



УДК 547.26'118:577.152.311.042:541.697+519.237.5

## НЕЛИНЕЙНАЯ МОДЕЛЬ «ГИДРОФОБНОСТЬ — АНТИЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ» ДЛЯ НЕКОТОРЫХ ТИПОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

*Фетисов В. И., Махаева Г. Ф., Лошадкин Н. А.,  
Мартынов И. В., Хаскин Б. А.\**

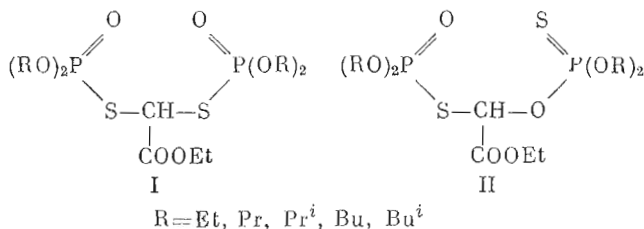
*Институт физиологически активных веществ Академии наук СССР,  
Черноголовка;*

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

Рассмотрены зависимости антиэстеразной активности от структуры для карбэтоксифосфорилтиометанов (I) и карбэтоксидиалкоксифосфорилтиометанов (II). Построены нелинейные регрессионные уравнения (параболические и билинейные), связывающие антиэстеразную активность соединений типов (I) и (II) с их гидрофобностью. Изучены зависимости индивидуальных констант от гидрофобности и предложены детальные механизмы взаимодействия соединений типа (I) и (II) с активными центрами эстераз, основанные на предположении о различных типах сорбции I и II в активных центрах ферментов.

Применимость билинейных моделей типа модели Кубиньи для изучения связи структура — антиферментативная активность проиллюстрирована несколькими уравнениями, построенными исходя из литературных данных по ингибированию эстераз различными фосфорорганическими соединениями.

Ранее нами изучалась зависимость антиэстеразной активности карбэтоксифосфорилтиометанов (I) и карбэтоксидиалкоксифосфорилтиометанов (II) от их строения по отношению к трем эстеразам: ацетилхолинэстеразе эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразе сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) и карбоксилэстеразе печени крысы (КФ 3.1.1.1) [1].



Было отмечено наличие нелинейной зависимости антиэстеразной активности от гидрофобности соединений [1]. Подобные нелинейные зависимости известны (например, [2—4]) и для других структурных типов ингибиторов эстераз, причем сколько-нибудь приемлемого объяснения существования таких «физических уродцев» (по выражению К. Хэнча) до последнего времени не было, за исключением работы Франке [5], который предложил относить это явление за счет различия в участках сорбции на активном центре фермента для соединений с сильно различающейся гидрофобностью.

В настоящей работе мы предлагаем использовать для моделирования связи «структура — антиэстеразная активность» билинейную модель Кубиньи [6], рассматривающую зависимость биоактивности соединений от их гидрофобности путем учета распределения вещества в двух фазах: гидрофобной (рецепторной) и водной. Биоответ в этой модели пропорционален вероятности достижения веществом биомишени, причем вероятность в данном случае определяется на основе кинетической схемы перераспределения вещества между двумя фазами. Основное уравнение модели Кубиньи соответствует хорошо известному уравнению абсорбции вещества,

растворенного в воде, растворителем, не смешивающимся с водой:

$$\lg \text{BO} = a \lg P - b \lg (\beta P + 1) + c, \quad (1)$$

где БО — биоответ,  $P$  — коэффициент распределения вещества между водной и гидрофобной (например, 1-октанол) фазами,  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\beta$  — параметры модели, определяемые из экспериментальных данных, причем отношение  $b/a$  характеризует количество фаз, а  $\beta$  — соотношение объемов гидрофобной и водной фаз.

Поскольку в двух предельных случаях ( $P \rightarrow 0$ ,  $P \rightarrow \infty$ ) это уравнение превращается в уравнения прямой линии с коэффициентами при  $\lg P$   $a$  и  $(a-b)$  соответственно, модель называется билинейной.

Следует отметить, что существенным преимуществом модели Кубиньи по сравнению с параболической моделью Хэнча является возможность существенной трактовки параметров модели.

