



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 18 * № 4 * 1992

УДК 577:311*7.042:547.341.022:539.193

© 1992 г. Н. Н. Шестакова, Е. В. Розенгарт, Б. С. Жоров*

ЗАВИСИМОСТЬ АНТИАЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ОТ ДОСТУПНОСТИ АТОМА ФОСФОРА

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург;

* Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Методом молекулярной механики рассчитаны устойчивые конформации 12 фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) ацетилхолинэстеразы. Оценена доступность атома фосфора ингибиторов для взаимодействия с нуклеофильной группой в активном центре фермента. В качестве продуктивных выбраны конформеры, у которых атом фосфора стерически доступен для взаимодействия со стороны, противоположной разрывающейся сложноэфирной связи. Обнаружена корреляция между активностью ФОИ и заселенностью их продуктивных конформаций.

Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7, АХЭ), принадлежащая к классу сериновых гидролаз, катализирует гидролиз сложных эфиров и может быть необратимо ингибирована фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ). Одним из главных требований к строению ацильной (фосфорильной) части сложноэфирного лиганда АХЭ является компактность его структуры [1]. Об этом свидетельствует более высокая скорость гидролиза ацетатов по сравнению с другими ацилатами [2], а также большая эффективность ФОИ, имеющих короткие алкильные радикалы в фосфорильной части молекулы [3]. В этой связи чрезвычайно отсутствие антихолинэстеразного действия у циклических фосфорилианов [4] с компактной фосфорильной группировкой и нитрофенильной группой в отщепляемой части молекулы (соединения (I)–(V) в табл. 1). В то же время ациклический аналог этих соединений, О,О-диэтил-*n*-нитрофенилфосфат (V), является выраженным необратимым антиацетилхолинэстеразным агентом [5]. Циклическое (I) и ациклическое (V) соединения близки по степени гидрофобности, объему фосфорильной группы, прочности сложноэфирной связи (о чем свидетельствуют равные константы скорости их щелочного гидролиза $k_{\text{ОН}}$ (см. табл. 1)). Введение второй нитрогруппы, повышая скорость щелочного гидролиза, не увеличивает эффективность ингибиторов (ср. соединения (I) и (IV)).

Согласно современным представлениям [6, 7], в основе необратимого угнетения холинэстераз под действием ФОИ лежит реакция фосфорилирования гидроксила серина активного центра фермента, протекающая, как и реакция щелочного гидролиза, по механизму нуклеофильного замещения. Помимо прочности разрываемой сложноэфирной связи на эффективность обеих реакций должна влиять стерическая доступность атома фосфора, т. е. возможность подхода к нему нуклеофильной группировки. Принципиальное различие в ингибирующей способности по отношению к АХЭ циклических соединений (I)–(IV) и их ациклического аналога (V)

Таблица 1

Антихолинэстеразная эффективность (pI_{50}) и константа скорости щелочного гидролиза (k_{OH}) [4] нитрофенилсодержащих ФОИ, а также заселенность (p) конформеров с доступным атомом фосфора

Соединение	Структура	$k_{\text{OH}}, \text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	pI_{50}	$p, \%$
I		1,56	<3,0	0
II		0,69	<3,0	0
III		1,49	<3,0	0
IV		3,10	3,0	0
V *		0,94	7,6	26

* Бимолекулярная константа скорости ингибиования для соединения (V): $k_{II} = 1,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [3].

может быть следствием различных требований к доступности атома фосфора в реакции со свободным гидроксидом и в реакции с ферментом. Чтобы количественно оценить доступность атомов, необходимо знание конформационных возможностей молекулы. В настоящей работе методом молекулярной механики проведен конформационный анализ двух рядов ФОИ (с нитрофенильной и тиоэтилмеркаптоэтильной отщепляющимися группировками) с различной структурой фосфорильной части и определена доступность атома фосфора у найденных конформеров. Заселенность конформеров с доступным фосфором сопоставлена с антиацетилхолинэстеразной эффективностью выбранных ФОИ.

