



УДК 577.452.341'1.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТИЛСУЛЬФОМЕТИЛАТОВ, О-*n*-АЛКИЛ-S-(β-ЭТИЛМЕРКАПТОЭТИЛ)МЕТИЛТИОФОСФОНАТОВ, С РАЗЛИЧНЫМИ ХОЛИНЭСТЕРАЗАМИ

Григорьева Г. М., Копычева Н. В.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград*

Абдувахобов А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент

Антихолинэстеразное действие серии фосфорорганических ингибиторов, $(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5\text{-O}_4\text{SCH}_3$, с различной длиной О-*n*-алкильного радикала R исследовалось в отношении ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7), пропионилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) и двух бутирилхолинэстераз (КФ 3.1.1.8), типичной и нетипичной. Оценивалась роль гидрофобности при сорбции ингибиторов в активном центре ферментов. Константа скорости второго порядка (K_{11}) для взаимодействия ингибиторов с холинэстеразами при увеличении длины R возрастает до определенного предела, а затем снижается. Для разных холинэстераз наблюдается характеристическая зависимость k_{11} от длины R, что указывает на различие в протяженности и топографии гидрофобных участков в районе эстеразного центра исследованных ферментов.

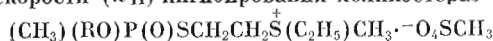
Антихолинэстеразное действие фосфорорганических ингибиторов зависит не только от их фосфорилирующей способности, связанной с электрофильностью атома фосфора, но и от эффективности их сорбции в активном центре холинэстераз. Наибольшая эффективность сорбции свойственна так называемым бифункциональным ингибиторам, имеющим в β-положении от атома фосфора положительный заряженный атом азота или серы, который осуществляет ион-ионное взаимодействие с анионным центром фермента, облегчающее фосфорилирование гидроксильной группы остатка серина в эстеразном центре [1]. Введение гидрофобных радикалов в молекулу фосфорорганического ингибитора также увеличивает в определенных пределах эффективность антихолинэстеразного действия, поскольку холинэстеразы имеют вблизи анионного и эстеразного центра гидрофобные участки, которые способствуют сорбции молекул ингибиторов и субстратов за счет гидрофобных взаимодействий [2, 3].

В настоящей работе исследовалась роль гидрофобности при действии на различные холинэстеразы ряда метилсульфометилатов, О-*n*-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов, следующего строения:



где $\text{R}=\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, а *n* — число углеродных атомов углеводородной цепи (изменяется от 1 до 8). С увеличением *n* возрастает гидрофобность *n*-алкильного радикала R, что делает ингибиторы этого ряда удобными инструментами для оценки гидрофобных взаимодействий и протяженности гидрофобных участков в районе эстеразного центра холинэстераз. Нами исследовалась ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7), пропионилхолинэстераза (КФ 3.1.1.8) и две бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8), типичная и нетипичная [4, 5]. Весьма вероятно, что именно гидрофобные участки эстеразного центра обуславливают различия в субстратной специфичности у разных холинэстераз, поскольку только гидрофобность ацильного остатка определяет эффективность нековалентного связывания его в активном центре фермента.

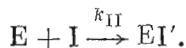
Константы скорости (k_{II}) ингибирования холинэстераз соединениями



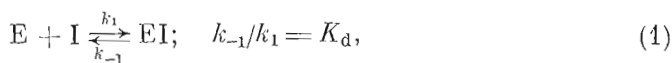
Соединение	R	$k_{II} \cdot 10^7, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$			
		Ацетилхолинэстераза — 2 мМ ацетилхолин	Пропионилхолинэстераза — 2 мМ пропионилхолин	Бутирилхолинэстераза нетипичная — 2 мМ бутирилхолин	Бутирилхолинэстераза типичная — 20 мМ бутирилхолин
(I) CH_3		4,7±0,1	0,58±0,04	0,44±0,02	0,117±0,002
(II) C_2H_5		14,6±0,1	3,85±0,15	7,35±0,95	0,700±0,006
(III) $n-C_3H_7$		19,5±0,5	25,9±0,5	9,9±1,0	—
(IV) $n-C_4H_9$		31,0±0,3	54,5±1,5	13,8±0,8	4,45±0,30
(V) $n-C_5H_{11}$		22,7±0,2	96,3±2,4	4,9±0,2	3,37±0,24
(VI) $n-C_6H_{13}$		7,5±0,5	72,2±3,6	15,7±0,2	34,0±4,5
(VII) $n-C_7H_{15}$		3,20±0,13	28,9±0,5	11,3±0,1	13,2±0,7
(VIII) $n-C_8H_{17}$		2,24±0,04	—	6,0±0,5	10±2

