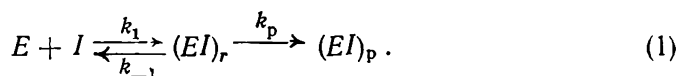


## СТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ИНГИБИРОВАНИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗОСИСТОКСОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

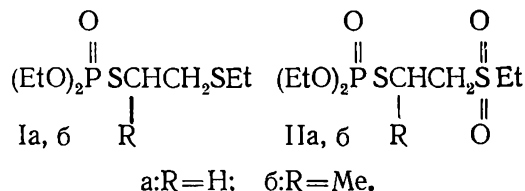
М. П. Пономарчук, Л. Ф. Касухин, Г. В. Песоцкая, Ю. Г. Гололобов

Введение экранирующих алкильных группировок в физиологически активные фосфаты существенно ослабляет их антихолинэстеразное действие и снижает токсичность при сохранении высокой инсектицидности соединений [1—3]. Тормозящий эффект алкильных заместителей при инактивации эстеразы *E in vitro* интерпретирован как проявление стерического блокирования фосфора в ключевой стадии равновесной ассоциации с ингибитором *I*.



Причины повышения избирательности токсичного действия экранированных фосфатов неясны, но сам факт появления такой избирательности при сравнительно простом структурном модифицировании молекул может иметь практическое значение как эмпирический метод целенаправленного изменения токсикологических характеристик фосфорных пестицидов.

В работах [1—3] был изучен эффект алкильных заместителей в отщепляющихся при фосфорилировании эстеразного центра винилокислых и арокислых радикалах фосфатов. В данном сообщении представлены результаты исследований тиолфосфатов — изосистокса (Ia), его метаболита сульфона (IIa) и их  $\alpha$ -метилзамещенных производных (Iб) и (IIб):



Эффективность инактивации ацетилхолинэстеразы оценивали в терминах констант диссоциации фермент-ингибиторного комплекса  $(EI)_r$ ,  $K_a = k_{-1}/k_1$ , констант скорости фосфорилирования эстеразного центра  $k_p$  и суммарного параметра  $k_i = k_p/K_a$ , эквивалентного константе скорости второго порядка  $k_2$  в упрощенной одностадийной схеме ингибирования:



Сопоставление изосистокса Ia и его  $\alpha$ -метилзамещенного аналога Ib (таблица) показывает, что экранирование фосфора  $\alpha$ -метильной группой проявляется в 17-кратном ослаблении прочности комплекса  $(EI)_r$  (увеличение  $K_a$ ) и в таком же снижении величины  $k_i$  ( $k_2$ ). Скорость фосфорилирования фермента  $k_p$  остается при этом неизменной, то есть завершающая стадия ингибирования не вносит заметного вклада в наблюдаемую дезактивацию изосистокса. Пространственные эффекты при щелочном гидролизе тиолфосфатов Ia и Ib, судя по величине константы скорости  $k_{OH}$ , значительно слабее, чем в реакции с ферментом, вероятно, из-за большей доступности фосфора для небольшого нуклеофила  $\text{HO}^-$ .

Эти кинетические данные, а также повышение избирательности токсичного действия метилированного аналога изосистокса Ib (см. таблицу) согласуются с результатами исследования других фосфорных систем, содержащих экранирующие алкильные заместители [1—3]. В

Кинетические характеристики реакций изосистокса и его производных с ацетилхолинэстеразой и гидроксидом натрия

Соединение	Фосфорный реагент	Ингибирование ацетилхолинэстеразы (рН 7,8; t=25°)				Щелочной гидролиз <sup>б</sup> k <sub>OH</sub> ·10 <sup>3</sup> , л/моль·с
		K <sub>a</sub> ·10 <sup>3</sup> , моль/л	k <sub>p</sub> , мин <sup>-1</sup>	k <sub>i</sub> ·10 <sup>-4</sup> л/моль·мин	k <sub>2</sub> ·10 <sup>-4</sup>	
Ia	<chem>(EtO)2P(=O)SCH2CH2SEt</chem>	2,11±0,42	1,64±0,31	7,76±2,13	6,10±0,2	8,96±0,52 <sup>в</sup>
Iб	<chem>(EtO)2P(=O)SCH(Me)CH2SEt</chem>	35,2±4,1	1,59±0,17	0,45±0,07	0,43±0,02	6,47±0,25 <sup>в</sup>
	Эффект α-метильного заместителя <sup>а</sup>	16,7	1,03	17,2	14,2	1,4
IIa	<chem>(EtO)2P(=O)SCH2CH2S(=O)(Et)Et</chem>	4,16±0,45	0,65±0,05	1,56±0,20	1,05±0,04	947,0±70,0 <sup>г</sup>
IIб	<chem>(EtO)2P(=O)SCH(Me)CH2S(=O)(Et)Et</chem>	5,58±0,42	0,68±0,03	1,22±0,1	0,83±0,01	99,0±13,0 <sup>г</sup>
	Эффект α-метильного заместителя <sup>а</sup>	1,3	0,96	1,3	1,3	9,6