Метод расчета

Теоретический конформационный анализ ФОИ проводили методом молекулярной механики с помощью универсальной конформационной программы [8]. Устойчивые конформации отыскивали путем минимизации энергии с варьированием значений торсионных и валентных углов при постоянных длинах связей. Конформационную энергию представляли как сумму невалентных и торсионных взаимодействий, энергии деформации валентных углов и энергии замыкания циклов. Для расчета энергии невалентных взаимодействий использованы потенциалы, описанные в работе [9]. Параметры невалентных взаимодействий атома фосфора взяты из работы [10]. Для длии связей приняты значения (Å): $l_{\text{P}-\text{O}}=1,76$, $l_{\text{P}-\text{C}}=1,87$, $l_{\text{P}-\text{O}}=1,55$, $l_{\text{O}-\text{C}}=1,43$, $l_{\text{C}-\text{C}}=1,54$, $l_{\text{C}-\text{H}}=1,07$. При расчете торсионной энергии $E_{\text{tors}}=\sum V_t / 2 \cdot (1 + \cos 3\theta)$ использованы следующие значения барьеров кручения (V_t , ккал/моль): $V_{\text{P}-\text{O}}=1,0$, $V_{\text{O}-\text{C}}=1,0$, $V_{\text{C}-\text{C}}=3,0$. Энергию деформации валентных углов $E_{\text{vrr}}=\sum K_a (\theta - \theta_0)^2$ рассчитывали со следующими величинами силовых постоянных K_a : $K_{\text{P}}=100$, $K_{\text{O}}=90$, $K_{\text{C}}=100$ ккал· $\text{моль}^{-1} \cdot \text{рад}^{-2}$ при равновесном значении валентных углов $\theta_0=109,5^\circ$.

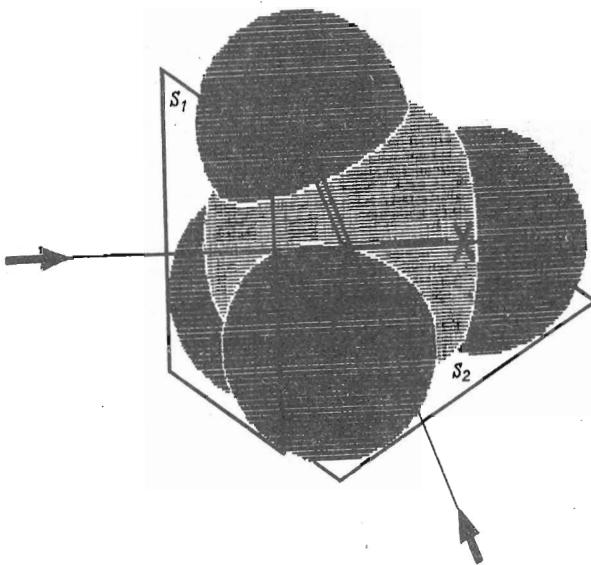


Рис. 1. Схема определения стерической доступности сторон атома фосфора для реакции нуклеофильного замещения. Через центр атома фосфора проведены векторы в двух возможных направлениях атаки нуклеофильной группировки: со стороны S_1 , противоположной разрывающейся сложноэфирной связи, и со стороны S_2 , противоположной фосфорильному кислороду. По касательной к ван-дер-ваальсовым поверхностям трех ближайших к вектору атаки атомов, связанных с фосфором, проведены плоскости. Конформер считается доступным в данном направлении, если у него нет атомов, выходящих за соответствующую плоскость. Знаком « \times » отмечена разрывающаяся связь

Энергию замыкания циклов рассчитывали как в работе [11]. Заселенности устойчивых конформаций (p , %) рассчитывали по формуле

$$p_i = 100 \cdot \exp(-\Delta E_i/RT) / \sum_j^N \exp(-\Delta E_j/RT),$$

где N – число устойчивых конформаций соединения, ΔE – энергия конформера, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, принятая равной 310 К.

Доступность атома фосфора для подхода нуклеофильной группировки у каждого конформера определяли следующим образом. Через центр атома фосфора проводили вектор в направлении атаки нуклеофильного агента. По касательной к ван-дер-ваальсовым поверхностям трех ближайших к вектору атаки атомов, связанных с фосфором, проводили плоскость. Конформер считали доступным в определенном направлении, если у него не было атомов, выходящих за соответствующую плоскость (рис. 1). Суммируя заселенности таких конформеров, оценивали вероятность существования молекулы в форме с фосфором, доступным в определенном направлении.