Оказалось, что зависимость антиэстеразной активности соединений типа I и II ( $\lg k^{\text{II}}$ , где  $k^{\text{II}}$  — константа скорости ингибирования второго порядка) от их гидрофобности ( $\Sigma\pi$  — сумма констант гидрофобности заместителей по Хэнчу) для каждого из ферментов (ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы) укладывается на одну плавную кривую при смещении кривых для соединений типа I ( $P=0$ ,  $P=0$ ) влево по оси абсцисс на 4,4 единицы гидрофобности. В случае ацетилхолинэстеразы кривую для соединений типа II необходимо дополнительно сместить вверх по оси ординат на 0,82 единицы активности ( $\lg k^{\text{II}}$ ).

Такой прием, учитывающий различие в гидрофобности и активности двух изомеров, позволил нам построить параболические уравнения (2) — (4) по Хэнчу для соединений с неразветвленными заместителями. При моделировании использовалась суммарная константа гидрофобности только для заместителей с учетом поправки, т. е.  $\Sigma\pi^* = \Sigma\pi - 4,4$ , где  $\Sigma\pi^*$  — сумма констант гидрофобности заместителей по Хэнчу для соединений типа I, а  $\Sigma\pi$  — для соединений типа II (например, для этильных производных соединений типа I и II получены значения  $\Sigma\pi^* = -0,4$  и  $\Sigma\pi = 4,0$  соответственно).

$$\lg k_{\text{A}}^{\text{II}} = 4,667 + 0,482 \Sigma\pi^* - 0,032 (\Sigma\pi^*)^2 \quad (2)$$

$n = 6 \quad r = 0,979 \quad s = 0,206 \quad F = 34,8$

$$\lg k_{\text{B}}^{\text{II}} = 6,888 + 0,466 \Sigma\pi^* - 0,047 (\Sigma\pi^*)^2 \quad (3)$$

$n = 6 \quad r = 0,994 \quad s = 0,069 \quad F = 133,2$

$$\lg k_{\text{K}}^{\text{II}} = 4,820 + 0,294 \Sigma\pi^* - 0,019 (\Sigma\pi^*)^2 \quad (4)$$

$n = 6 \quad r = 0,968 \quad s = 0,162 \quad F = 22,2$

Константы с индексом А, Б и К соответствуют значениям, полученным для ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы;  $n$ ,  $r$ ,  $s$ ,  $F$  — соответственно количество точек, коэффициент множественной корреляции, стандартное отклонение, критерий Фишера.

При построении уравнений использовали величины  $k_{\text{эксII}}^{\text{II}}$ , которые связаны с  $k^{\text{II}}$ , рассчитанными по методу [7], следующим уравнением:  $k_{\text{эксII}}^{\text{II}} = 0,664(k_{\text{расчII}}^{\text{II}})^{1,022}$  ( $n=17$ ,  $r=0,997$ ) [1].

На основании уравнений (2) — (4) мы построили модели типа Кубиньи (5) — (7):

$$\lg k_{\text{A}}^{\text{II}} = 4,777 + 0,301 \Sigma\pi^* - 0,610 \lg (1 + 10^{\Sigma\pi^* - 7}) \quad (5)$$

$n = 6 \quad r = 0,951 \quad s = 0,313 \quad F = 14,2$

$$\lg k_{\text{B}}^{\text{II}} = 6,901 + 0,290 \Sigma\pi^* - 0,545 \lg (1 + 10^{\Sigma\pi^* - 5}) \quad (6)$$

$n = 6 \quad r = 0,934 \quad s = 0,118 \quad F = 44,4$

$$\lg k_{\text{K}}^{\text{II}} = 4,841 + 0,208 \Delta\pi^* - 0,548 \lg (1 + 10^{\Sigma\pi^* - 7}) \quad (7)$$

$n = 6 \quad r = 0,977 \quad s = 0,139 \quad F = 30,9$

Хорошие статистические показатели моделей свидетельствуют о применимости модели Кубиньи для анализа связи «структура — активность»

в данном случае. Рассматриваемый нами пример не является единственным. Для иллюстрации ниже приведены уравнения, полученные с использованием литературных данных по взаимодействию фосфорорганических соединений с холинэстеразами: применялась модель Хэнча и в случае достаточного количества точек — модель Кубиньи.

