



УДК 547.26'118 : 541.691 : 577.152.311.042

РОЛЬ ЭСТЕРАЗ В ПРОЯВЛЕНИИ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИОФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНСЕКТОАКАРИЦИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТ МЕРКАПТОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

*Махаева Г. Ф., Янковская В. Л., Одоева Г. А. *,
Шестакова И. Н. *, Хованских А. Е. *, Мастрюкова Т. А. **,
Шитов А. Э. **, Жданова Г. В. **, Габачник М. И. ***

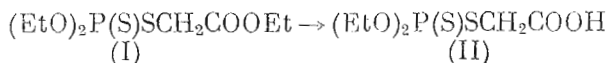
*Институт физиологически активных веществ Академии наук СССР,
Черноголовка Московской обл.;*

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

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

Для выяснения биохимических основ избирательности действия инсектоакарицида $\text{Me}(\text{EtO})\text{P}(\text{S})\text{SCH}_2\text{SCH}_2\text{COOR}$ ($\text{R}=\text{Me}$) исследовано взаимодействие этого соединения и метаболитов его окислительной активации ($\text{P}=\text{O}$ -аналог, $\text{S}=\text{O}$ -аналог и соответствующий последнему $\text{P}=\text{O}$ -аналог) и гидролитической детоксикации ($\text{R}=\text{H}$) с холинэстеразами теплокровных животных и американского таракана, а также с карбоксилэстеразами из печени крысы и нервной цепочки (или жирового тела) американского таракана. Показано, что низкая токсичность исходного метилдитиофосфоната для теплокровных животных и американского таракана хорошо согласуется с легким гидролизом этого соединения соответствующими карбоксилэстеразами, тогда как метаболиты активации не гидролизуются карбоксилэстеразами, а наоборот их ингибируют. Низкая же активность карбоксилэстеразы злаковой тли обуславливает высокую токсичность исходного метилдитиофосфоната для этого насекомого, поскольку в этом случае основным метаболическим процессом становится окислительная активация соединения до соответствующего $\text{P}=\text{O}$ -аналога.

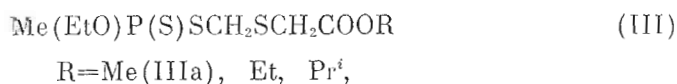
Наличие в молекуле фосфорорганического инсектицида карбалкоксильных групп создает предпосылки его избирательной токсичности. Еще в 1958 г. О'Брайн с сотр. [1] предположили, что низкая токсичность ацетона (I) для млекопитающих связана со значительно более быстрым, чем в организмах членистоногих, карбоксилэстеразным гидролизом сложноэфирной группы:



Причину же детоксикации при переходе от (I) к (II) видели в изменении фосфорилирующей способности соответствующих моноптиоаналогов, связанной с резким ослаблением электроноакцепторных свойств карбоксилат-аниона по сравнению с карбэтоксильной группой или снижением электрофильности атома фосфора вследствие эффекта поля, вызванного близким расположением карбоксилат-аниона [1, 2].

Однако, как было показано нами [3-5], гидролиз сложноэфирной группы, расположенной достаточно далеко от атома фосфора, также приводит к детоксикации соединений. Очевидно, детоксикация обусловлена главным образом тем, что образующийся отрицательно заряженный карбоксилат-анион препятствует сорбции ингибитора на активной поверхности холинэстераз, также несущей отрицательный заряд (анионный пункт).

С целью проверки этого предположения синтезированы метилдитиофосфонаты общей формулы (III) [6]



Кинетические параметры гидролиза дитиофосфоната (IIIa) и этилбутирата под действием карбоксилэстераз

Соединение	Карбоксилэстераза печени крысы			Карбоксилэстераза жирового тела американского таракана		
	$V \cdot 10^6$, моль/ /(мин·мг)	$K_m \cdot 10^4$, М	$V/K_m \cdot 10^6$, л/(мин· ·мг)	$V \cdot 10^6$, моль/ /(мин·мг)	$K_m \cdot 10^4$, М	$V/K_m \cdot 10^6$, л/(мин· ·мг)
(IIIa)	0,20±0,01	1,43±0,09	1,39	9,13±0,14	4,22±0,21	2,16
Этилбутират	8,7±0,3	9,1±0,4	9,56	9,37±0,16	4,51±0,22	2,08