Величины константы скорости второго порядка (k_{II}) для необратимого ингибирования холинэстераз соединениями исследуемого ряда представлены в таблице.

Согласно формальной схеме образования фосфорилированного фермента (EI'), при взаимодействии фосфорорганического ингибитора (I) с холинэстеразой (E) величина k_{II} является кинетической константой:



Вместе с тем в соответствии с устоявшимися представлениями [6–8] этот процесс включает в себя образование промежуточного нековалентного комплекса (EI), аналогичного комплексу Михаэлиса при взаимодействии с субстратом, и протекает в две стадии:



Первая стадия характеризуется константой K_d диссоциации комплекса EI, вторая — константой скорости фосфорилирования k_2 . Экспериментально получаемая k_{II} определяется отношением k_2/K_d . Установлено, что величина k_2 мала и практически не меняется в гомологичных рядах фосфорорганических ингибиторов, подобных исследуемому ряду, и роль K_d в оценке антихолинэстеразного действия через k_{II} является определяющей [9–12]. В связи с этим величина k_{II} может быть использована для характеристики сродства фосфорорганических ингибиторов к активному центру холинэстераз и для оценки особенностей структуры активного центра по результатам ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами различного строения. Можно с уверенностью полагать, что это справедливо не только для бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади, эритроцитарной ацетилхолинэстеразы быка и пропионилхолинэстеразы мозга, для которых величины k_2 были определены, но и для других холинэстераз, включая все исследованные в настоящей работе ферменты. Кроме того, для использованных фосфорорганических соединений установлено, что электрофильность атома фосфора, оцениваемая константами скорости щелочного гидролиза, практически одинакова у всех членов ряда, а следовательно, одинакова и их фосфорилирующая способность [13]. Это также дает основание рассматривать все изменения k_{II} как результат влияния структуры фосфорорганических ингибиторов на первую стадию взаимодействия их с активным центром, на стадию сорбции.

Из данных таблицы следует, что все соединения с углеводородным радикалом R нормального строения от CH_3 до C_8H_{17} являются сильными ингибиторами исследованных холинэстераз. Величина k_{II} минимальна для соединения (I) и возрастает с увеличением длины R. Несомненно, что первым этапом взаимодействия молекул фосфорорганических ингибиторов

с холинэстеразами является ионное взаимодействие сульфониевой группировки низкомолекулярных лигандов с анионными центрами ферментов, обеспечивающее правильную ориентацию молекул ингибиторов на поверхности активных центров. Вместе с тем сорбция углеводородного радикала ингибитора может происходить только на соответствующем гидрофобном участке фермента, на который его выталкивает гидрофильная среда, вода. Усиление антихолинэстеразного действия ингибиторов с увеличением числа углеродных атомов в радикале R происходит в связи с улучшением сорбции молекул ингибиторов за счет гидрофобного взаимодействия его углеводородного остатка с гидрофобным участком эстеразного центра фермента. Это стабилизирует промежуточный нековалентный комплекс фермента с ингибитором.

Протяженность углеводородного радикала ингибитора, при которой наблюдается максимальное значение k_{II} , различна для разных холинэстераз. Ацетилхолинэстераза имеет максимальное значение k_{II} для соединения (IV) с бутильным радикалом. Максимум антихолинэстеразного действия этого соединения был найден ранее для ацетилхолинэстеразы из другого источника (фермент из бычьих эритроцитов) [13]. По-видимому, типичные ацетилхолинэстеразы из разных источников имеют одинаковое гидрофобное окружение эстеразного центра. Пропионилхолинэстераза имеет максимальное значение k_{II} для соединения (V) с пентильным радикалом, а бутирилхолинэстераза, типичная и нетипичная, — для соединения (VI) с гексильным радикалом.

