



УДК 612.822.1:577.153.4

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЧЛЕНИСТОНОГИХ К ИНГИБИТОРАМ

РОЗЕНГАРТ В. И., ШЕРСТОБИТОВ О. Е.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. П. М. Сеченова
АН СССР, Ленинград

В обзоре приведены литературные данные и результаты собственных исследований, касающиеся субстратной специфичности и чувствительности к фосфоорганическим ингибиторам холинэстераз нервной ткани млекопитающих, насекомых и клещей. Показаны существенные различия между ферментами разного происхождения. Избирательное угнетение холинэстеразы членистоногих может быть достигнуто изменением структуры как фосфорильной, так и отщепляемой части молекулы ингибитора. Особый интерес представляет избирательность, связанная с конформацией гетероцикла и с введением ацетиленовой группы в отщепляемую часть молекулы.

В настоящее время соединения с антихолинэстеразным механизмом действия приобрели широкое распространение как агенты, уничтожающие вредных насекомых и клещей, — средства защиты растений и животных. Поэтому поиски новых веществ, обладающих высоконизбирательной инсектоакарицидной активностью, неизбежно связаны с исследованием свойств холинэстераз (ХЭ) нервной ткани разных животных и с изучением зависимости между строением новых соединений и их антихолинэстеразной активностью. В обзоре рассмотрены литературные данные и некоторые результаты исследований, проведенных в последние годы в нашей лаборатории по сравнительной чувствительности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) разных видов животных к ее ингибиторам. Мы не ставили перед собой задачу исчерпывающего рассмотрения всех имеющихся фактов. Некоторые из них описаны в обзорах Бресткина и соавт. [1] и Hollingworth [2]. В книге по избирательной токсичности фосфоорганических соединений (ФОС) [3] этому вопросу посвящена специальная глава. Поэтому основное внимание в настоящем обзоре уделено попытке установить закономерности, связывающие особенности строения ингибиторов АХЭ с их способностью угнетать эти ферменты разного происхождения.

Изучение антихолинэстеразной активности приобретает особое значение в том случае, когда такие исследования проводят не с еди-

ническими соединениями, а с рядами, имеющими логически изменяющуюся структуру. Именно такие исследования позволяют получить информацию об особенностях строения различных участков активной поверхности АХЭ, и их результаты могут послужить основой для практических рекомендаций по синтезу высококонзбирательных инсектоакрицидов.

В соответствии с огромным числом видов, составляющих класс насекомых, разнообразием их экологии, особенностями онтогенетического развития и анатомического строения ХЭ членистоногих отличаются чрезвычайной пестротой как по активности, так и по субстратной и ингибиторной специфичности. В настоящее время нет достаточных оснований для строгой классификации ХЭ членистоногих: отнести их к АХЭ или к бутирилхолинэстеразе (БХЭ), да и нет уверенности, что такое разделение по аналогии с ХЭ млекопитающих (и позвоночных вообще) в принципе корректно. Однако имеются основания считать, что главная биологическая функция АХЭ—быстрое разрушение нейромедиатора АХ, связанная с синаптической передачей первого импульса,—одинакова у разных видов животных, в том числе у членистоногих. Об этом убедительно свидетельствует обнаруженное в последние годы наличие высокой активности ХЭ по ходу синаптической щели в ганглиях саранчи [4] и американского таракана [5]. Поэтому и фермент членистоногих мы будем называть АХЭ, поскольку речь идет о синаптическом ферменте, ингибирование которого нарушает передачу нервного импульса. В ходе изложения приведены как литературные, так и собственные данные о действии различных веществ не только на АХЭ нервной ткани, но и АХЭ эритроцитов, так как можно считать установленным, что для каждого вида млекопитающих существует полное сходство свойств АХЭ эритроцитов и головного мозга [3, 6].

1. Субстратная специфичность

Некоторые данные о субстратной специфичности АХЭ позвоночных и насекомых приведены в табл. 1, из которой видно, что для ферментов позвоночных характерно большее единообразие, чем для насекомых. Ни одна из АХЭ позвоночных не расщепляет перечисленные в таблице субстраты быстрее, чем АХ. Для ферментов всех позвоночных характерна практически полная неспособность гидролизовать бутирилхолин (БХ). В отличие от этого АХЭ насекомых, особенно мух и пчел, весьма активна по отношению и к БХ. Ферменты четырех видов из семи, приведенных в таблице, разрушают мехолин (МеХ) быстрее, чем АХ. Все это свидетельствует о несомненном отличии АХЭ насекомых от фермента позвоночных. И тем не менее нет оснований говорить о какой-то типичной АХЭ насекомых. Разнообразие субстратной специфичности и, как будет показано ниже, чувствительно-

