



УДК 547.26'118'466.07:541.697:577.152.311\*1.'042

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ДИТИО- И ТИОФОСФАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТЫ АМИНОКИСЛОТ, С КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗОЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

*Махасва Г.Ф., Веселови В.Л.*

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

*Мастрюкова Т.А., Шипов А.Э., Жданова Г.В.,  
Кабачник М.И.*

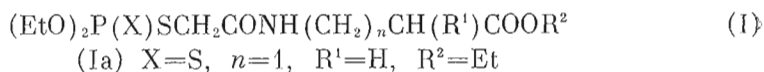
*Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва*

Изучено взаимодействие инсектоакарицидов общей формулы  $(EtO)_2P(S)S \cdot CH_2CONH(CH_2)_nCH(R^1)COOR^2$ , их метаболитов активации ( $P=O$ -аналоги) и детоксикации ( $R^2=H$ ) с карбоксилэстеразой из печени крыс. Показано, что производное  $\beta$ -аланина ( $n=1$ ,  $R^1=H$ ,  $R^2=Et$ ) легко гидролизуется карбоксилэстеразой. Производное валина ( $n=0$ ,  $R^1=Pr^i$ ,  $R^2=Et$ ) устойчиво к гидролизу, что вызвано стерическими препятствиями, создаваемыми изопропильной группой, и является обратимым конкурентным ингибитором карбоксилэстеразы. Соответствующие монотиофосфаты не гидролизуются карбоксилэстеразой, а необратимо ингибируют ее. Найдено, что при необратимом ингибировании монотиофосфатами производными  $R$ - и  $S$ -валина  $R$ -энантиомер несколько более активен, чем  $S$ -антипод, тогда как при обратимом ингибировании соответствующими дитиофосфатами более активен  $S$ -энантиомер. С помощью модельных соединений — этиловых эфиров ( $R$ )- и ( $S$ )- $N$ -хлорацетилвалина — показано, что различия в стереоспецифичности при необратимом и обратимом ингибировании обусловлены изменением ориентации ингибитора на активной поверхности фермента.

Ранее было показано, что среди тиофосфорорганических соединений типа (I), содержащих фрагменты аминокислот [1], имеются избирательные инсектициды и акарициды. Определена их токсичность для теплокровных животных, выяснены особенности метаболизма этих соединений в организме белых крыс и некоторые факторы, влияющие на формирование их токсичности [2]. При этом было установлено, что высокая токсичность соединения (Iб), содержащего фрагмент валина ( $LD_{50}$  90 мг/кг, мыши), обусловлена устойчивостью карбалкоксильной группы к гидролитическому расщеплению и преимущественным превращением путем окислительной десульфурации в токсичное монотиопроизводное (Iг) (метаболит активации), тогда как соединение (Iа), содержащее фрагмент  $\beta$ -аланина, в организме крысы быстро гидролизуется до кислоты (Iд) (метаболит детоксикации) и токсичность (Iа) весьма низка ( $LD_{50}$  2000 мг/кг).

Предполагалось, что различия в скорости детоксикации соединений (Iа) и (Iб) обусловлены различной скоростью расщепления сложноэфирной группировки под действием карбоксилэстераз [2]. Известно, что карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1) в значительных количествах содержатся в тканях млекопитающих и играют важную роль в метаболизме фосфорорганических пестицидов и других ксенобиотиков [3].

В настоящей работе изучено взаимодействие с карбоксилэстеразой из печени крыс дитио- и тиофосфатов, содержащих в алкильном радикале фрагменты  $\beta$ -аланина (Iа) и валина (Iб), а также их метаболитов активации (Iв, Iг) и детоксикации (Iд, Iе, Iж).