Примечание. ЛД<sub>50</sub> соединений (Ia), (Iб), (IIa) и (IIб) равно 5,5; 39; 9 и 33 мг/кг для белых мышей; 20, 36, 28 и 62 мг/г для мучного хрущака; 3, 8, 8 и 9 мг/г для комнатной мухи соответственно. <sup>а</sup> Отношение констант скорости и равновесия; <sup>б</sup> в воде, содержащей 16 об. % диоксана; <sup>в</sup> при 25°; <sup>г</sup> при 10°.

таким сопоставлении антиэстеразные свойства сульфонов IIa и IIб оказались несколько неожиданными. Окисление сульфидной группировки в сульфоновую сопровождается увеличением электроноакцепторности тиольного радикала у фосфора. В результате скорость нуклеофильной атаки гидроксид-иона при щелочном гидролизе резко возрастает, но скорость взаимодействия с ферментом (и токсичность) по сравнению с неокисленными аналогами изменяется мало. Более того, α-эффект для пары IIa — IIб в реакции с эстеразой на порядки ниже, чем для изосистоксов Ia и Iб, и ниже, чем в щелочном гидролизе, однако качественно дезактивирующие тенденции в обеих тиолфосфатных системах однотипны.

Эти результаты указывают на сложность природы α-эффекта, который, очевидно, не сводится к простым стерическим взаимодействиям (хотя они играют важную роль) при образовании фермент-ингибиторного комплекса. Необходимо более детальное количественное исследование проявления гидрофобных и донорно-акцепторных свойств заместителей при фосфоре в этой стадии, определяющей эффективность ингибирования холинэстераз.

Кинетические параметры (K<sub>a</sub>, k<sub>p</sub>) инактивации ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) определяли методом потенциометрического титрования [3] (рН 7,8; t=25°) в присутствии избытка субстрата фенилацетата (2·10<sup>-3</sup> моль/л) и варьируемых количеств ингибитора Ia, Iб, IIa, IIб — (0,8—5,0)·10<sup>-5</sup>, (0,8—5,0)·10<sup>-4</sup>, (0,7—2,5)·10<sup>-4</sup> и (0,5—2,5)·10<sup>-4</sup> моль/л соответственно. Бимолекулярные константы k<sub>2</sub> определяли в этих же условиях по методу [4]. Исходные водные растворы сульфонов IIa и IIб готовили непосредственно перед измерениями, подкисляя до рН 5 и хранили при 0°. Контрольные измерения показали, что в ходе кинети-

ческих экспериментов по ингибированию эстеразы щелочной гидролиз сульфонов не превышал 1%. В опытах с ферментом и для определения токсичности использовали очищенные на силикагеле препараты, индивидуальность которых контролировали методом ТСХ. В качестве элюента для тиолфосфатов I применяли смесь ацетона и гексана (1:4), а для сульфонов II — смесь ацетона и CCl<sub>4</sub> (1:4). Константы щелочного гидролиза фосфатов I и II определяли потенциометрическим титрованием непрореагировавшей щелочи в отбираемых по ходу реакции пробах [3].

Спектры ПМР (CCl<sub>4</sub>) и ИК (тонкий слой) снимали на спектрометрах «Tesla BS-467» (60 МГц) и UR-20.

*О,О-Диэтил-S-(2-этилтиоэтил)тиофосфат (Ia)* получали термической изомеризацией [5] *О,О-диэтил-О-(2-этилтиоэтил)тиофосфата*, синтезированного по методу [6] из (2-гидроксиэтил)этилсульфида [7] и диэтилхлортиофосфата в щелочной среде. Выход 32%. Т. кип. 112—113°/0,05 мм,  $n_D^{20}$  1,4962. ПМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 1,27 т., 3H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O, 1,36 т., 6H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 2,55 к., 2H; SCH<sub>2</sub>, 2,77 м., 4H; CH<sub>2</sub>O, 4,07 дв. к., <sup>3</sup>J(HP) 9 Гц, 4H. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1020 (POC), 1260 (P=O).

*О,О-Диэтил-S-(2-этилсульфонилэтил)тиофосфат (IIa)* синтезировали окислением хроматографически очищенного тиолфосфата Ia KMnO<sub>4</sub> в уксусной кислоте по методу [8]. Выход 72%. Т. кип. 140—144°/0,06 мм,  $n_D^{24,5}$  1,4891. ПМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): CH<sub>3</sub>, 1,73 т., 9H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 3,37 к., 2H; SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 3,65 м., 4H; CH<sub>2</sub>O, 4,47 дв. к., <sup>3</sup>J(HP) 9 Гц, 4H. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1020 (POC), 1260 (P=O), 1120, 1140, 1320 (SO<sub>2</sub>).