Результаты и обсуждение

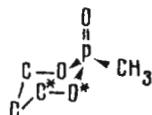
В работе [12] показано, что нуклеофильная атака сериновым гидроксилом атома фосфора возможна с двух направлений: со стороны S_1 , противоположной разрываемой связи, и со стороны S_2 , противоположной фосфорильному кислороду, причем наиболее вероятен первый путь.

Таблица 2

Стартовые и устойчивые конформации модели соединения (I) *

Стартовая конформация			Устойчивая конформация		
Тип	Номер	$\tau_1 - \tau_6$ **	E, ккал/моль	Доступная сторона фосфора ***	$\tau_1 - \tau_6$ **
Кресло	1	g, g ⁻ , g, g ⁻ , g, g ⁻	0,0	S_2	47, -56, 63, -63, 55, -47
	2	g ⁻ , g, g ⁻ , g, g ⁻ , g	0,2	-	-45, 54, -63, 63, -54, 45
Ванна	3	c, g, g ⁻ , c, g, g ⁻	4,3	-	-30, 65, -36, -34, 65, -33
	4	c, g ⁻ , g, c, g ⁻ , g	4,3	-	33, -66, 35, 35, -64, 30
Твист	5	g ⁻ , c, g, g ⁻ , c, g	4,7	-	3, -33, 66, -66, 33, -3
	6	g, c, g ⁻ , g, c, g ⁻	4,9	-	2, 25, -63, 69, -38, 4
	7	g, g ⁻ , c, g, g ⁻ , c	4,3	-	33, -66, 35, 35, -64, 30
	8	g ⁻ , g, c, g ⁻ , g, c	4,3	-	-30, 65, -36, -34, 65, -33
	9	g, g ⁻ , g, g, g ⁻ , g	4,3	-	33, -66, 35, 35, -64, 30
	10	g ⁻ , g, g ⁻ , g ⁻ , g, g ⁻	4,3	-	-30, 65, -36, -34, 65, -33
	11	g, g, g ⁻ , g, g, g ⁻	5,1	S_2	14, 36, -71, 42, 12, -40
	12	g ⁻ , g ⁻ , g, g ⁻ , g ⁻ , g	5,2	-	-8, -40, 72, -43, -9, 34
	13	g ⁻ , g, g, g ⁻ , g, g	5,3	-	-26, 0, 49, -72, 38, 6
	14	g, g ⁻ , g ⁻ , g, g ⁻ , g ⁻	5,1	S_2	40, -11, -43, 71, -35, -14

* Для расчетов конформационной подвижности фосфорильной группы соединения (I) использовали модель



** Обозначение торсионных углов в цикле: $\tau_1(\overset{*}{\text{O}}-\text{P}-\text{O}-\overset{*}{\text{C}})$, $\tau_2(\text{P}-\overset{*}{\text{O}}-\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{C}})$, $\tau_3(\overset{*}{\text{O}}-\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{C}})$, $\tau_4(\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{O}}-\overset{*}{\text{O}})$, $\tau_5(\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{O}}-\overset{*}{\text{O}}-\text{P})$, $\tau_6(\overset{*}{\text{C}}-\overset{*}{\text{O}}-\text{P}-\overset{*}{\text{O}})$.

*** Прочерк — атом недоступен с обеих сторон.

Предварительные расчеты соединения (I) показали, что атомы нитрофенильной группы ни при каких конформациях не экранируют атом Р со стороны S_1 и во многих конформациях не препятствуют подходу нуклеофильной группировки со стороны S_2 . Таким образом, низкая активность соединений (I)–(IV) не может быть объяснена экранирующим эффектом нитрофенильной группы. Поэтому в дальнейшем мы рассматривали упрощенные модели соединений этого ряда, в которых нитрофенильная группа заменена на метильную.

Известно, что самой выгодной конформацией циклогексана и его производных является кресло, твист-форма также отвечает минимуму энергии, а конформация ванны неустойчива. У соединения (I) из-за наличия в цикле гетероатомов возможно несколько неэквивалентных конформаций каждого типа. Поэтому в качестве стартовых были взяты 2 конформации кресла, 6 твист-конформаций, 6 конформаций ванны, а также переходные формы C_2 и C_s . Результаты расчетов приведены в табл. 2. Переходные формы C_2 и C_s оказались неустойчивыми. В результате минимизации из 16 стартовых конформаций было найдено 10 устойчивых конформаций (табл. 2). Судя по значениям торсионных углов, этот набор устойчивых конформеров является замещенного гетероцикла оказался существенно иным, чем в циклогексане. Поэтому конформации фосфорильной группы соединения (I) обозначали номерами, как в табл. 2.