представляющие собой модификацию высокоактивного, но токсичного для теплокровных животных инсектоакарицида $\text{Me}(\text{EtO})\text{P}(\text{S})\text{SCH}_2\text{SEt}$ (LD_{50} 2,5 мг/кг крысы, *per os*) [7]. Соединения (III) значительно менее токсичны для мышей (приблизительно в 100 раз) и сохраняют высокую активность для ряда членистоногих. Так, для (IIIa) LD_{50} 320 мг/кг мыши, СК_{50} * для злаковой тли (*Toxoptera graminum* R) и паутинового клеща (*Tetranychus telarius* K) соответственно 0,0005 и 0,0017% [6]. В то же время соединение (IIIa) имеет достаточно низкую токсичность для американского таракана (*Periplaneta americana* L) (LD_{50} 350 мкг/г).

В настоящей работе для выяснения биохимических основ избирательности действия соединений (III) на примере О-этил--S-(карбметоксиметилмеркаптометил)метилдитиофосфоната (IIIa) было исследовано взаимодействие этого соединения и возможных продуктов его метаболической активации (IV) – (VI) и детоксикации (VII) [8]:



с эстеразами млекопитающих: карбоксилэстеразой из печени крысы (КФ 3.1.1.1), ацетилхолинэстеразой эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразой сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8), а также с карбоксилэстеразой из нервной ткани и жирового тела американского таракана (3.1.1.1) и холинэстеразой из нервной ткани американского таракана (КФ 3.1.1.7).

Соединения (IIIa) – (VI) исследованы как субстраты карбоксилэстераз, и их способность гидролизываться под действием этих ферментов охарактеризована константами Михаэлиса (K_m) и максимальной скоростью (V) гидролиза.

Эти же соединения исследованы и как ингибиторы карбоксилэстераз и холинэстераз. При этом необратимые ингибиторы охарактеризованы бимолекулярными константам ингибирования (k_{II}), а обратимые – величинами K_I .

В табл. 1 приведены кинетические параметры гидролиза дитиофосфоната (IIIa) под действием карбоксилэстераз из печени крысы и жирового тела американского таракана и определенные в тех же условиях кинетические параметры гидролиза этилбутирата.

Кинетика карбоксилэстеразного гидролиза дитиофосфоната (IIIa) подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен. Из сопоставления величин V/K_m , характеризующих эффективность ферментативного гидролиза, видно, что дитиофосфонат (IIIa) гидролизывается карбоксилэстеразой печени крысы лишь в 6,8 раза медленнее, чем этилбутират. Эффективность гидролиза соединения (IIIa) и этилбутирата карбоксилэстеразами таракана одинакова; величины V и K_m гидролиза этиловых эфиров масляной

* СК_{50} – концентрация вещества в %, вызывающая гибель 50% особей.

Ингибирование холинэстераз и карбоксилэстераз соединениями (IV) – (VII)

Соединение	Константа ингибирования k_{II} , $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ *				
	Ацетилхолинэстераза эритроцитов человека	Бутирилхолинэстераза сыворотки лошади	Карбоксилэстераза печени крысы	Холинэстераза нервной ткани американского таракана	Карбоксилэстераза нервной ткани американского таракана
(IV)	$(1,69 \pm 0,07) \cdot 10^5$ $(5,53 \pm 0,22) \cdot 10^5$	$(1,86 \pm 0,11) \cdot 10^4$ $(1,54 \pm 0,10) \cdot 10^4$	$(1,01 \pm 0,04) \cdot 10^5$	$(6,31 \pm 0,34) \cdot 10^4$	$(4,42 \pm 0,21) \cdot 10^5$
(V)	$(3,63 \pm 0,14) \cdot 10^3$ $(3,64 \pm 0,19) \cdot 10^4$	$(1,40 \pm 0,08) \cdot 10^3$ $(1,81 \pm 0,13) \cdot 10^3$	$(9,20 \pm 0,07) \cdot 10^2$	$(4,87 \pm 0,23) \cdot 10^2$	$(3,40 \pm 0,12) \cdot 10^3$
(VI)	$(4,25 \pm 0,05) \cdot 10^6$ $(4,41 \pm 0,31) \cdot 10^6$	$(7,08 \pm 0,41) \cdot 10^4$ $(8,72 \pm 0,39) \cdot 10^4$	$(4,10 \pm 0,06) \cdot 10^5$	$(1,87 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,07) \cdot 10^6$
(VII)			$K_i = (2,86 \pm 0,29) \cdot 10^{-4} M$		

* Для каждого соединения данные первой строки получены методом потенциометрического титрования, а данные второй строки — спектрофотометрическим методом Эллмана.