- (Iб) X=S, n=0, R<sup>1</sup>=Pr<sup>i</sup>, R<sup>2</sup>=Et  
 (Iв) X=O, n=1, R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=Et  
 (Iг) X=O, n=0, R<sup>1</sup>=Pr<sup>i</sup>, R<sup>2</sup>=Et  
 (Iд) X=S, n=1, R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H  
 (Iе) X=S, n=0, R<sup>1</sup>=Pr<sup>i</sup>, R<sup>2</sup>=H  
 (Iж) X=O, n=1, R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=H

Исследована способность дитиофосфатов (Iа) и (Iб) и метаболитов активации (Iв) и (Iг) гидролизываться под действием карбоксилэстеразы. Определены кинетические параметры ферментативного гидролиза. Все соединения (I) были испытаны как ингибиторы карбоксилэстеразы с использованием в качестве субстрата этилбутирата. Антикарбоксилэстеразную активность необратимых ингибиторов оценивали по величине бимолекулярной константы ( $k_{II}$ ) скорости взаимодействия соединений с ферментом. Сродство обратимых ингибиторов к карбоксилэстеразе характеризовали величиной  $K_i$ . Данные по взаимодействию соединений типа (I) с карбоксилэстеразой приведены в табл. 1.

Соединение (Iа), содержащее фрагмент β-аланина, гидролизуется карбоксилэстеразой. Кинетика его гидролиза подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен (рис. 1). Определены величины  $V$  и  $K_m$ .

Изучение карбоксилэстеразного гидролиза этилбутирата в присутствии соединения (Iа) показало, что последнее является обратимым конкурентным ингибитором карбоксилэстеразы (рис. 2), т. е. гидролиз его происходит на том же активном центре фермента, что и гидролиз этилбутирата.

Гидролиз соответствующего монотиоаналога (Iв) не обнаружен, поскольку это соединение необратимо ингибирует карбоксилэстеразу. Таким образом, кислота (Iж) не может быть продуктом карбоксилэстеразного гидролиза (Iв), как это предполагалось ранее [4]. Соединение (Iж) также является слабым необратимым ингибитором карбоксилэстеразы (табл. 1).

Дитиофосфат (Iб), содержащий фрагмент валина, не гидролизуется карбоксилэстеразой и является ее обратимым конкурентным ингибитором (рис. 3,  $K_i$   $1,60 \cdot 10^{-4}$  М). Его монотиоаналог (Iг) необратимо ингибирует фермент.

Сопоставление этих данных (см. табл. 1) показывает, что строение аминокислотного фрагмента практически не влияет на ингибиторную способность монотиофосфатов, но является определяющим для способности дитиофосфатов к гидролитическому расщеплению под действием карбоксилэстеразы. Так, производное β-аланина (Iа) гидролизуется карбоксилэстеразой лишь в 10 раз менее эффективно, чем этилбутират. Соединение (Iб), содержащее фрагмент валина, имеет в α-положении к карбоксильной группировке разветвленный изопропильный радикал.

Таблица 1

Взаимодействие соединений (Iа)–(Iж) с карбоксилэстеразой из печени крысы

Соединение	$V \cdot 10^6$ , моль/мин·мг	$K_m \cdot 10^4$ , М	$K_i \cdot 10^4$ , М	$k_{II}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>	LD <sub>50</sub> [2] (мышь, per os), мг/кг
(Iа)	0,51±0,02	6,1±0,4	8,25±0,8	—	2000
(Iб)	Не гидролизуется	—	1,6±0,08	—	90
(Iв)	»	—	—	(2,5±0,2) · 10 <sup>3</sup>	250
(Iг)	»	—	—	(2,6±0,2) · 10 <sup>3</sup>	75
(Iд)	—	—	2,15±0,15	—	—
(Iе)	—	—	6,5±0,7	—	—
(Iж)	—	—	—	(8,4±0,7) · 10 <sup>4</sup>	—
Этилбутират	8,7±0,3	9,1±0,4	—	—	—