Таблица 1

Субстратная специфичность АХЭ позвоночных и насекомых
(по данным разных авторов)

Вид животного	Объект исследования	Относительная скорость гидролиза (скорость гидролиза АХ принята за 100)		
		пропионил- холлин	бутирил- холлин	мехолин
Позвоночные				
Человек	эритроциты	70	4,1	47
Бык	"	78	3,0	35
Бык	головной мозг	72	1,5	27,5
Крыса	"	79	0,5	37
Голубь	"	78	0	90
Электрический скат	электрический орган	33	0	23
Электрический угорь	"	97	1	22
Насекомые				
Комнатная муха	голова	85	150	22
Полевая муха	"	81	77	25
Медоносная пчела	"	83	122	167
Поцелуйный клоп	"	58	38	45
Американский таракан	нервная цепочка	85	13	190
Желудевый долгоносик	целые насекомые	73	38	168
Полевая саранча	"	260	25	450

Примечание. Скорость гидролиза каждого субстрата определяли при его оптимальной концентрации

сти к ингибиторам у АХЭ насекомых разных видов настолько велико, что делает обобщение здесь практически невозможным.

2. Чувствительность к обратимым ингибиторам

Большую серию исследований по сравнительному изучению свойств АХЭ бычьих эритроцитов и головы мух выполнил Kcipka [7]. Было изучено действие на обе АХЭ симметричных четвертичных аммониевых соединений, содержащих алкильные радикалы различного размера. Результаты этих опытов представлены в табл. 2. Увеличение

Таблица 2

Сродство аммониевых соединений строения NR_4^+
к разным АХЭ (усл. ед.)

R	АХЭ эритроцитов быка	АХЭ головы мух
CH_3	1	1
C_2H_5	2,4	3,6
$\text{n-C}_3\text{H}_7$	25	—
$\text{n-C}_4\text{H}_9$	43	190
$\text{n-C}_5\text{H}_{11}$	7,4	320

размера алкильных радикалов в опытах с АХЭ эритроцитов вначале давало заметный эффект. Особенно велик вклад *n*-пропильной и *n*-бутильной групп. Однако при переходе к тетрапентиламмонии (ТПА)

средство резко снижалось, что может свидетельствовать о стерических ограничениях. В случае АХЭ мух эффект от увеличения радикала был выражен гораздо больше, и у пентильного производного средство не только не снижалось, но, напротив, резко возрастало. Эти данные логичнее всего объяснить тем, что гидрофобная область вокруг аннионного центра АХЭ мух протяженнее, шире, чем у АХЭ эритроцитов, и в связи с этим в случае АХЭ мух меньше стерических препятствий для взаимодействия с углеводородными радикалами.

В пользу гипотезы о более обширных гидрофобных областях вокруг аннионного центра АХЭ мух свидетельствуют также опыты, в которых изучали способность обратимых катионных ингибиторов защищать оба фермента от необратимого воздействия метансульфонилфторида [8]. Оказалось, что даже очень крупные катионы, такие, как тетрафениларсоний, не защищали от сульфонилирования АХЭ мух, тогда как АХЭ эритроцитов они защищали весьма эффективно. Это можно объяснить тем, что в обширных гидрофобных областях АХЭ мух крупные катионы располагаются свободно, не маскируя эстеразный центр. В АХЭ эритроцитов, в которой гидрофобные области менее обширны, большие катионы выталкиваются на эстеразный центр и препятствуют подходу к нему метансульфонилфторида.

O'Brien [9] сравнивал влияние тетраалкиламмониевых солей на фермент эритроцитов человека и голов мух. В случае АХЭ эритроци-

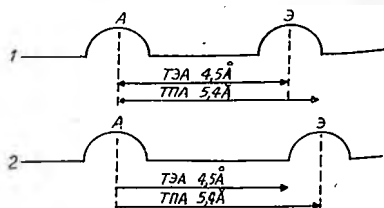


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая возможные различия в расстоянии между аннионным (А) и эстеразным (Э) центрами у АХЭ млекопитающих (1) и АХЭ мух (2) [9].

