

УДК 577.15:577.153.4

ГИДРОФОБНЫЕ ОБЛАСТИ АКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

*М. И. Кабачник, А. А. Абдулхизов, И. И. Агабекова,
А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, Е. И. Годына,
С. С. Михайлов, М. Я. Михельсон, В. И. Розенгарт,
Е. В. Розенгарт, Р. В. Ситкевич*

Кратко описаны методы синтеза тиольных производных метилтиофосфоновой кислоты и методы исследования их антихолинэстеразной активности. Изложен материал, посвященный изучению антихолинэстеразной активности синтезированных соединений.

Показано, что в процессе ингибирования холинэстераз фосфорорганическими соединениями важную, а иногда и решающую роль играет гидрофобная сорбция этих веществ на активной поверхности ферментов.

Высказано предположение, что наличие гидрофобных участков на активной поверхности холинэстераз способствует увеличению вероятности сорбции молекулы ацетилхолина — субстрата холинэстеразы на этой поверхности.

Библиография — 68 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1050
II. Материалы для исследований	1052
III. Методы исследования	1056
А. Влияние структуры углеводородного радикала в отщепляемой части ФОИ на их антихолинэстеразную активность	1058
Б. Влияние структуры углеводородного радикала в неотщепляемой части ФОИ на их антихолинэстеразную активность	1064

I. ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы (ХЭ) относятся к жизненно важным ферментам, значение которых — гидролиз ацетилхолина (АХ), одного из медиаторов нервного возбуждения. По современным представлениям¹⁻⁵, каталитический центр этих ферментов имеет два четко выраженных и пространственно разделенных участка: анионный и эстеразный. Анионный участок, по-видимому, образован карбоксилат-анионом двухосновной аминокислоты, включенной в полипептидную цепь фермента. Это может быть остаток аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Роль анионного участка состоит в специфической сорбции триметиламмониевой группы АХ, способствующей благоприятной ориентации молекулы субстрата на активной поверхности фермента.

На расстоянии 4—5 Å от анионного участка расположен эстеразный участок, на котором и разыгрывается процесс гидролиза АХ. Этот участок представляет собой сложное образование, где центральную роль играет гидроксил серина — аминокислоты, тоже включенной в полипептидную цепь фермента. В непосредственной близости от гидроксила серина находятся атомные группировки: донор протона и акцептор протона. Такими группировками могут быть, соответственно, гидроксил тирозина и имидазольная группа гистидина.

Пока неизвестно, как расположены функциональные группы, составляющие каждый из этих активных участков, в общей структуре фермента: принадлежат ли они одной и той же полипептидной цепи, или к разным, но можно думать, что сближение этих групп, приводящее к формированию активного центра, происходит в момент взаимодействия с субстратом и при его непосредственном участии^{5, 6}.

Знаниями структуры активной поверхности холинэстеразы наука в значительной мере обязана широкому и интенсивному изучению свойств и действия фосфорорганических ингибиторов (ФОИ), которое во все возрастающем темпе ведется уже более 25 лет⁷⁻¹⁰.

Общепринят следующий механизм гидролиза АХ с помощью ХЭ. Сначала происходит сорбция субстрата на активной поверхности фермента с образованием комплекса Михаэлиса, затем происходит ацетилирование гидроксила серина. Последняя стадия — деацетилирование фермента под действием воды и восстановление его первоначальной структуры. Есть все основания предполагать, что это не спонтанный водный гидролиз, а более сложный процесс.

Известно, что угнетение холинэстеразы ФОИ состоит в фосфорилировании гидроксила серина эстеразного участка фермента. В отличие от деацетилирования, холинэстераз, которое имеет место при ферментативном гидролизе АХ и других субстратов, дефосфорилирование протекает крайне медленно и поэтому угнетение носит практически необратимый характер. Возможно, что для гидролиза фосфорилированного фермента необходим разрыв не О-ацильной, а О-алкильной связи, что холинэстеразам не свойственно.