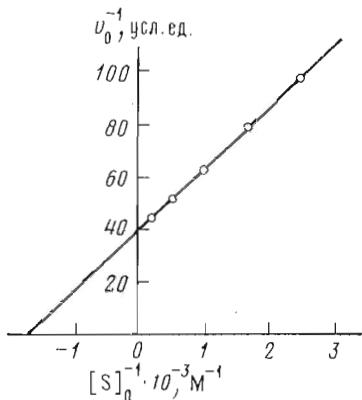


Рис. 1

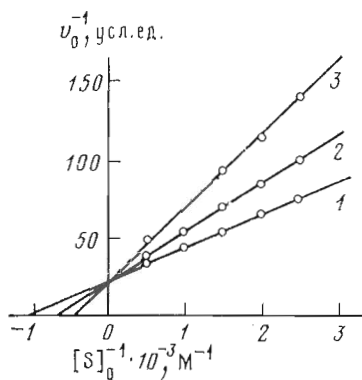


Рис. 2

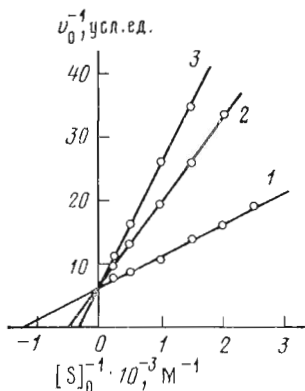


Рис. 3

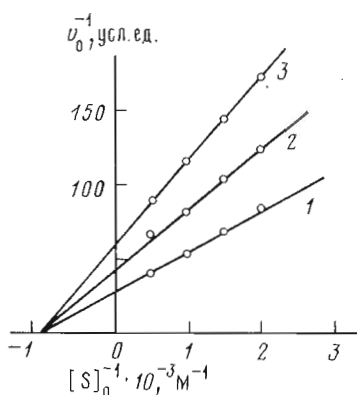


Рис. 4

Рис. 1. Гидролиз соединения (Ia) под действием карбоксилэстеразы из печени крысы

Рис. 2. Гидролиз этилбутирата, катализируемый карбоксилэстеразой, в присутствии соединения (Ia) в концентрации 0,2 (1), 0,4 (2) и 1,0 мМ (3)

Рис. 3. Гидролиз этилбутирата, катализируемый карбоксилэстеразой, в присутствии соединения (Ib) в концентрации 0,2 (1), 0,25 (2) и 0,5 мМ (3)

Рис. 4. Гидролиз этилбутирата, катализируемый карбоксилэстеразой, в присутствии кислоты (Ic) в концентрации 0 (1), 0,1 (2) и 0,2 мМ (3)

который создает стерические препятствия ферментативному гидролизу, в результате чего соединение (Ib) оказывается устойчивым к действию карбоксилэстеразы. Подобный эффект наблюдался при химотрипсинном гидролизе эфиров N-ациламино кислот [5, 6], когда валиновые производные имели аномально низкие константы ферментативного гидролиза.

Метаболиты детоксикации дитиофосфатов (Ia) и (Ib) — кислоты (Iд) и (Ie) — обратимо ингибируют карбоксилэстеразный гидролиз этилбутирата. Как видно из рис. 4, они являются некооперативными ингибиторами фермента.

Полученные данные согласуются с результатами биологических испытаний и изучения метаболизма соединений (Ia) и (Ib) *in vivo* [2, 4]. Так, производное  $\beta$ -аланина (Ia) хорошо гидролизует карбоксилэстеразой печени крысы и, следовательно, способно к быстрой детоксикации. Это соединение в 8 раз менее токсично, чем его P=O-аналог (Iв) ( $LD_{50}$  2000 и 250 мг/кг соответственно [2]). Производное валина (Iб) устойчиво к действию карбоксилэстеразы и является ее обратимым ингибитором. Соответствующий монотиофосфат (Iг) не гидролизует карбоксилэстеразой и необратимо ингибирует ее. Результатом этого и является,

## Ингибирование карбоксилэстеразы из печени крысы энантиомерами соединений (Iб) и (Iг)

Соединение	$K_i \cdot 10^4$ , М	$k_{II} \cdot 10^{-4}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>	Соединение	$K_i \cdot 10^4$ , М	$k_{II} \cdot 10^{-4}$ , л·моль <sup>-1</sup> ·мин <sup>-1</sup>
<i>R, S</i> -(Iб)	1,6±0,08	—	<i>R, S</i> -(Iг)	—	2,6±0,2
<i>S</i> -(Iб)	0,79±0,08	—	<i>S</i> -(Iг)	—	2,1±0,15
<i>R</i> -(Iб)	2,8±0,3	—	<i>R</i> -(Iг)	—	4,1±0,2

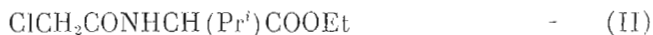
по-видимому, близкая токсичность этих P=S- и P=O-аналогов (LD<sub>50</sub> 90 и 75 мг/кг соответственно [2]), так как устойчивое к действию карбоксилэстеразы P=S-производное может достаточно быстро окисляться в организме оксидазами смешанной функции до P=O-аналога [7].