тов тетраэтиламмоний (ТЭА) и ТПА оказывали одинаковый защитный эффект против фосфорилирующего действия ФОС. Это говорит о том, что когда положительно заряженный атом азота связывается с аннионным центром, у обоих катионов размеры алкильных групп достаточны, чтобы прикрыть эстеразный центр, тем самым защитив его от фосфорилирования. Совершенно иную картину наблюдали в случае АХЭ мух: защитное действие ТПА оказалось в 32 раза выше, чем ТЭА. Следовательно, маскировка эстеразного центра АХЭ мух ТПА осуществляется более эффективно (рис. 1). O'Brien пришел к выводу, что у АХЭ эритроцитов расстояние между аннионным и эстеразным центрами должно быть меньше, чем радиус ТЭА, то есть меньше 0,45 нм, тогда как у АХЭ мух это расстояние больше 0,45 нм, но не превышает 0,54 нм—радиуса ТПА.

Различия в действии обратимых ингибиторов на АХЭ эритроцитов человека и АХЭ злаковой тли обнаружены в работе Морале-

ва [10]. В низких концентрациях холин ($4 \cdot 10^{-3}$ М), тетраметиламмоний ($1,3 \cdot 10^{-2}$ М) и ТЭА ($4 \cdot 10^{-3}$ М) оказывали на АХЭ тли, но не АХЭ человека, активирующее действие, а при более высоких концентрациях ингибировали фермент. Тетрабутил- и триметилпентиламмоний не активировали, а только тормозили АХЭ тли, причем в концентрациях больших, чем АХЭ человека. Эти факты свидетельствуют о том, что гидрофобная область вокруг аннионного центра АХЭ тли, по-видимому, менее протяженна, чем у АХЭ человека. Аллостерический пункт АХЭ тли, обуславливающий активацию гидролиза субстратов, не приспособлен к сорбции объемных алкильных радикалов аммониевых соединений.

3. Чувствительность к ингибиторам необратимого типа действия

3. 1. Чувствительность к арилфосфатам. ФОС, содержащие фенольный радикал в отщепляемой части молекулы, — весьма распространенная группа инсектоакарицидов, обладающих высокой избирательностью действия. Изучение механизма избирательного действия метилнитрофоса

$(CH_3O)_2P(S)O-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ показал [11], что кислородный

родный аналог этого соединения ($p=0$), в который превращается в живом организме метилнитрофос, а также некоторые близкие по структуре фосфаты обладают значительно более выраженным действием на АХЭ мух, чем на АХЭ эритроцитов (табл. 3). Вве-

Таблица 3

Антихолинэстеразная активность производных кислородного

аналога метилнитрофоса строения $(CH_3O)_2P(O)O-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$

R	$K_{II} \cdot 10^{-5} (M^{-1}, \text{мин}^{-1})$		I/II
	АХЭ голов мух	АХЭ эри- троцитов быка	
	I	II	
H	2,9	5,2	0,56
CH ₃	7,6	0,73	10,3
изо-C ₃ H ₇	22,6	0,22	100

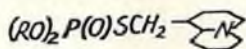
дение метильной и изопропильной группы в положении 3 резко снижало ингибирование АХЭ эритроцитов. При этом ингибирование АХЭ мух значительно усиливалось. Это позволило авторам предположить, что алкильный радикал в положении 3 фенила повышает сродство веществ к участку АХЭ мух, расположенному в районе аннионного центра, тогда как в АХЭ эритроцитов быка и, по-видимому, вообще млекопитающих, имеются стерические препятствия для сорбции веществ, содержащих такой радикал. Следовательно, представления о

различном расстоянии между анионным и эстеразным центрами в АХЭ мух и млекопитающих, полученные на основании изучения антихолинэстеразной активности арилфосфатов, совпадают с результатами опытов с обратимыми ингибиторами.

3. 2. *Чувствительность к ФОС, содержащим гетероциклы.* ФОС, содержащие в отщепляемой части молекулы атом азота, способный протонироваться, существенно повышают антихолинэстеразную эффективность за счет нонного взаимодействия с анионным центром фермента. Было исследовано [12] действие таких ФОС на АХЭ млекопитающих, некоторых насекомых, паутинного клеща. Использованные соединения имели общую формулу $(RO_2)P(O)SCH_2R'$, где R представлял собой нормальный радикал различной длины, а R' был остатком природного алкалоида лупинина или его конформационного изомера эпилупинина, отличающихся друг от друга только тем, что у лупинина заместитель в гетероцикле расположен аксиально, а у эпилупинина—экваториально. Таким образом, можно было отдельно оценить вклад в биологическую активность как строения гетероцикла, так и величины фосфорильной части молекулы. В табл. 4 приведены

