного комплекса.



Проведенный расчет электронной плотности в молекулах этих соединений по простому методу Хюккеля в параметризации [14] показывает, что соединения типа II имеют одинаковый заряд с соединениями типа I на атоме фосфора и кислорода в фосфорильном центре и меньшие заряды в тиофосфорильном. В соответствии с этими расчетами можно предположить, что в соединениях типа II фосфорилирующим фрагментом является фрагмент молекулы, содержащий фосфорильную группу, и, учитывая, что заряды на атомах фосфора в фосфорильных группах соединений I и II одинаковы, можно ожидать одинаковую фосфорилирующую способность этих соединений. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о том, что соединения типа II являются более сильными ингибиторами бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы, чем соединения типа I, причем в основном за счет более высокого сродства к активным центрам этих ферментов на стадии образования фермент-ингибиторного комплекса (для них характерны более низкие значения величин K_a). Это, по-видимому, обусловлено вкладом взаимодействия тиофосфорильного фрагмента молекул соединений типа II с гидрофобными участками бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы.

Таким образом, показано, что сложный характер торможения холинэстераз исследуемыми соединениями связан с кинетическим проявлением наличия фермент-ингибиторного комплекса. Установлена важная роль фрагмента молекулы ингибитора, содержащего тиофосфорильную группировку, в гидрофобном связывании молекулы в активном центре бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы.

Показано, что гидрофобные взаимодействия играют большую роль при ингибировании исследуемыми соединениями бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы, чем ацетилхолинэстеразы, причем наиболее сильно они проявляются в случае ингибирования бутирилхолинэстеразы. Полученные данные указывают на то, что гидрофобные участки активной поверхности более выражены у бутирилхолинэстеразы, чем у других исследованных ферментов.

Экспериментальная часть

Карбэтоксидис (диалкоксифосфорилтио)метаны (I), карбэтоксидиалкокситиофосфориллоксидиалкоксифосфорилтиометаны (II) синтезированы по методике [1]. Чистоту соединений контролировали методом ТСХ.

Частично очищенную карбоксилэстеразу (2 ед. акт./мг белка) получали по описанному методу [3]. Использовали коммерческие препараты ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы Пермского НИИ вакцин и сывороток с уд. акт. 4 и 9,6 ед. акт./мг белка соответственно.

Скорость ингибирования эстераз определяли, измеряя остаточную активность ферментов после инкубации с ингибитором. 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).

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаскин Б. А., Шелученко О. Д., Торгашева Н. А. Ж. общ. химии, 1982, т. 52, № 3, с. 597-601.
2. Шустова В. П., Хаскин Б. А., Шелученко О. Д., Рославецова С. А., Торгашева Н. А., Хейнман В. А. В кн.: Пестициды и их применение. М.: НИИТЭХИМ, 1983, с. 23-29.
3. Махаева Г. Ф., Хаскин Б. А., Носенко Е. Н., Веселова В. Л., Шелученко О. Д., Лошадкин Н. А. В кн.: Пестициды и их применение. М.: НИИТЭХИМ, 1983, с. 17-23.
4. О'Брайн Р. Д. Токсичные эфиры кислот фосфора. М.: Мир, 1964, с. 390-397.
5. Нейтан Е. In: Enzymatic basis of detoxication/Ed. Jakobj W. В. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 2, p. 291-323.
6. Махаева Г. Ф., Веселова В. Л., Мastroюкова Т. А., Шунов А. Э., Жданова Г. В., Кабачник М. И. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 7, с. 920-925.
7. Aldridge W. N., Reiner E. Enzyme inhibitors as substrates. Amsterdam - London: North-Holland Publ. Comp., 1972.
8. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965, 248 с.
9. Main A. R. Science, 1964, v. 144, p. 992-993.
10. Clothier B., Johnson M. K., Reiner E. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 660, № 2, p. 306-316.
11. Aldridge W. N., Reiner E. Biochem. J., 1969, v. 115, p. 147-160.
12. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалев М. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. Докл. АН СССР, 1971, т. 200, № 1, с. 103-106.
13. Бресткин А. П. В сб.: Химия и применение фосфорорганических соединений. Тр. III Всес. конф. М.: Наука, 1972, с. 322-332.
14. Van Cattedge F. A. J. Org. Chem., 1980, v. 45, p. 4801-4802.

Поступила в редакцию:
7.III.1984

INTERACTION OF BISPHTHOSPHORYLATED METHANES WITH MAMMALIAN ESTERASES

МАХАЕВА Г. Ф., ШАТАЕВА Г. А., ЯНКОВСКАЯ В. Л.,
ФЕТИСОВ В. И., ЛОШАДКИН Н. А., МАРТЫНОВ И. В.,
ХАСКЫН В. А.,* ШЕЛУЧЕНКО О. Д.*

*Institute of Physiologically Active Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Chernogolovka; *All-Union Research Institute of Plant
Protection Chemicals, Moscow*

The interaction of human erythrocyte acetylcholinesterase, horse serum butyrylcholinesterase and rat liver carboxylesterase with insecticides (RO)₂P(O)SCH(COOEt)SP(O)(OR)₂ (I) and (RO)₂P(O)SCH(COOEt)OP(S)(OR)₂ (II) was studied. The type I and II compounds were not hydrolyzed by carboxylesterase and inhibited the esterases irreversibly. A complex pattern of inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by these compounds was caused by kinetically-manifested formation of an enzyme-inhibitor complex. The compounds I and II were more selective towards butyrylcholinesterase than towards acetylcholinesterase and carboxylesterase (*k*¹¹ two orders of magnitude higher) because of effective binding in the butyrylcholinesterase active center (*K*_α 10⁻⁸-10⁻⁹ M) due to hydrophobic interaction. An important role of the thionphosphoryl-containing fragment in the interaction of type II compounds with hydrophobic sites of butyrylcholinesterase and carboxylesterase active centers was established.