*О,О-Диэтил-S-(1-метил-2-этилтиоэтил)тиофосфат (Iб)* получали по методу [9] конденсацией 2-хлорпропилэтилсульфида [10, 11] с аммониевой солью диэтилтиофосфорной кислоты. Выход 91%. Т. кип. 110°/0,05 мм,  $n_D^{26}$  1,4910. ПМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 1,62 т., 3H; CH<sub>3</sub>CH, 1,67 д., 3H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O, 1,72 т., 6H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 2,93 к., 2H; SCH<sub>2</sub>CH, 3,35 м., 3H; CH<sub>2</sub>O, 4,42 дв. к., <sup>3</sup>J(PH) 9 Гц, 4H. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1020 (POC), 1260 (P=O).

*О,О-Диэтил-S-(1-метил-2-этилсульфонилэтил)тиофосфат (IIб)* синтезировали аналогично сульфону IIa из хроматографически очищенного тиолфосфата Iб. Выход 61%. Т. кип. 145—147°/0,045 мм,  $n_D^{26}$  1,4885. ПМР-спектр ( $\delta$ , м. д.): CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, 1,73 т., 9H; CH<sub>3</sub>CH, 1,81 д., 3H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>S, 3,35 к., 2H; CH<sub>2</sub>CH, 3,70 м., 3H; CH<sub>2</sub>O, 4,47 дв. к., <sup>3</sup>J(PH) 9 Гц, 4H. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1020 (POC), 1260 (P=O), 1140, 1310 (SO<sub>2</sub>).

Найдено, P %: 9,98; S 21,10. C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>. Вычислено, %: P 10,18; S 21,07.

1. Виниловые эфиры кислот фосфора. XVII. Пространственные и электронные эффекты в ингибировании ацетилхолинэстеразы  $\beta$ -хлорвинилфосфатами / Ю. Г. Гололобов, Л. Ф. Касухин, Г. В. Песоцкая и др.—Журн. общ. химии, 1978, 48, № 9, с. 1974—1979.
2. Сравнительное исследование инактивации ацетилхолинэстеразы теплокровных и насекомых замещенными винилфосфатами / Г. В. Песоцкая, В. С. Петренко, Л. Ф. Касухин, Ю. Г. Гололобов.—Докл. АН УССР. Сер. Б, 1978, № 11, с. 1034—1037.
3. Стерический эффект в реакциях феноловых эфиров кислот фосфора / М. П. Пономарчук, Л. Ф. Касухин, И. Ю. Будилова, Ю. Г. Гололобов.—Журн. общ. химии, 1980, 50, № 9, с. 1937—1946.
4. Main A. R., Dauterman W. C. Determination of the bimolecular rate constants for the reaction between organophosphorus inhibitors and esterases in the presence of substrate.—Nature, 1963, 198, p. 551—553.
5. Hoffmann F. W., Moore T. R. Organic phosphorus compounds. II. Isomeric alkyl phosphoro- and phosphonothioates.—J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, N 5, p. 1150—1154.
6. А. с. 131156 (СССР). Способ получения сельскохозяйственных ядохимикатов / Н. Н. Мельников, Л. П. Кофман, С. Л. Варшавский и др.—РЖ Химия, 1961, 12 Л547.
7. Годовиков Н. Н., Карданов Н. А., Кабачник М. И. Синтез О-( $\beta$ -алкилмеркаптоэтил)-дифенилфосфинатов, S-( $\beta$ -алкилмеркаптоэтил)дифенилтиофосфинатов и их иодметилатов.—Журн. общ. химии, 1972, 42, № 2, с. 273—276.
8. Chemical behavior of systox isomers in biological systems / T. R. Fukuto, R. L. Metcalf, R. B. March, M. G. Maxon—J. Econ. Entomol., 1955, 48, N 4, p. 347—354.
9. Пат. 1187849 (ФРГ). Insektizide Mittel / G. Schrader—РЖ Химия, 1966, 24 Н923П.
10. Walter L. A., Goodson L. H., Fosbinder R. J. Thioether barbiturates. IV.  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -thioethyl derivatives.—J. Amer. Chem. Soc., 1945, 67, N 4, p. 661.
11. Bordwell F. G., Andersen H. M. The reaction of epoxides with thiourea.—Ibid., 1953, 75, N 20, p. 4959—4962.

Институт органической химии  
АН УССР

Поступила  
23 июля 1981 г.