Таблица 4

Антихолинэстеразная активность (κ_{11} , $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) ФОС-производных лупинина строения



Источник фермента	R			
	C_2H_5	C_3H_7	C_4H_9	C_5H_{11}
Мозг мыши	$2,1 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$
Эритроциты человека	$2,2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$
Эритроциты кролика	$1,1 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^4$
Голова мухи	$3,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^6$
Заковая тля	$1,5 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$9,6 \cdot 10^3$
Рисовый долгоносик	$1,4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^2$
Мучнистый червец	$8,2 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^4$
Паутинный клещ	$3,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^3$

данные об активности лупининовых производных. Закономерность антихолинэстеразного действия на ферменты млекопитающих была одинаковой и заключалась в том, что при удлинении алкильных радикалов до C_4H_9 антихолинэстеразная активность существенно усиливалась. Это вполне согласуется с известными представлениями о наличии в районе эстеразного центра ХЭ млекопитающих гидрофобных участков, с которыми могут взаимодействовать О-алкильные радикалы ФОС [13]. Характер действия изученных ФОС с АХЭ млекопитающих в большинстве случаев не зависел от того, какой гетероцикл (остаток лупинина или эпилупинина) входил в состав отщепляемой части ФОС.

Взаимодействие ФОС с АХЭ насекомых и клеща оказалось со-

вершено ным, чем с АХЭ млекопитающих. У производных лупинина при удлинении О-алкильных радикалов во всех случаях, независимо от абсолютной величины n , имело место снижение антихолинэстеразной эффективности. Некоторые соединения обладали чрезвычайно высокой способностью угнетать АХЭ голов мух. Так, абсолютные величины бимолекулярной константы скорости ингибирования достигали 10^8 ; например, для вещества с $R=C_2H_5$ АХЭ мух оказалась в 15 000 раз чувствительнее, чем АХЭ эритроцитов человека. У производных эпилупинина не было выявлено закономерной зависимости антихолинэстеразного действия от длины углеводородных радикалов.

Приведенные факты свидетельствуют о существенных различиях в строении активной поверхности АХЭ млекопитающих и разных членистоногих. В предыдущей части обзора были приведены данные о том, что у АХЭ мух расстояние между анионным и эстеразным центрами больше, чем у АХЭ млекопитающих. Следует отметить, что гидрофобная область вокруг анионного центра АХЭ мух более обширна, чем у АХЭ эритроцитов. Вполне вероятно, что этими особенностями можно объяснить и чрезвычайно высокую чувствительность АХЭ мух к производным альколоидов. По-видимому, расстояние между фосфором и азотом в три углеродных атома ($=P(O)SCH_2CH_2CH_2N<$) в этих соединениях, а также наличие гетероцикла (особенно лупинина) делают соединения значительно более комплексными по отношению к активному центру АХЭ мух, чем к АХЭ других членистоногих и млекопитающих.

Резкое снижение антихолинэстеразной активности лупининовых ФОС по отношению к ферментам исследованных членистоногих, связанное с удлинением О-алкильных радикалов, зависит от различий в гидрофобном окружении эстеразного центра АХЭ разных классов животных. Возможно, у исследованных членистоногих гидрофобные области в районе эстеразного центра имеют меньший размер, чем у ферментов млекопитающих и сразу за ними расположены гидрофильные участки, препятствующие сорбции крупных углеводородных радикалов. Это может быть причиной снижения антихолинэстеразной эффективности.

В последнее время высокая инсектицидная активность обнаруже-

на у винилфосфатов строения: $(RO)_2P(O)-O-C \begin{array}{c} \diagup \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{Cl} \\ \diagdown \text{CHBr} \quad \text{Cl} \end{array}$. У соеди-

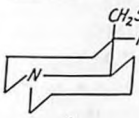
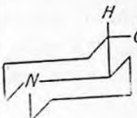
нений этого ряда отмечено четкое соответствие между антихолинэстеразной активностью по отношению к АХЭ мух и токсичностью для этих насекомых. Антихолинэстеразная активность и токсичность были наивысшими у метильных производных. При удлинении алкильных радикалов отмечено резкое снижение действия на АХЭ мух и энтомотоксичности [14]. Таким образом, характер изменения антихолинэстеразной активности в зависимости от строения фосфорильной

части молекулы этой группы ФОС полностью совпал с тем, который мы наблюдали на фосфатах—производных лупинина.