Для О-этил-*n*-нитрофенилалкилфосфонатов типа  $C_2H_5O(R)P(O) \cdot OC_6H_4NO_2-n$  (данные из [3]) с нормальными заместителями:

$$\lg k_A^{II} = 6,848 + 0,45 \pi - 0,281 \pi^2 \quad (8)$$

$$n = 6 \quad r = 0,950 \quad s = 0,226 \quad F = 13,9$$

$$\lg k_A^{II} = 6,571 + 1,595 \pi - 2,571 \lg(1 + 10^{\pi-0,8}) \quad (9)$$

$$n = 6 \quad r = 0,976 \quad s = 0,159 \quad F = 26,7$$

для соединений с разветвленными заместителями:

$$\lg k_A^{II} = 0,253 + 4,826 \pi - 0,939 \pi^2 \quad (10)$$

$$n = 4 \quad r = 0,934 \quad s = 0,455 \quad F = 3,4$$

Для нормальных О-алкил-*n*-нитрофенилметилфосфонатов типа  $RO(CH_3)P(O)OC_6H_4NO_2-n$  (по данным из [4]):

$$\lg k_A^{II} = 4,813 + 2,526 \pi - 0,651 \pi^2 \quad (11)$$

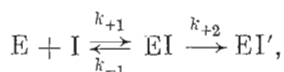
$$n = 5 \quad r = 0,997 \quad s = 0,063 \quad F = 152,2$$

$$\lg k_A^{II} = 5,196 + 1,597 \pi - 3,076 \lg(1 + 10^{\pi-1,9}) \quad (12)$$

$$n = 5 \quad r = 0,995 \quad s = 0,074 \quad F = 110,0$$

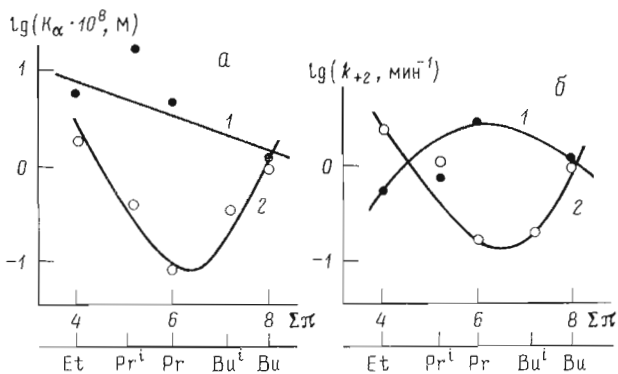
Аналогичные зависимости получены для бутирилхолинэстеразы и карбоксилэстеразы.

Анализ уравнений (2)–(12) свидетельствует о применимости модели Кубиньи к изучению связи «структура — антиэстеразная активность». Вместе с тем в уравнениях (2)–(12) в качестве меры активности были использованы брутто-константы скорости второго порядка, тогда как для детального понимания процессов желательнее рассматривать связь «структура — активность» на уровне индивидуальных констант. В качестве таковых обычно используют константы  $K_a$  (константа обратимого связывания) и  $k_{+2}$  (константа скорости стадии фосфорилирования). Эти константы могут быть вычислены из экспериментальных данных по уравнениям, выведенным на основании следующей кинетической схемы [7]:



где  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{+2}$  — константы скорости промежуточных стадий. Константа сродства ингибитора к ферменту  $K_a$  равна  $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1} \approx k_{-1}/k_{+1}$ . Бимолекулярная константа скорости угнетения фермента второго порядка ( $k^{II}$ ) равна  $k_{+1}k_{+2}/(k_{-1} + k_{+2}) = k_{+2}/K_a$ . На рисунке в качестве примера приведены зависимости от гидрофобности индивидуальных констант ингибирования бутирилхолинэстеразы соединениями типа I и II. Анализ таких зависимостей для  $\lg K_a$  (рисунок) позволяет предположить различный характер сорбции молекул типа I и II на активной поверхности фермента. Для соединений типа II ( $P=O$ ,  $P=S$ ) зависимость  $\lg K_a$  от гидрофобности имеет параболический характер, причем, судя по виду кривой (рисунок, а), сорбцию можно считать гидрофобной. В случае соединений типа I гидрофобное взаимодействие можно охарактеризовать как дисперсионное — константа обратимого связывания линейно зависит от гидрофобности, а соединения с разветвленными заместителями выпадают из этой зависимости.

Зависимости  $\lg k_{+2}$  от гидрофобности для соединений типа I и II имеют характер параболических кривых, направленных противоположно друг другу (рисунок, б). Подобные зависимости для  $\lg k_{+2}$  наблюдались и в других случаях [8]. По всей видимости, константа  $k_{+2}$  кроме приписываемого ей смысла, вытекающего из кинетической схемы, отражает также гидрофобные взаимодействия с локальным окружением серина эстераз.