кислоты и кислоты, содержащей тиофосфоновую группу (IIIa), одинаковы. Высокие скорости гидролиза дитиофосфоната (IIIa) под действием карбоксилэстераз печени крысы и американского таракана указывают на возможность быстрой гидролитической детоксикации соединения (IIIa) в организме.

Сульфоксид (V), который образуется при окислении дитиофосфоната (IIIa) по сульфидной сере, также гидролизует карбоксилэстеразой печени крысы, но значительно медленнее, чем (IIIa). Гидролиз соединения (V), по-видимому, существенно затруднен конкурирующим процессом ингибирования карбоксилэстеразы этим соединением.

Данные по ингибированию холинэстераз и карбоксилэстераз теплокровных животных и американского таракана соединениями (IV)–(VII) (табл. 2) показывают, что сульфоксид (V) является слабым необратимым ингибитором исследуемых эстераз.

Продукты окислительной десульфурации — P=O-метаболиты (IV) и (VI), как и ранее изученные нами метаболиты активации дитиофосфатов, содержащих фрагменты аминокислот [5], не гидролизуются карбоксилэстеразами печени крысы, жирового тела и нервной ткани американского таракана, т. е. P=O-метаболиты в организме не могут, по-видимому, подвергаться гидролитической детоксикации. Эти соединения необратимо ингибируют карбоксилэстеразы крысы и таракана (табл. 2), причем довольно высокие константы ингибирования (10^5 – 10^6 M⁻¹·мин⁻¹) свидетельствуют о том, что образующиеся в организме в результате окислительной десульфурации монотиофосфонаты будут тормозить карбоксилэстеразный гидролиз, т. е. процесс детоксикации исходного дитиофосфоната (IIIa). Соединения (IV), (VI) являются ингибиторами средней силы для холинэстераз теплокровных, причем они более эффективно ингибируют ацетилхолинэстеразу, чем бутирилхолинэстеразу. В отношении холинэстеразы нервной ткани американского таракана эти соединения являются на порядок менее эффективными ингибиторами, чем для ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека.

Интересно, что при окислении соединения (IV) по сульфидной сере (VI) в 7,7 раза возрастает константа ингибирования ацетилхолинэстеразы и в 3,7 раза — константа ингибирования бутирилхолинэстеразы. При этом более высокая ингибиторная способность сульфоксидов обусловлена, по-видимому, как электроноакцепторными свойствами сульфоксидной группировки, так и вкладом полярных взаимодействий сульфоксидной серы с анионным пунктом активного центра этих ферментов [2]. Что касается карбоксилэстераз, то ингибиторная способность сульфоксида (VI) в 2 раза превышает соответствующую величину для (IV) в отношении карбоксилэстеразы таракана, а для карбоксилэстеразы крысы эти величины остаются равными. Это может быть связано с различием в строении активных центров карбоксилэстераз крысы и таракана, в частности с некоторым вкладом полярных взаимодействий при связывании молекулы ингибитора в активном центре карбоксилэстеразы таракана.

Изучение карбоксилэстеразного гидролиза этилбутирата в присутствии продукта гидролитической детоксикации соединения (IIIa) — кислоты (VII) показало, что эта кислота, содержащая дитиофосфоновую группировку, является обратимым ингибитором карбоксилэстеразы печени крысы, причем ингибирование происходит по неконкурентному механизму. Аналогично взаимодействуют с карбоксилэстеразой дитиофосфаты, содержащие фрагменты β-аланина и валина (A): (EtO)₂P(S)SCH₂CONH—A—COOH [5]. Ранее было показано, что карбоновые кислоты (масляная, валериановая) не влияют на карбоксилэстеразный гидролиз этилбутирата, т. е. наблюдаемое явление, по-видимому, связано с наличием в исследуемых соединениях тиофосфорильной группировки.