3. 3. Роль конформационной изомерии в избирательности действия на разные АХЭ была впервые выявлена при сопоставлении антихолинэстеразной активности производных лупинина и эпилупинина. Частично различия между этими группами отмечены в предыдущем разделе. Специальное сравнение (табл. 5) показало, что конформа-

Таблица 5

Действие производных лупинина и эпилупинина на различные холинэстеразы (k_M , $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$)

АХЭ	 Производное лупинина I	 Производное эпилупинина II	I/II
Мозг мыши	$2,1 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$	0,9
Эритроциты человека	$2,2 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	1,1
Злаковая тля	$1,5 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	50
Голова мухи	$3,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	33
Паутинный клещ	$3,7 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^4$	10

ция гетероцикла не играла никакой роли в действии на АХЭ млекопитающих (человека и мыши), тогда как АХЭ насекомых и клеща оказались значительно более чувствительны к лупининовому производному [12]. Надо заметить, что лупининовый конформер имеет более лабильную конформацию, чем эпилупининовый [15]. Это облегчает его взаимодействие с участком активной поверхности АХЭ в районе аннионного пункта в среде, оптимальной для проявления ферментативной активности (рН 7,5—8,0).

Однако, как отмечено выше, это свойство производных лупинина проявляется только в отношении фермента насекомых, но не млекопитающих, что, по-видимому, свидетельствует о конформационных различиях между ферментами обоих классов животных. Таким образом, конформационную изомерию ФОС можно рассматривать как один из факторов, определяющих избирательность их действия на АХЭ.

3. 4. Чувствительность к ФОС, содержащим ацетиленовую связь. ФОС, содержащие тройную (ацетиленовую) связь,—малонзученный класс соединений. Некоторые из таких веществ обладают высокой биологической активностью, поэтому исследование их антихолинэстеразной эффективности весьма интересно. С этой целью были синтезированы и изучены ряды новых ФОС различного строения, содержащие ацетиленовую связь в отщепляемой части молекулы [16—18]. Для сравнения в каждом случае определяли антихолинэстеразное действие насыщенного аналога.

Как оказалось, ацетиленовые ФОС ингибировали ХЭ сильнее (иногда на несколько порядков), чем их предельные аналоги. Это явление было названо «ацетиленовым эффектом» и для его количественной оценки использовали величину отношения бимолекулярной константы скорости торможения активности ХЭ (k_{II}) ацетиленовым ФОС к k_{II} предельного аналога. Ацетиленовый эффект варьировал в очень широких пределах. Его величина зависела как от строения ФОС, так и от природы АХЭ. Анализ показал [18], что ацетиленовый эффект связан не со стадией фосфорилирования ХЭ, а с предшествующей стадией реакции ингибирования—образованием фермент-ингибиторного комплекса, в котором ацетиленовая группа, обладающая значительной электронной плотностью, взаимодействует с каким-то, вероятно, полярным, участком активной поверхности фермента, имеющим высокое сродство к ацетиленовой группе и расположенным в районе эстеразного центра фермента; его химическая природа пока не установлена.

Некоторые из полученных данных, касающихся, главным образом, действия ацетиленовых ФОС на разные АХЭ, представлены в табл. 6 и 7.

Табл. 6 содержит результаты исследования двух рядов ФОС, в которых ацетиленовая группа занимает разное положение в незамещенной углеводородной цепи. В первом ряду (соединения 1—3) общая длина цепи одинакова (6 углеродных атомов), а во втором ряду

Таблица 6
Антихолинэстеразная активность (k_{II} , $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) некоторых ацетиленовых ФОС строения $(C_2H_5O)_2P(O)S-X$

X	Источник АХЭ				
	эритроциты человека	головной мозг мыши	голова мухи	свеклолистная тля	паутинный клещ
$C \equiv CC_4H_9$	$9,5 \cdot 10^6$ (2500)	$7,1 \cdot 10^6$ (7100)	$1,5 \cdot 10^9$ (169000)	$4,6 \cdot 10^7$ (6,570)	$6,0 \cdot 10^7$ (8600)
$CH_2C \equiv CC_3H_7$	$1,4 \cdot 10^4$ (3,7)	$7,0 \cdot 10^3$ (7,0)	$3,0 \cdot 10^5$ (34)	$1,7 \cdot 10^4$ (2,4)	$4,0 \cdot 10^4$ (5,7)
$CH_2CH_2C \equiv CC_2H_5$	$4,0 \cdot 10^3$ (1,0)	$6,6 \cdot 10^3$ (6,6)	$1,1 \cdot 10^5$ (12,3)	$1,7 \cdot 10^4$ (2,4)	$3,0 \cdot 10^4$ (4,3)
$C \equiv CH$	$2,3 \cdot 10^7$ (32000)	$2,2 \cdot 10^7$ (220000)	$3,0 \cdot 10^8$ (2700000)	$1,4 \cdot 10^7$ (140000)	$4,8 \cdot 10^7$ (48000)
$CH_2C \equiv CH$	$2,2 \cdot 10^5$ (3000)	$7,0 \cdot 10^4$ (1400)	$1,2 \cdot 10^5$ (4000)	$1,5 \cdot 10^4$ (500)	$6,3 \cdot 10^4$ (300)
$CH_2CH_2C \equiv CH$	$4,0 \cdot 10^3$ (6,3)	$1,7 \cdot 10^3$ (5,9)	$1,1 \cdot 10^4$ (0,6)	$2,0 \cdot 10^3$ (0,7)	$2,6 \cdot 10^3$ (0,09)