Зависимость константы  $K_{\alpha}$  (а) и  $k_{+2}$  (б) от гидрофобности для ингибирования бутирилхолинэстеразы соединениями типов I (1) и II (2)

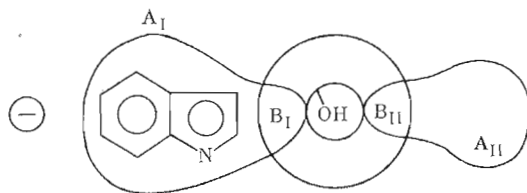
В этом случае противоположный ход зависимости  $\lg k_{+2}$  для соединений типа II ( $P=O$ ,  $P=S$ ) объясняется их «непродуктивной» сорбцией ( $k_{+2}$  минимально для соединения с оптимальным заместителем), т. е. для стадии, соответствующей  $k_{+2}$ , наблюдается несоответствие принципу «лучшее связывание — лучший катализ».

В соответствии с вышеизложенным мы предлагаем следующую качественную модель сорбции веществ типов I и II на активном центре холинэстераз, предполагающую два молекулярных механизма взаимодействия фосфорорганических ингибиторов с активными центрами эстераз  $A_I B_I$  (для соединений типа I) и  $A_{II} B_{II}$  (для соединений типа II), причем оба механизма реализуются поэтапно (этапы А и В).

В случае механизма  $A_I B_I$  молекула ингибитора первоначально сорбируется (этап А) на участке  $A_I$  активного центра за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий (вероятно, с индолом триптофана). Далее происходит десорбция — гидрофобная сорбция на эстеразном участке активного центра таким образом, что облегчается последующее фосфорилирование фермента (этап В).

В случае же механизма  $A_{II} B_{II}$  сорбция на обоих этапах определяется обобщенными гидрофобными взаимодействиями. «Обратный» вид зависимостей констант  $k_{+2}$  и  $K_{\alpha}$  от гидрофобности для соединения типа II позволяет предположить, что в этом случае снижающая активность сорбция на этапе В компенсируется менее эффективной сорбцией на этапе А, так, что в соответствии с уравнением  $k^{II} = k_{+2}/K_{\alpha}$  суммарный вид зависимостей  $\lg k^{II}$  от гидрофобности будет описываться тем же уравнением, что и в случае механизма  $A_I B_I$ .

Отметим, что с точки зрения предполагаемых механизмов  $A_I B_I$  и  $A_{II} B_{II}$  и смысла модели Кубиньи [6] параметр  $\beta$  в моделях Кубиньи применительно к антиэстеразной активности можно трактовать как характеристику размеров областей гидрофобного окружения эстеразного центра, причем, как следует из уравнений (5)–(7), эти размеры приблизительно равны при реализации обоих механизмов. В целом механизмы  $A_I B_I$  и  $A_{II} B_{II}$  могут быть условно представлены следующей схемой:



На основании этой модели мы разработали количественную модель. Можно предположить, что на первом (обратимом) этапе эффективность

взаимодействия ингибитора типа I с ферментом (вероятность в модели Кубиньи) будет определяться взаимодействием его с определенной группировкой активного центра, например индолем триптофана или имидазольном гистидина, так что  $\lg K_a$  должен линейно коррелировать с энергией дисперсионных взаимодействий — механизм  $A_I B_I$ . В пользу этого свидетельствует тот факт, что на рисунке 6 точки, соответствующие соединениям с разветвленными заместителями, не укладываются на прямую линию зависимости  $\lg K_a$  от  $\Sigma \pi$ , т. е. данное взаимодействие можно охарактеризовать как дисперсионное. Тогда для соединений с неразветвленными заместителями выполняется соотношение  $\lg K_a = a' \lg P + b'$ .

Эффективность взаимодействия (связывания) соединений типа II с ферментом будет определяться величиной, обратно пропорциональной вероятности сорбции. В соответствии с моделью Кубиньи [6], в которой вероятность определяется массой вещества, достигнутого мишени или, наоборот, депонированного, в случае механизма  $A_{II} B_{II}$  имеем

$$\lg K_a = -a \lg \frac{P}{\beta P + 1} + b,$$

где  $P$  — коэффициент распределения вещества в системе октанол — вода. В этом случае точки для соединений с разветвленными заместителями хорошо укладываются на параболу (точнее, на билинейную кривую).