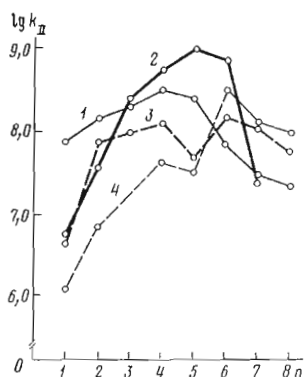
С увеличением длины, а вместе с тем и гидрофобности углеводородного радикала R антихолинэстеразное действие фосфорорганических соединений возрастает в наибольшей степени для типичной бутирилхолинэстеразы. Максимальная величина k_{II} (при $n=6$) для типичной бутирилхолинэстеразы почти в 300 раз выше по сравнению со значением k_{II} для соединения (I), тогда как для нетипичной бутирилхолинэстеразы она лишь в 36 раз выше. Для пропионилхолинэстеразы k_{II} для соединения (V) примерно в 170 раз выше, чем для соединения (I), и значительно превышает максимальные значения k_{II} для всех остальных исследованных ферментов. В связи с этим соединение (V) может рассматриваться как специфический ингибитор пропионилхолинэстеразы. Наименьший рост k_{II} с увеличением числа углеродных атомов углеводородной цепи ингибиторов всего лишь в 7 раз наблюдается для ацетилхолинэстеразы. По-видимому, здесь решающее значение имеет ионное взаимодействие сульфониевой группы молекулы ингибитора с анионным центром фермента. Это обуславливает наибольшее значение k_{II} для соединения (I) в случае ацетилхолинэстеразы по сравнению с величинами для других холинэстераз.

Зависимость величины k_{II} от числа углеродных атомов n R-радикала ингибиторов различна для разных холинэстераз (рисунок). Для ацетилхолинэстеразы и пропионилхолинэстеразы величина k_{II} возрастает с увеличением n до определенного предела, а затем снижается. Для бутирилхолинэстеразы, типичной и нетипичной, имеет место более сложная зависимость, сходная у двух исследованных ферментов.

Зависимость величины k_{II} от числа атомов углерода в углеводородной цепи ингибиторов позволяет определить протяженность гидрофобного участка, на котором происходит сорбция углеводородного радикала ингибитора в районе эстеразного центра холинэстеразы, а также его топографию. Согласно зависимости $\lg k_{II} - n$, гидрофобный участок ацетилхолинэстеразы соответствует бутильному, пропионилхолинэстеразы — пентильному, а бутирилхолинэстеразы — гексильному радикалу. Следовательно, протяженность гидрофобного участка в эстеразном центре холинэстераз увеличивается в том же порядке, в каком возрастает длина ацильной части наиболее быстро гидролизуемого субстрата — ацетилхолина — пропионилхолина — бутирилхолина под действием ацетилхолинэстеразы, пропионилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы соответственно.

Непрерывный рост k_{II} по мере роста числа атомов углерода в R-радикале ингибиторов вплоть до максимального значения при $n=4$ для ацетилхолинэстеразы и $n=5$ для пропионилхолинэстеразы свидетельствует о не-

Зависимость антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов *O*-*n*-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов от *n*, числа углеродных атомов *O*-*n*-алкильного радикала, для ацетилхолинэстеразы (1), пропионилхолинэстеразы (2), нетипичной (3) и типичной (4) бутирилхолинэстераз