Примечание. В скобках дана величина ацетиленового эффекта (k_{II} ацетиленового ФОС/ k_{II} ненасыщенного аналога)

(соединения 4—6) по мере удаления ацетиленовой связи от атома серы растет и длина цепи. Ясно видно, что в обоих рядах перемещение ацетиленовой связи из α - в β -положение тиоэфирного радикала (переход от вещества 1 к 2 и от 4 к 5) приводило к резкому снижению скорости ингибирования АХЭ различного происхождения, дости-

гавшему 2—3,5 порядков. В соответствии с этим уменьшалась и величина ацетиленового эффекта. Дальнейший переход тройной связи в γ -положение тиюэфирной группы в первом ряду соединений (вещество 3) не дало никакого дополнительного изменения. Во втором же ряду это (вещество 6) сопровождалось дальнейшим выраженным снижением ацетиленового эффекта, причем выявились существенные различия между ферментами млекопитающих и членистоногих. В случае АХЭ человека и мыши γ -производное проявляло небольшой, но четко выраженный ацетиленовый эффект, для АХЭ мухи и тли он полностью отсутствовал, а для фермента клеща он стал обратным: ацетиленовое производное ингибировало АХЭ клеща в 10 раз слабее, чем предельное.

Следовательно, положение ацетиленовой группы в молекуле ингибитора имеет значение не только для величины ацетиленового эффекта, но и для избирательности действия на различные ферменты. Особенно наглядно различия в избирательности видны из данных, приведенных в табл. 7. Все ФОС, использованные в этой серии опытов;

Таблица 7

Антихолинэстеразная активность (k_{II} $M^{-1} \cdot min^{-1}$) некоторых ацетиленовых ФОС

Строение ФОС	Источник АХЭ				
	эритроциты человека	мозг мыши	голова мух	свекольная тля	паутинный клещ
$CH_3(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv CCH_2Cl$ (62)	$3,1 \cdot 10^6$ (62)	$9,3 \cdot 10^6$ (140)	$1,0 \cdot 10^5$ (21000)	$6,6 \cdot 10^6$ (51)	$9,0 \cdot 10^5$ (4,5)
$C_6H_5(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv CCH_2Cl$ (50)	$4,0 \cdot 10^5$ (50)	$4,7 \cdot 10^4$ (9)	$1,0 \cdot 10^5$ (31)	$9,0 \cdot 10^6$ (310)	$2,7 \cdot 10^4$ (11)
$C_6H_5(C_6H_5O)P(O)SCH_2C \equiv CCH_2SO_2H_2$ (31)	$6,2 \cdot 10^5$ (31)	$4,6 \cdot 10^4$ (38)	$4,4 \cdot 10^5$ (44)	$5,6 \cdot 10^6$ (670)	$1,1 \cdot 10^5$ (85)
$(CH_3O)_2P(O)SCH_2C \equiv CCH_2SC_2H_5$ (270)	$3,2 \cdot 10^5$ (270)	$3,3 \cdot 10^5$ (140)	$7,0 \cdot 10^6$ (580)	$2,9 \cdot 10^6$ (2000)	$3,8 \cdot 10^6$ (7600)

Примечание. В скобках дана величина ацетиленового эффекта (k_{II} ацетиленового ФОС/ k_{II} насыщенного аналога)

имели ацетиленовую связь в β -положении, но от ранее описанных веществ они отличались строением фосфорильной части, а также тем, что при конечном углеродном атоме отщепляемой части содержался заместитель: хлор или этилмеркапто-группа. Из таблицы видно, что ацетиленовый эффект может быть избирательно выражен для отдельных ферментов: соединение 1—для АХЭ мух, соединения 2 и 3—для фермента тлей, соединение 4—для АХЭ обонх этих насекомых, особенно, для фермента паутинного клеща.