Действительно, при изучении метаболизма соединения (Iа) (белые крысы) во всех тканях было обнаружено большое количество продукта детоксикации — кислоты (Iд); активный метаболит (Iв) в мозгу отсутствовал. В случае производного валина (Iб) продуктов детоксикации в тканях было обнаружено значительно меньше, тогда как в мозгу накапливалось значительное количество активного метаболита (Iг) [2].

Поскольку производные валина (Iб) и (Iг) содержат в молекуле хиральный центр (атом углерода аминокислотного фрагмента) и представляют собой смеси *R*- и *S*-энантиомеров, следовало выяснить, как конфигурация хирального центра влияет на способность энантиомеров ингибировать карбоксилэстеразу из печени крыс. Как было показано ранее [8], этот фактор лишь в малой степени влияет на токсичность соединений (Iб) и (Iг) и активность (Iг) в отношении холинэстераз. При этом *R*-энантиомеры оказались несколько более активными, чем *S*-антиподы. Известно также, что карбоксилэстераза нервной ткани американского таракана (смесь изоферментных фракций) весьма мало стереоспецифична, однако некоторые из отдельных изоферментных фракций показывают выраженную стереоспецифичность [9].

Согласно табл. 2, и в случае карбоксилэстеразы печени крысы влияние конфигурации хирального центра выражено слабо, причем *R*-(Iг) вдвое более сильный необратимый ингибитор карбоксилэстеразы, чем *S*-(Iг). Однако при обратимом ингибировании карбоксилэстеразы энантиомерами (Iб) *S*-энантиомер оказался в 3,5 раза более активным, чем его антипод.

Можно предположить, что различия в стереоспецифичности карбоксилэстеразы при обратимом и необратимом ингибировании энантиомерами соединений (Iб) и (Iг) обусловлены изменением ориентации молекулы ингибитора при связывании в активном центре фермента. Для проверки этого предположения было изучено взаимодействие карбоксилэстеразы с модельными соединениями — энантиомерами этилового эфира *N*-хлорацетилвалина (II):



Было показано, что эти соединения гидролизуются карбоксилэстеразой в 20–30 раз медленнее, чем этилбутират, и являются ее обратимыми конкурентными ингибиторами. *S*-(II) ингибирует фермент в 2 раза сильнее, чем *R*-изомер и рацемат ( $K_i$  соответственно 0,14±0,015; 0,25±0,02 и 0,22±0,02 мМ). Следовательно, *S*-стереоспецифичность карбоксилэстеразы при обратимом ингибировании ее энантиомерами дитиофосфата (Iб) обусловлена преимущественным связыванием вблизи гидроксильной группы серина карбалкоксильной группировки ингибитора.

Таким образом, полученные данные позволяют уточнить схему метаболизма соединений типа (I) в организме млекопитающих и подтверждают гипотезу о влиянии стерических факторов на формирование токсичности исследованных соединений.

## Экспериментальная часть

Этилбутират марки ч. очищали перегонкой: т. кип. 119,5–120° С. Соединения (Ia), (Iв), рацемические соединения (Iб), (Iг) и их R- и S-энантиомеры были получены по методу [1, 8]. Метаболиты детоксикации (Iд) – (Iж) получены как описано в работах [1, 10]. Энантиомерные этиловые эфиры N-хлорацетилвалина (II) синтезированы по методу [11].

Источником карбоксилэстеразы служила печень белых крыс. Частично очищенный фермент получали по методу [12]. Для кинетических измерений использовали фракцию 40–70% насыщения сульфатом аммония, обессоленную на сефадексе G-25. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13]. Исходные растворы субстратов и ингибиторов готовили в абсолютном этаноле. Активность карбоксилэстеразы определяли при 25° С и рН 7,8 по начальным скоростям гидролиза этилбутирата, которые измеряли потенциометрическим методом в режиме рН-стата на автотитраторе Radiometer RTS-822 (Дания). Карбоксилэстеразный гидролиз соединений (Ia) – (Iг) изучали аналогичным образом. Реакционная смесь объемом 10 мл содержала 0,5–2 мл раствора фермента, 0,01–0,5 мл раствора субстрата, 1 мл 1 М КСl, 1 мл фосфатного буфера  $1/75$  М. Концентрация этилового спирта во всех опытах составляла 5% (объемных).