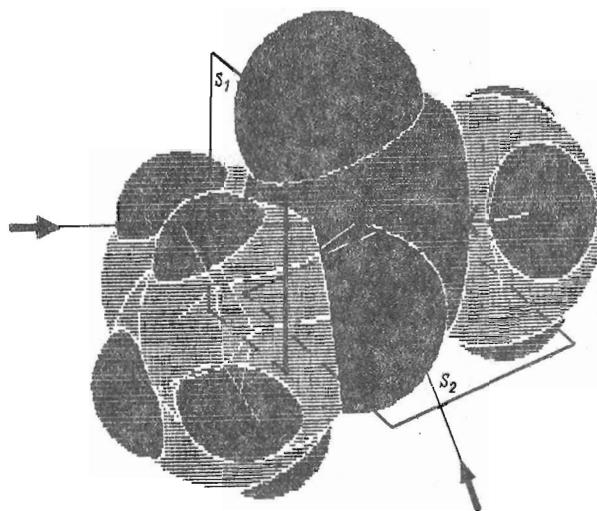


Рис. 2. Конформация 1 модели соединения (I). Атом фосфора со стороны S_1 недоступен, так как атомы цикла выходят за плоскость и препятствуют атаке нуклеофильной группировки в данном направлении. Со стороны S_2 атом фосфора доступен

Для всех устойчивых конформеров были рассмотрены возможности подхода к атому фосфора со сторон S_1 и S_2 . Как видно из табл. 2, у соединения (I) нет устойчивых конформаций с доступной для атаки стороной S_1 . Однако у трех конформаций, а именно конформации 1 кресла ($E=0,0$ ккал/моль) и твист-конформаций 11 и 12 ($E=5,1$ и $5,1$ ккал/моль), атом фосфора доступен со стороны S_2 (см. рис. 2).

Соединение (I) проявляет весьма слабую антиацицептилхолинэстеразную эффективность и, следовательно, не имеет высокозаселенных продуктивных конформеров. Это можно объяснить тем, что атака нуклеофильным агентом соединения (I) со стороны S_2 неэффективна из-за малой вероятности разрыва связи [12], а атака со стороны S_1 невозможна из-за отсутствия устойчивых конформеров с доступным атомом фосфора.

По конформационным возможностям соединения (II)–(IV) близки соединению (I). Метильные заместители в цикле дополнительно, по сравнению с соединением (I), уменьшают доступность атома фосфора. Отсутствие у этих соединений антиацицептилхолинэстеразной активности также можно объяснить отсутствием конформеров с доступным фосфором.

Результаты расчета ациклического диэтоксипроизводного (V), являющегося эффективным ФОИ необратимого типа действия, приведены в табл. 3. Фосфорильная группа имеет большой набор устойчивых конформеров с разной степенью доступности обеих сторон атома фосфора. Заселенность конформаций с доступной стороной атома фосфора S_2 равна 26 %.

Таким образом, в ряду (I)–(V) высокоактивно лишь соединение (V), имеющее конформеры с атомом фосфора, доступным для атаки нуклеофильной группой со стороны S_1 , противоположной разрывающейся связи. Такие конформации фосфорильных групп условимся считать продуктивными.

Результаты расчетов ФОИ (VI)–(XII) с различной структурой фосфорильной группы при одинаковой отщепляющейся тиоэтилмеркаптоэтильной группировке представлены в табл. 4. Анализ объемных моделей этих соединений показал, что тиоэтилмеркаптоэтильная группировка не экранирует атом Р со стороны S_1 . Поэтому в расчетах мы использовали упрощенные модели соединений (VI)–(XII), в которых отщепля-

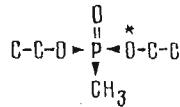
Таблица 3

Заселенность (%) и продуктивность конформаций фосфорильной группы $(C_2H_5O)_2P(O)$ соединений (V) и (IX)*