Таким образом, приведенные данные дают основание предполагать, что в расположении и (или) строении ацетиленсорбирующей группы на активной поверхности разных АХЭ имеются различия, и, следовательно, введение в молекулу ФОС ацетиленовой группы может придать соединению способность избирательно действовать на АХЭ отдельных видов.

3. 5. Особенности АХЭ тлей. Уникальной особенностью АХЭ тлей, отличающей ее от всех других исследованных АХЭ, является угнетение ее активности некоторыми тиоловыми реагентами, например, 5,5-дитио-бис-(1-нитробензоатом) (ДТНБ), широко используемом в методе определения активности ХЭ. Впервые это свойство было обнаружено Smitsaert [19] для персиковой тли. В дальнейшем эта особенность АХЭ тлей была изучена отечественными авторами [10, 20]. Было показано, что чувствительность к SH-реагентам свойственна и АХЭ других видов тлей. Ингибирование АХЭ злаковой тли посредством ДТНБ развивается во времени, то есть идет образование ковалентной связи (необратимое торможение). Субстрат частично защищает АХЭ от ингибирования ДТНБ. Это свидетельствует о том, что SH-группа расположена вблизи активного центра фермента. АХЭ тлей отличается от фермента млекопитающих низкой термостабильностью и низкой величиной оптимального значения pH (pH 7,0). По-видимому, это зависит от более рыхлой третичной структуры молекулы АХЭ тлей [10, 19].

Анионный центр у АХЭ тли больше выражен, чем у АХЭ других исследованных насекомых (муха, американский таракан, саранча) и АХЭ млекопитающих, о чем свидетельствует большее отношение величины k_{II} катионсодержащих ФОС к k_{II} их бескатионных аналогов [1, 4, 10, 21]; для АХЭ злаковой и гороховой тлей это отношение равнялось 10000, тогда как для других ферментов—не превышало 1000 [21, 22].

Заключение

Изложенные данные убедительно говорят о том, что каталитическая поверхность АХЭ разных животных наряду с выраженными чертами сходства имеет и существенные различия. Сходство состоит в том, что функциональные группы активного центра АХЭ, ответственные за взаимодействие с субстратом, одинаковы у разных фермен-

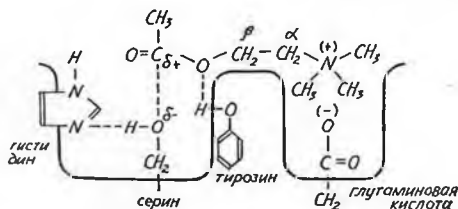


Рис. 2. Схема фермент-субстратного комплекса АХЭ [23].

тов, так же, как одинаков и собственно химический механизм гидролиза АХ. На рис. 2 представлена современная схема фермент-субстратного комплекса, образующегося на первой стадии процесса, катализируемого АХЭ [23]. Видны два четко отличимых каталитических участка: эстеразный и анионный. Главные функциональные группы первого—гидроксил серина, имидазольная группа гистидина и, ве-

роятно, гидроксил тирозина. Второй участок образован ω -карбоксильной группой глутаминовой или аспарагиновой кислоты. На рисунке показано, с какими частями молекулы АХ взаимодействуют эти группы.

По этому принципу построена активная поверхность всех АХЭ. Однако между ферментами разных видов животных существуют и различия, которые нередко бывают весьма значительными и могут касаться расстояния между эстеразным и аннионным пунктами, гидрофобного окружения каждого из этих пунктов, общей конформационной подвижности всей активной поверхности и других свойств, определяемых высшими структурами белка. Эти различия являются причиной разной субстратной специфичности ХЭ и разной чувствительности их к ингибиторам, что используется для создания ингибиторов, избирательно действующих на АХЭ вредных насекомых и клещей.

Данные, приведенные в обзоре, показывают, что избирательная антихолинэстеразная активность может быть достигнута изменением структуры как фосфорильной, так и отщепляемой части молекулы ФОС. Особый интерес вызывает найденная в нашей лаборатории избирательность, связанная с конформационной изомерией гетероцикла и с введением ацетиленовой группы в отщепляемую часть молекулы ингибитора.

Необходимо отметить, что изучение избирательности действия ФОС на АХЭ различных животных имеет не только практическое значение для изыскания высокоизбирательных инсектоакарицидов, но представляет и большой теоретический интерес, так как позволяет глубже понять строение каталитической поверхности АХЭ и оценить видовые различия структуры этого фермента.