Бимолекулярные константы скорости взаимодействия карбоксилэстеразы с ингибиторами ( $k_{11}$ ) определяли по методу [14] в условиях  $[I]_0 \gg [E]_0$ , контролируя остаточную активность фермента после инкубации с ингибитором. Тип обратимого ингибирования и величины констант ингибирования ( $K_i$ ) определяли методом Лайнвивера – Берка.

Кинетические параметры гидролиза субстратов, константы ингибирования и среднеквадратичные отклонения рассчитывали методом линейной регрессии на калькуляторе НР-67.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мاستрюкова Т. А., Шипов А. Э., Горбенко Э. Б., Шабанова М. П., Савченко К. Н., Каган Ю. С., Кабачник М. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1968, № 9, с. 2042–2050.
2. Каган Ю. С., Ершова Е. А., Клисенко М. А., Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Жданова Г. В., Бресткин А. П., Брик П. Л., Мандельштам Ю. Е., Кабачник М. И. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1982, № 2, с. 242–247.
3. Neumann E. In: Enzymatic basis of detoxication / Ed. Jakoby W. B. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 2, p. 291–323.
4. Мастрюкова Т. А., Кабачник М. И. Ж. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1978, т. 23, № 2, с. 160–169.
5. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klesov A. A. FEBS Lett., 1971, v. 15, № 2, p. 121–124.
6. Dorovska V. N., Varfolomeev S. D., Kazanskaya N. F., Klesov A. A., Martinek K. FEBS Lett., 1972, v. 23, № 1, p. 122–124.
7. Дотерман У. Бюл. Всес. о-ва здравоохран., 1972, т. 44, № 1–3, с. 135–151.
8. Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Вайсберг М. С., Бресткин А. П., Брик П. Л., Мандельштам Ю. Е., Федин А. Н., Каган Ю. С., Ершова Е. А., Савченко К. Н., Кабачник М. И. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1034–1039.
9. Сундуков О. В., Головкина Л. С., Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Кабачник М. И. Прикл. биохим. и микробиол., 1981, т. 17, № 6, с. 927–933.
10. Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Жданова Г. В., Каган Ю. С., Ершова Е. А., Кабачник М. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1980, № 3, с. 703–704.
11. Fischer E., Otto E. Ber., 1903, B. 36, № 2, S. 2106–2116.
12. Arndt R., Krisch K. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1972, B. 353, S. 589–598.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
14. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965, с. 115.

Поступила в редакцию  
25.1.1983

INTERACTION OF SOME PHOSPHORODITHIOATES AND -MONOTHIOATES  
CONTAINING AMINO ACIDS FRAGMENTS WITH RAT LIVER  
CARBOXYLESTERASE

MAKHAYEVA G. F., VESELOVA V. L., MASTRYUKOVA T. A.,  
SHIPOV A. E., ZHDANOVA G. V., KABACHNIK M. I.

*Institute of Physiologically Active Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Chernogolovka; A. N. Nesmeyanov Institute of Organo  
Element Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The interaction of insecto-acaricides of the general formula  $(EtO)_2P(S)SCH_2CONH \cdot (CH_2)_nCH(R^1)COOR^2$  and their activation metabolites (P=O analog) and detoxication products ( $R^2=H$ ) with rat liver carboxylesterase was studied. The  $\beta$ -alanine derivative ( $n=1$ ,  $R^1=H$ ,  $R^2=Et$ ) was rapidly hydrolyzed by carboxylesterase. The valine derivative ( $n=0$ ,  $R^1=H$ ,  $R^2=Et$ ) was hydrolytically stable, due to steric hindrances imposed by the isopropyl group, and proved to be a reversible competitive inhibitor of carboxylesterase. The corresponding monothiophosphates were not hydrolyzed by carboxylesterase, but inhibited it irreversibly. It was found that monothiophosphate derivatives of *R*- and *S*-valine irreversibly inhibit carboxylesterase, *R*-enantiomer being somewhat more active than *S*-antipode. On the other hand, under the conditions of reversible inhibition by the corresponding dithiophosphates, *S*-enantiomer was more active. Using model compounds, (*R*)- and (*S*)-*N*-chloroacetyl valine ethyl esters, it was shown that both on irreversible and reversible inhibition the differences in stereospecificity can be attributed to changes in the inhibitor orientation in the enzyme active site.