$\tau_1\tau_2^{**}$	$\tau_3\tau_4^{**}$								
	gg	gt	gg ⁻	tg	tt	tg ⁻	g-g	g ⁻ t	g-g ⁻
gg	0,0	0,4	0,0	0,1*	0,7*	0,1*	0,3	1,7	0,3
gt	0,0	0,6*	0,0	0,9*	6,1*	0,6*	2,8	11,2	2,1
gg ⁻	0,0	0,0	0,0	0,1*	0,9*	0,1*	0,1	0,6	0,1
tg	0,1	2,0	0,3	0,2	1,8	0,2	0,0	0,1	0,2
tt	0,6	11,0	1,9	1,2	8,7	1,0	0,3	2,6	0,6
tg ⁻	0,1	3,2	0,4	0,3	2,3	0,3	0,1	0,0	0,0
g ⁻ g	0,0	0,7*	0,1*	0,1*	0,5*	0,0	0,1	1,0	0,1
g ⁻ t	0,7*	5,4*	0,8*	0,5*	4,1*	0,5*	1,9	8,3	2,0
g ⁻ g ⁻	0,1*	1,0*	0,1*	0,1*	0,6*	0,1*	0,3	1,4	0,3

Знаком * отмечены продуктивные конформации.

* Для расчетов конформационной подвижности фосфорильной группы соединений (V) и (IX) использовали модель



** Обозначения двугранных углов: $\tau_1(\text{C}-\text{P}-\text{O}-\text{C})$, $\tau_2(\text{P}-\text{O}-\text{C}-\text{C})$, $\tau_3(\text{O}-\text{P}-\overset{*}{\text{O}}-\text{C})$, $\tau_4(\text{P}-\overset{*}{\text{O}}-\text{C}-\text{C})$.

Таблица 4

Бимолекулярная константа скорости ингибиования АХЭ (k_{II}) [3] и заселенность (p) продуктивных конформеров ФОИ $R^1R^2P(O)SC_2H_5SC_2H_5$ *

Соединение	R^1	R^2	k_{II} , $\text{M}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$	$p, \%$
VI	CH_3	C_2H_5O	$5,0 \cdot 10^4$	60
VII	C_6H_5	C_2H_5O	$3,4 \cdot 10^4$	40
VIII	$C_6H_5CH_2$	C_2H_5O	$1,5 \cdot 10^4$	31,5
IX	C_2H_5O	C_2H_5O	$6,4 \cdot 10^3$	26
X	$i\text{-C}_3H_7O$	$i\text{-C}_3H_7O$	$2,3 \cdot 10^3$	4,8
XI	$c\text{-C}_6H_{11}$	C_2H_5O	$1,5 \cdot 10^2$	10,4
XII			$< 10^2$	0

Коэффициент корреляции

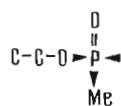
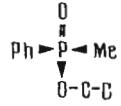
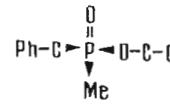
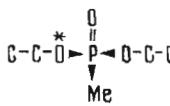
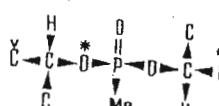
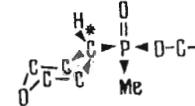
0,94

* Корреляция достоверна по критерию Фишера (коэффициент Фишера $F=43,63$, степень свободы $n=5$. При уровне значимости $\alpha=0,05$ выполняется условие $F>F_0$, где $F_0=6,61$ [13]).

ющаяся группа заменена метильной группой. При поиске устойчивых конформаций фосфорильных групп для торсионных углов, указанных в табл. 5, в качестве стартовых задавались комбинации значений t , g и g^- . Для каждого соединения рассчитаны суммарные заселенности продуктивных конформеров с атомом фосфора, доступным со стороны S_1 . Если у этоксиметильного производного (VI), обладающего наиболее

Таблица 5

Двугранные углы, которым при поиске устойчивых конформаций придавали значения τ , ϑ и φ

Соединение	Расчетные модели ФОИ	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4
VI		C-P-O-C	P=O-C-C		
VII		C-C-P-O	O=P-O-C	P-O-C-C	
VIII		C-C-C-P	C-C-P-O	C-P-O-C	P-O-C-C
IX		C-P-O-C	P-O-C-C	O-P-O-C	P-O-C-C
X		C-P-O-C	P-O-C-C	O-P-O-C	P-O-C-C
XI *		H-C-P-O	C-P-O-C	P-O-C-C	

* Расчет фосфорильной группы соединения (XI) проводили для двух конформаций кресла циклогексильной группировки.