SENSITIVITY OF THE MAMMALIAN AND INSECTS NERVOUS TISSUE CHOLINESTERASES TO INHIBITORS

ROZENGART V. I., SHERSTOBITOV O. E.

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry
of the Academy of Sciences of USSR, Leningrad

The review covers recent literature data and personal results, concerning substrate specificity of the mammalian, insects and mites nervous tissue cholinesterases and their sensitivity to some organophosphorus compounds. A considerable distinction between the enzymes of different origin is pointed out. Selective inhibition of insect cholinesterase may be achieved by structural change of either the phosphoryl or the leaving part of the inhibitor molecule. The selectivity connected with the conformation of heterocycle and with the introduction of acetylene group into the leaving part of the inhibitor molecule is of special interest.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Brestkin A. P., Brick I. L., Grigor'eva G. M.*—In: Intern. Encycl. Pharm. Therap. (Ed. M. J. Michelson) Sect. 85, v. 1, p. 241—344, Pergamon Press, Oxford, New York, 1973.
2. *Hollingworth R. M.*—In: Insecticide Biochem. and Physiol. (Ed. C. F. Wilkinson) p. 431—506, Plenum Press, New York, 1976.
3. *Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов, с. 174, Л., Наука, 1978.
4. *Мандельштам Ю. Е.* Нейрон и мышца насекомого, с. 169, Л., Наука, 1983.
5. *Mueller A., Stark U.* Zool. J., v. 88, p. 435—456, 1982.
6. *Розенгарт В. И.*—В кн.: Успехи нейрохимии (Ред. Е. М. Крепе), с. 196—209, Л., Наука, 1974.
7. *Krupka R. M., Hellenbrand K.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, p. 208—215 1974.
8. *Krupka R. M.* Biochim. et biophys. acta, v. 370, p. 197—207, 1974.
9. *O'Brien R. D. J.* Agric. Food Chem., v. 11, p. 163—166, 1963.
10. *Моралев С. Н.* Выделение и свойства холинэстераз злаковой тли в связи с проблемой избирательности действия инсектицидов. Автореф. канд. дисс., с. 20, Л., 1983.
11. *Hollingworth R. M., Fukuto T. R., Metcalf R. L. J.* Agric. Food Chem., v. 15, p. 235—241, 1967.
12. *Балашова Е. К., Кузнецова Л. И., Розенгарт В. И., Васильева Т. И., Шерстобитов О. Е., Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, т. 16, № 3, с. 244—249, 1980.
13. *Кабачник М. И., Бресткин А. П., Годовиков Н. Н., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Михайлов С. С., Успехи химии*, т. 39, № 6, с. 1050—1074, 1970.
14. *Fulde S., Krocinski J., Malinowski H.* Pest. Sci., v. 11, p. 20—22, 1980.
15. *Садыков А. С., Далимов Д. Н., Годовиков Н. И.* Успехи химии, т. 52, вып. 10, с. 1602—1623, 1983.
16. *Балашова Е. К., Бресткин А. П., Вихрева Л. А., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 18, № 4, с. 325—329, 1982.
17. *Годовиков Н. Н., Вихрева Л. А., Бабашева К. К., Балашова Е. К., Шерстобитов О. Е., Кузнецова Л. И., Розенгарт В. И., Бресткин А. П.* Изв. АН СССР, сер. хим., № 7, с. 1602—1605, 1983.
18. *Балашова Е. К., Бресткин А. П., Жуковский Ю. Г., Вихрева Л. А., Розенгарт В. И., Шерстобитов О. Е.* Докл. АН СССР, т. 272, № 2, с. 503—506, 1983.
19. *Smitaert H. R.* Pest. Biochem. Physiol., v. 6, p. 215—222, 1976.
20. *Сазонова И. Н., Козлова Е. В., Майзель Е. Б., Новожилов К. В.* IV Всесоюзный биохимический съезд (тезисы научных сообщ.), т. 2, с. 167, 1979.
21. *Никанорова Е. В.*—В кн.: Бюл. ВИЗР (ред. К. В. Новожилов), № 49, с. 31—32, 1980.
22. *Моралев С. Н., Майзель Е. Б.* Докл. АН СССР, т. 259, № 1, с. 235—238, 1981.
23. *Main A. R.* Pharmacol. Therap., v. 6, p. 579—628, 1979.

Поступила 5. VI. 1984