Полученные нами данные согласуются с результатами биологических испытаний соединений (IIIa) и (IV). Обнаруженная способность дитиофосфоната (IIIa) подвергаться эффективному карбоксилэстеразному гидролизу говорит о том, что значительное различие в токсичностях дитиофосфоната (IIIa) (LD₅₀ 320 мг/кг мыши, per os) и его монотиоаналога

(IV) ($LD_{50} < 25$ мг/кг мыши, per os), обусловлено, по-видимому, быстрым гидролизом соединения (IIIa) под действием карбоксилэстеразы.

Аналогично в случае американского таракана различие в токсичностях дитио- и монотиофосфонатов (IIIa) и (IV) (LD_{50} соответственно 350 и 13 мг/г) также хорошо согласуется с высокой гидролитической активностью карбоксилэстеразы таракана в отношении дитиофосфоната (IIIa). В литературе отмечена высокая активность карбоксилэстераз американского таракана в отношении малатиона [9] и ацетона [10] по сравнению с активностью карбоксилэстераз мухи (*Musca domestica* L), этим и объяснена избирательная токсичность указанных соединений в отношении последней.

Таким образом, гидролитическая детоксикация является существенным, а возможно, и основным направлением метаболизма дитиофосфоната (IIIa) в организмах теплокровных животных и американского таракана.

Что же касается злаковой тли, то различия в токсичностях (IIIa) и его активного метаболита — монотиофосфоната (IV) совсем невелики — менее трех раз (CK_{50} соответственно 0,0005 [6] и 0,00018% [11]). Это хорошо согласуется с приведенными в литературе данными о слабой активности карбоксилэстеразы злаковой тли [12], в то время как активный монотиофосфонат (IV) ингибирует ацетилхолинэстеразу тли с более высокой скоростью, чем ацетилхолинэстеразу человека и холинэстеразу американского таракана (k_{II} для ацетилхолинэстеразы тли $5,2 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [11], ср. с данными табл. 2). По-видимому, аналогичная картина наблюдается и для паутиного клеща, для которого различия в токсичностях (IIIa) и (IV) также невелики — менее пяти раз (CK_{50} соответственно 0,0017 [6] и 0,00035% [13]), т. е. для злаковой тли и паутиного клеща основным направлением метаболизма, по-видимому, является окислительная активация.

Экспериментальная часть

Соединения (IV) — (VI) синтезировали согласно [8]. Частично очищенную карбоксилэстеразу печени крысы с уд. акт. 2МЕ/мг получали ранее описанным методом [5]. Активность карбоксилэстераз (рН 7,8; 25° С) определяли по гидролизу этилбутирата потенциметрическим методом в режиме рН-статирования на автотитраторе Radiometer, RTS-822 (Дания). Подробная методика приведена в работе [5]. Карбоксилэстеразный гидролиз соединения (IIIa) и его метаболитов изучали аналогичным образом.

Были использованы коммерческие препараты ацетилхолинэстеразы с уд. акт. 4,0 и 2,2 МЕ/мг и бутирилхолинэстеразы с уд. акт. 9,6 МЕ/мг отечественного производства.

Активность холинэстераз определялась потенциметрически в режиме рН-статирования с использованием в качестве субстрата ацетилхолинбромида и колориметрическим методом Элмана [14], субстрат — ацетилтиохолинниодид (рН 7,5; 25° С).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [15].

Источником холинэстеразы и карбоксилэстеразы нервной ткани американского таракана служил гомогенат грудных ганглиев. Активность этих ферментов определяли колориметрически, используя для холинэстеразы субстрат ацетилтиохолинниодид, а для карбоксилэстеразы — *n*-нитрофенил-ацетат.

Источником карбоксилэстеразы для определения скорости гидролиза соединения (IIIa) был гомогенат жирового тела американского таракана.

Бимолекулярные константы скорости взаимодействия эстераз с ингибиторами (k_{II}) определяли по методу [16] в условиях $[I]_0 \gg [E]_0$, контролируя остаточную активность фермента после инкубации с ингибитором.