сильным в этой группе ингибирующим действием, 60% молекул находятся в продуктивных конформациях, то у неактивного циклофосфамидного производного (XII), как и у его кислородсодержащего аналога (I), вообще нет таких конформеров. Как видно из табл. 4, имеет место корреляция между заселенностью конформеров с доступной стороной S , атома фосфора и бимолекулярной константой скорости ингибирования ФОИ k_{II} (коэффициент корреляции $r=0,94$). По критерию Фишера корреляция является достоверной [13].

Обнаруженная корреляция свидетельствует, что реакция нуклеофильного замещения идет через образование промежуточного комплекса, в ко-

тором атом кислорода гидроксила серина располагается на продолжении разрывающейся сложноэфирной связи. Чтобы ФОИ мог фосфорилировать активный центр АХЭ, он должен иметь конформеры, у которых атом фосфора со стороны S_1 стерически доступен для взаимодействия. При этом структура всей фосфорильной группы, в том числе и заместителей при атоме фосфора со стороны вектора атаки, должна быть близка к планарной. Примечательно, что природный субстрат ацетилхолин взаимодействует с тем же эстеразным участком АХЭ приблизительно планарной ацильной группой, причем атака серином происходит перпендикулярно плоскости ацильной группы [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Садыков А. С., Розенгард Е. В., Абдувахабов А. А., Аслонов А. Х. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент: ФАН, 1976. 206 С.
2. Бресткин А. П., Розенгард Е. В., Абдувахабов А. А., Садыков А. А. // Успехи химии. 1983. Т. LII. Вып. 10. С. 1624–1646.
3. Бресткин А. П., Годовиков Н. Н. // Успехи химии. 1978. Т. XLVII. Вып. 9. С. 1608–1627.
4. Фукуто Т. // Бюл. ВОЗ. 1972. Т. 44. С. 33–43.
5. Brestkin A. P., Khovalshikh A. E., Maizel E. B., Moralev S. V. // Insect Biochem. 1986. V. 16. № 4. P. 701–707.
6. Rosenberry T. L. // Adv. Enzymol. 1975. V. 43. P. 103–218.
7. Froede H. C., Wilson I. B. // Enzymes. 1971. V. 5. P. 87–114.
8. Жоров Б. С. // Автометрия. 1975. № 1. С. 23–29.
9. Momany F. A., Carrthers L. M., McGuire R. F., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1974. V. 78. № 16. P. 1595–1620.
10. Журкин В. Б., Погребев В. И., Флорентьев В. Л. // Молекулярная биология. 1980. Т. 14. № 5. С. 1116–1130.
11. Жоров Б. С. // Журн. структур. химии. 1982. Т. 23. № 5. С. 3–9.
12. Berman H. A., Decker M. M. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 7. P. 3951–3956.
13. Biometrika Tables for Statisticians / Eds Pearson E. S., Hartley M. N. Y.: Cambridge University Press, 1970. V. 1. Table 18.
14. О'Брайан Р. Токсичные эфиры кислот фосфора. М.: Мир, 1964. С. 465–467.

Поступила в редакцию
3.VII.1991

N. N. SHESTAKOVA, E. V. ROZENGART, B. S. ZHOROV*

RELATIONSHIP BETWEEN ANTIACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY OF ORGANOPHOSPHORUS INHIBITORS AND STERICAL ACCESSIBILITY OF PHOSPHORUS

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, Sanct-Peterburg;

* I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
Sanct-Peterburg

All equilibrium conformations of 12 antiacetylcholinesterase organophosphorus inhibitors were calculated by the molecular mechanics method. The accessibility of the phosphorus atom of the inhibitors for interactions with the nucleophilic group at the enzyme active centre was estimated. The conformers with the phosphorus atom sterically accessible from the side opposite to the breaking ester bond were classified as productive. A correlation was revealed between the activity of the inhibitors and the population of their productive conformation.