прерывности гидрофобного участка в эстеразном центре этих ферментов. Для бутирилхолинэстераз имеет место излом зависимости $\lg k_{II}$ от n при $n=5$, указывающий на уменьшение гидрофобности фермента в этом участке эстеразного центра. Эта зона низкой гидрофобности делит гидрофобный участок на две области разной протяженности. О наличии двух гидрофобных областей в каталитическом центре типичной бутирилхолинэстеразы предполагали ранее на основе аналогичной зависимости антихолинэстеразного действия фосфорорганических ингибиторов от длины алкильных радикалов различного строения [2, 3], зависимости кинетических параметров от длины алкильных радикалов реагентов при исследовании гидролиза некативных субстратов [14] и обратимого ингибирования бутирилхолинэстеразы алкилборными кислотами [15]. Гидрофобные участки нетипичной бутирилхолинэстеразы ранее не исследовались. Сходство протяженности и топографии гидрофобного участка в эстеразном центре нетипичной и типичной бутирилхолинэстеразы представляет интерес в связи с тем, что эти два фермента гидролизуют бутирилхолин с наибольшей скоростью по сравнению с другими субстратами; в остальном между бутирилхолинэстеразами имеются существенные различия в субстратной специфичности [5, 6]. Обладая способностью катализировать гидролиз ацетил-β-метилхолина с относительно высокой скоростью, нетипичная бутирилхолинэстераза имеет сходство с ацетилхолинэстеразой и проявляет важнейшую особенность последней — торможение каталитической активности избытком всех гидролизуемых субстратов.

Из зависимости $\lg k_{II}-n$ следует, что две гидрофобные области в эстеразном центре бутирилхолинэстераз различны по своей протяженности. Первая, ближайшая к реактивной гидроксильной группе остатка серина и более протяженная область соответствует бутильному радикалу и вносит примерно одинаковый вклад в усиление антихолинэстеразного действия ингибиторов с ростом их гидрофобности у обоих ферментов: величина k_{II} в ряду соединений (I) — (IV) возрастает в 38 и 31 раз для типичной и нетипичной бутирилхолинэстеразы соответственно. Вторая, меньшая по протяженности область вносит значительно больший вклад в усиление антихолинэстеразной активности ингибиторов у типичной бутирилхолинэстеразы, чем у нетипичной: величина k_{II} для соединения (VI) выше, чем k_{II} для соединения (IV) в 7,7 раза у первой и лишь в 1,2 раза — у второй. Таким образом, несмотря на одинаковую протяженность и сходство топографии гидрофобных участков в районе эстеразного центра у двух бутирилхолинэстераз, реальный вклад гидрофобных областей, составляющих эти участки, в усиление антихолинэстеразного действия ингибиторов различен: у нетипичной бутирилхолинэстеразы основной вклад вносит первая гидрофобная область, тогда как у типичной бутирилхолинэстеразы вклад обеих гидрофобных областей значителен. Учитывая это, а также одинаковую протяженность первой гидрофобной области нетипичной бутирилхолинэстеразы и гидрофобного участка ацетилхолинэстеразы, можно полагать, что структура этих участков эстеразного центра определяет сходство в субстратной специфичности нетипичной бутирилхолинэстеразы и ацетил-

холинэстеразы и их отличие от типичной бутирилхолинэстеразы. Значительно более низкая способность к гидрофобному взаимодействию второй гидрофобной области нетипичной бутирилхолинэстеразы позволяет объяснить еще одно отличие этого фермента от типичного: он не катализирует гидролиз избирательного субстрата типичной бутирилхолинэстеразы — бензоилхолина, имеющего в ацильной части остаток бензойной кислоты, обладающий высокой гидрофобностью [5, 16].

Таким образом, исследование антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов *O*-*n*-алкил-S-(β -этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов позволило установить различную роль гидрофобности ингибиторов при их взаимодействии с разными холинэстеразами, а также оценить протяженность и топографию гидрофобных участков эстеразного центра четырех холинэстераз.

Обнаружен параллелизм между протяженностью гидрофобного участка эстеразного центра ацетилхолинэстеразы, пропионилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы и длиной ацильной части субстратов, наиболее быстро гидролизующихся под действием этих ферментов.

На основе полученных данных и сравнения их с ранее известными фактами можно заключить, что холинэстеразы из разных источников, гидролизующие с наибольшей скоростью один и тот же субстрат (ацетил- или бутирилхолин) имеют одинаковую протяженность и топографию гидрофобного участка в эстеразном центре.