Аналогичным образом при учете гидрофобных взаимодействий на втором этапе имеем

$$\text{для механизма } A_I B_I \text{ (соединения типа I)} \lg k_{+2} \sim \lg \frac{P}{\beta P + 1},$$

$$\text{для механизма } A_{II} B_{II} \text{ (соединения типа II)} \lg k_{+2} \sim -\lg \frac{P}{\beta P + 1}$$

Результирующий биоответ (в данном случае это бимолекулярная константа ингибирования  $k^{II} = k_{+2}/K_a$ ) пропорционален произведению вероятностей:

$$\lg k^{II} \sim \lg (Pr_I Pr_{II}),$$

где  $Pr_I, Pr_{II}$  — вероятности осуществления соответствующих стадий; вероятности здесь определяются массой целевого расхода вещества (для второй стадии это масса вещества, профосфорилировавшего фермент).

С учетом дополнительных электронных ( $E_s$ ) и стерических ( $\sigma$ ) факторов общая модель имеет вид

$$\lg k^{II} = b_0 + b_1 \lg P - b_2 \lg (\beta P + 1) + b_3 E_s + b_4 \sigma. \quad (13)$$

Кроме того, при учете других участков сорбции, как продуктивной, так и непродуктивной, гидрофобные члены в модели усложняются, и мы имеем общую модель:

$$\lg k^{II} = b_0 + b_1 \lg P - \sum_i b_i \lg (\beta P + 1) + c E_s + d \sigma, \quad (14)$$

причем  $b_i$  могут иметь различные знаки, так что зависимость  $\lg k^{II}$  от гидрофобности может быть линейной, параболической и т. д.

Предлагаемая модель неявно содержит предположение о сложности стадий I и II, т. е. они неадекватны элементарным процессам сорбции и фосфорилирования, что хорошо иллюстрируется вышеприведенными зависимостями констант  $K_a$  и  $k_{+2}$  от строения соединений.

Таким образом, предложенный подход к моделированию «структура — антиэстеразная активность» позволяет объяснить вид зависимостей «гидрофобность — активность» как для изученных нами соединений, так и для соединений других структурных типов. Следствием предложенной общей модели является принципиальная возможность классифицировать фосфорорганические ингибиторы эстераз по участкам сорбции на активном центре и, следовательно, возможность предсказывать вероятный синергизм ингибиторов различных структурных типов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Махаева Г. Ф., Шагаева Г. А., Янковская В. Л., Фетисов В. И., Лошадкин Н. А., Мартынов И. В., Хаскин Б. А., Шелученко О. Д. Биорган. химия, 1984, т. 10, № 10, с. 1347–1352.
2. Садыков А. С., Розергарт Е. В., Абдувахабов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: ФАН, 1976, 206 с.
3. Fukuto T. R., Metkalf R. L. J. Med. Chem., 1959, v. 81, p. 372–377.
4. Ooms A. J. J. Ph. D. Thesis, Univ. Leiden, 1961, v. 2, p. 40–46.
5. Franke R., Kihne R. Eur. J. Med. Chem.—Chimica Therap., 1978, v. 13, № 5, p. 388–402.
6. Kubinyi H. Arzneimittel — Forschung, 1976, B. 26, № 11, S. 1991–1997.
7. Aldridge W. N., Reiner E. In: Enzyme inhibitors as substrates. Amsterdam — London: North-Holland Publ. Co., 1972.
8. Clothier B., Johnson M. K., Reiner E. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 660, № 2, p. 306–316.

Поступила в редакцию  
7.III.1984

### A NONLINEAR «HYDROPHOBICITY — ANTIESTERATIC ACTIVITY» MODEL FOR SOME TYPES OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

FETISOV V. J., МАКХАЕВА G. F., LOSHADKIN N. A.,  
MARTYNOV I. V., KHASKYN B. A.\*

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

The dependence of antiesteratic activity on the structure of insecticides  $(RO)_2P(O)-SCH(COOEt)SP(O)(OR)_2$  (I) and  $(RO)_2P(O)SCH(COOEt)OP(S)(OR)_2$  (II) was examined. Nonlinear regression equations (parabolic and bilinear) «hydrophobicity-antiesteratic activity» were derived. Basing on the studies of the relationships between hydrophobicity and individual constants, the detailed mechanisms were proposed for the interaction of type (I) and (II) compounds with the esterase active centers. The mechanisms implicate different kinds of sorbtion for compounds of type I and II. Applicability of bilinear models, similar to that of Kubinyi type, for analyzing the structure-antienzyme activity dependences was demonstrated. Thus, several equations were obtained starting from the literature data on inhibition of esterases with diverse organophosphorus compounds.