Кинетические параметры гидролиза субстратов, величины констант ингибирования и средневзвешенные отклонения рассчитывали методом линейной регрессии на калькуляторе НР-67.

1. O'Brien R. D., Thorn G. D., Fisher R. W. J. *Econ. Entomol.*, 1958, v. 51, № 5, p. 714–718.
2. *Ето М. Organophosphorus pesticides*, Boca Raton, CRC, 1979, p. 164–165.
3. Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Горбенко Э. Б., Шабапова М. П., Савченко К. Н., Каган Ю. С., Кабачник М. И. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1968, № 9, с. 2042–2050.
4. Каган Ю. С., Ершова Е. А., Клисенко М. А., Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Жданова Г. В., Бресткин А. П., Брик И. Л., Мандельштам Ю. Е., Кабачник М. И. *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 1982, № 2, с. 242–247.
5. Махаева Г. Ф., Веселова В. Л., Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Жданова Г. В., Кабачник М. И. *Биоорганическая химия*, 1983, т. 9, № 7, с. 920–925.
6. Мастрюкова Т. А., Емжушева З. К., Шипов А. Э., Каган Ю. С., Ершова Е. А., Савченко К. Н., Рославцева С. А., Гусева Н. А., Калужина Т. Н., Голубева В. П., Кабачник М. И. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1979, № 3, с. 637–640.
7. Schrader G. Пат. № 1032247 (ФРГ) 1954. *Chem. Abstr.*, 1960, v. 54, № 21, p. 22363.
8. Мастрюкова Т. А., Жданова Г. В., Шипов А. Э., Кабачник М. И. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1983, № 6, с. 1384–1389.
9. Krieger H. K., O'Brien R. D. J. *Econ. Entomol.*, 1959, v. 52, № 6, p. 1063–1067.
10. Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Наука, 1978, с. 120.
11. Моралес С. И. Выделение и свойства холинэстераз злаковой тли *Schizaphis graminum* Rond в связи с проблемой избирательности действия инсектицидов. Автореф. канд. дис. Л.: 1983, с. 13.
12. Волкова Р. И., Титова Э. В. *Биохимия*, 1983, т. 48, № 10, с. 1634–1642.
13. Мастрюкова Т. А., Шипов А. Э., Емжушева З. К., Бресткин А. П., Брик И. Л., Мандельштам Ю. Е., Федин А. И., Ножко Т. И., Тилябаева З., Рославцева С. А., Каган Ю. С., Ершова Е. А., Кабачник М. И. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1980, № 5, с. 1131–1136.
14. Ellman C. L., Courthey K. D., Andres V., Teatherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, v. 7, № 1, p. 88–95.
15. Loury O. H., Rosenbrough K. J., Farr A. L., Kandoll R. J. *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.
16. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965, с. 115.

Поступила в редакцию
31.I.1985

THE ROLE OF ESTERASES IN TOXICITY OF THIOORGANOPHOSPHORUS INSECTOACARICIDES CONTAINING A MERCAPTOACETIC ACID FRAGMENT

МАКБАЙЕВА Г. Ф., ЯНКОВСКАЯ В. Л., ОДОYEВА Г. А. *,
ШЕСТАКОВА Н. Н. *, KHOVANSKIKH A. E. *, MASTRYUKOVA T. A. **,
ШИПОВ А. Э. **, ZHDANOVA G. V. **, KABACHNIK M. I. **

*Institute of Physiologically Active Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka, Moscow Region; * I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad; ** A. N. Nesmeyanov Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Interaction of insectoacaricide Me(EtO)P(S)SCH₂SCH₂COOMe (I), its activation metabolites (P=O (II), S=O, and P=O, S=O (III) analogues), and a detoxication product (–COOH analogue (IV)) with rat liver carboxylesterase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of warm-blooded animals, as well as with cholinesterase and carboxylesterase of American cockroach has been studied. Low toxicity of (I) towards warm-blooded animals and American cockroach is shown to result from its rapid hydrolysis with corresponding carboxylesterases to form (IV). Monothiophosphonates (II) and (III) are not hydrolyzed by carboxylesterases but inhibit them irreversibly. High toxicity of (I) towards aphids can be ascribed to low activity of the carboxylesterase of that insect.