Для бутирилхолинэстераз, типичной и нетипичной, имеющих различия в субстратной специфичности, установлено различие в гидрофобности участков эстеразного центра.

Экспериментальная часть

В работе использовалась ацетилхолинэстераза электрического органа ската *Torpedo marmorata*. Скаты отлавливались у Адриатического побережья Югославии. Электрические органы были привезены в сосудах Дьюара в состоянии глубокого охлаждения и хранились на протяжении исследования при температуре -10°C . Источником фермента были гомогенаты электрического органа, содержащие 0,5 мг ткани в 1 мл и обладавшие активностью 3 мкмоль/мин на 1 мг влажного веса (рН 7,5; $2 \cdot 10^{-4}$ М фосфатный буфер, 0,002 М ацетилхолинйодид).

Источником типичной бутирилхолинэстеразы был препарат из сыворотки крови лошади производства Пермского НИИ вакцины и сывороток с удельной активностью 8,6 Е/мг (0,02 М бутирилхолинйодид).

Нетипичная бутирилхолинэстераза была получена из нервной ткани (зрительные ганглии) головоногого моллюска кальмара *Todarodes sagittatus* путем экстракции раствором 0,4 М КВг гомогенатов после замораживания — оттаивания их. Использовался супернатант, полученный после ультрацентрифугирования гомогенатов при 100 000 *g* в течение 1 ч. Он имел активность 2—3 мкмоль/мин на 1 мг белка (0,002 М бутирилхолинйодид).

Пропионилхолинэстераза была получена из нервной ткани (околопочечные ганглии) брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* путем экстракции раствором 0,4 М КВг по способу, описанному ранее [17], и имела удельную активность 8—20 мкмоль/мин на 1 мг белка (0,002 М пропионилхолинйодид).

После диск-электрофореза экстрактов ферментов в полиакриламидном геле было установлено, что использованные источники нетипичной бутирилхолинэстеразы и пропионилхолинэстеразы не содержат примесей других холинэстераз. Диск-электрофорез проводили по методу Дэвиса [18]. Активность ферментов после электрофореза оценивали по методу Карновского и Руте [19] с бутирилтиохолинйодидом и пропионилтиохолинйодидом в качестве субстратов. Содержание белка в растворах ферментов определяли по методу Лоури и др. [20].

Синтез и свойства фосфорорганических ингибиторов $(\text{CH}_3)(\text{RO})\text{P}(\text{O})\cdot\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{O}_4\text{SCH}_3$ описаны ранее [21].

Кинетика ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами исследовалась при 25°C в термостатируемой кювете при pH 7,5. Реакционная смесь имела объем 9 мл и включала фермент, раствор ингибитора определенной концентрации и фосфатный буфер (KH_2PO_4 — Na_2HPO_4) в конечной концентрации $4\cdot 10^{-4}$ М. Через определенное время (1—5 мин) в реакционную смесь добавляли 1 мл раствора соответствующего субстрата и тем самым останавливали реакцию ингибирования фермента. Остаточную активность фермента определяли по начальной скорости гидролиза субстрата методом потенциометрического титрования на pH-метре (модель pH-340). Выделяющуюся при гидролизе субстрата кислоту титровали раствором 0,02 М NaOH (титр устанавливали по стандартному фиксапалу HCl). Водные растворы ингибиторов готовили перед началом опыта из основных спиртовых растворов, которые использовались в течение исследования и возобновлялись по мере расходования.

Величины константы скорости второго порядка k_{11} для ингибирования холинэстераз фосфорорганическими ингибиторами определяли по наклону графиков в координатах $\lg v_0/v_t - t$, где v_0 — начальная скорость ферментативного гидролиза субстрата перед добавлением ингибитора, v_t — скорость гидролиза после контакта фермента с ингибитором в течение t мин. Эта зависимость получена из уравнения для константы скорости бимолекулярной реакции, определяемой при некотором избытке ингибитора (I), когда соблюдаются условия псевдомономолекулярной реакции [22]:

$$k_{11} = (1/t[I]) \cdot 2,3 \lg v_0/v_t,$$

откуда $\lg v_0/v_t = k_{11}[I]t/2,3$, а наклон графика $\text{tg} \alpha$ равен $k_{11}/2,3$. Графики строили по 4—5 значениям v_0/v_t , определенным в интервале 1—5 мин. Для всех ингибиторов исследуемого ряда зависимость $\lg v_0/v_t$ от t прямолинейна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965, с. 138—246.
2. Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Агабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. П., Годовиков Н. П., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В. Успехи химии, 1970, т. 39, вып. 6, с. 1050—1072.
3. Kabachnik M. I., Brestkin A. P., Godovikov N. N., Michelson M. J., Rozengart E. V., Rozengart V. I. Pharmacol. Rev., 1970, v. 22, p. 355—388.
4. Григорьева Г. М. Тез. докл. VI конф. биохимиков прибалтийских республик, Белорусской ССР и Ленинграда, Юрмала, 12—15 октября 1981. Рига: Зинатне, 1981, с. 220—222.
5. Григорьева Г. М. Ж. эвол. биохим. и физиол., 1982, т. 18, № 2, с. 205—206.
6. Main A. R. Science, 1964, v. 144, № 3621, p. 992—993.
7. Rosenberry T. L. Croat. Chem. Acta, 1975, v. 47, № 3, p. 235—250.
8. Бресткин А. П., Годовиков Н. И. Успехи химии, 1978, т. 47, № 9, с. 1609—1626.
9. Hart G. J., O'Brien R. D. Biochemistry, 1973, v. 12, № 15, p. 2940—2945.
10. Chan L. M., Himel C. M., Main A. R. Biochemistry, 1974, v. 13, № 1, p. 86—90.
11. Евреинов В. И., Семенов В. Н., Годовиков Н. П., Кабачник М. И. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1233—1242.
12. Понов С. П., Годовиков Н. И., Любимов В. С., Кабачник М. И. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 289—294.
13. Абдувахабов А. А., Годовиков Н. И., Кабачник М. И., Криворогова Л. С., Михайлов С. С., Розенгарт В. И. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1972, № 5, с. 1169—1172.
14. Яре Я. Л., Лангель Ю. Л. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 217—227.
15. Яре Я. Л., Спээк М. А., Лангель Ю. Л., Ротанова Т. В. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364—1371.
16. Григорьева Г. М., Коньчева Н. В. В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных. Л.: Наука, 1979, с. 194—204.
17. Григорьева Г. М. Биохимия, 1980, т. 45, вып. 12, с. 2176—2187.
18. Davies B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, № 2, p. 404—442.
19. Karnovsky M. J., Roots L. J. Histochem. Cytochem., 1964, v. 12, № 2, p. 219—221.
20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265—275.

21. Абдувахабов А. А., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Михайлов С. С., Розенгарт В. И., Ситкевич Р. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1968, № 4, с. 744-750.
22. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалиев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. Докл. АН СССР, 1971, т. 200, № 1, с. 103-106.

Поступила в редакцию

17.XII.1982

После доработки

28.I.1983

INTERACTION OF METHYLSULFOMETHYLATES OF O-n-ALKYL-S-(β -ETHYL-MERCAPTOETHYL)METHYLTHIOPHOSPHONATES WITH DIFFERENT CHOLINESTERASES

GRIGORJEVA G. M., KONYTCHEVA N. V., ABDUVAKHABOV A. A.

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad; Institute of Bioorganic
Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent*

The action of the organophosphorous inhibitors $(\text{CH}_3)(\text{RO})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{S}}(\text{CH}_3)\cdot\text{C}_2\text{H}_5\cdot\text{O}_2\text{SCH}_3$, where R ranged from CH_3 to C_8H_{17} , was investigated using acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), propionylcholinesterase (EC 3.1.1.8) and two different (so-called typical and non-typical) butyrylcholinesterases (EC 3.1.1.8). Anticholinesterase action of the inhibitors increases with the lengthening of the R chain until some limit and then decreases. The radical length, at which the maximal action is achieved, varies for different enzymes. The data are indicative of the differences in the length and topography of the hydrophobic sites in the esteratic centers of the investigated enzymes.