Активность ингибитора прежде всего зависит от его фосфорилирующей способности, т. е. от величины эффективного положительного заряда на атоме фосфора. Однако не только фосфорилирующая способность ФОИ определяет их антихолинэстеразную активность^{7, 10-13}. Важную роль также играют ионные и ион-дипольные взаимодействия. Они наиболее ярко проявляются при введении в молекулу ФОИ катионной группы в ее отщепляющуюся часть*. При этом происходит фиксация ФОИ на анионном участке фермента, в результате чего повышается вероятность реакции ингибитора с эстеразным участком. Первые представители таких катионных ФОИ были изучены в 1955—1958 гг., они содержали аммониевую¹⁴⁻¹⁷ или сульфониевую¹⁸⁻²⁶ группировку.

При изучении первых аммониевых ФОИ не удалось достаточно наглядно показать роль ониевого группы, так как третичные аналоги фосфорилтихолина, благодаря высокой основности аминного азота при биологических значениях pH настолько сильно протонированы, что кватернизация усиливает антихолинэстеразное действие лишь в 3—4 раза.

Значительно более четко роль положительного заряда выявилась при исследовании некоторых ФОИ, содержащих сульфидные и сульфониевые группы²⁰⁻²⁶. В сульфидных ФОИ атом серы не способен протонироваться в обычных условиях и поэтому появление заряда при переходе к сульфониевым соединениям усиливает антихолинэстеразную активность в 2—3 тысячи раз²⁶. Позднее такое же разительное увеличение активности удалось получить и с азотистыми ФОИ, являющимися производными низкоосновных ароматических аминов. Такие амины протонированы при pH 7—8 лишь в очень малой степени, и поэтому появление заряда при их кватернизации тоже усиливает активность таких ФОИ в тысячи раз²⁷.

* Отщепляемой частью молекулы ФОИ мы называем группировку атомов, непосредственно соединенную с фосфором и отщепляющуюся при фосфорилировании ХЭ.

Очень важное значение имеет положение ониевого атома в молекуле ФОИ. Наибольший эффект достигается, если атом, несущий положительный заряд, находится в отщепляемой части молекулы ФОИ на таком же расстоянии от атома фосфора, на каком находится четвертичный атом азота от карбонильного углерода в АХ^{8, 24, 25}.

Необходимо отметить, что при введении катионной группы в молекулу ФОИ не только появляется возможность ионного взаимодействия, но, благодаря индуктивному влиянию, существенно возрастает и электрофильная фосфорилирующая способность. Оба эти эффекта экспериментально трудно разделимы^{24, 26, 28}.

Электрофильная реакционная способность ФОИ и их способность взаимодействовать с анионным участком фермента представляют собой те два свойства ингибиторов, которые широко обсуждались в многочисленных работах, посвященных связи структуры ФОИ с их действием.

Однако, как будет показано ниже, возможности взаимодействия ФОИ с активной поверхностью ХЭ этим не исчерпываются.

Можно полагать, что во взаимодействии катионной «головки» АХ с анионной группой холинэстераз имеет значение не только кулоновское притяжение. Существенная роль в этом взаимодействии принадлежит и трем метильным группам, связанным с азотом^{29, 30}. Оказалось, что незаряженное соединение — 3,3-диметилбутилацетат, *трет*.-бутильная группа которого стерически имитирует триметиламмониевую группу АХ, гидролизуетсся холинэстеразой лишь немногим медленнее, чем АХ^{31, 32}. Отсюда можно было предположить, что введение *трет*.-бутильной группы в нужном положении в молекулу ингибитора ХЭ тоже может усилить его взаимодействие с ферментом. Для такого предположения были и некоторые другие основания, например, высокая антихолинэстеразная активность пинаколиловых эфиров алкилфосфоновых кислот^{8, 12}.

Первые результаты исследований по этому вопросу^{33, 34} привели к предположению, что в окружении активного центра холинэстераз имеется несколько гидрофобных участков, с которыми могут взаимодействовать алкильные радикалы как субстратов, так и ингибиторов⁵.

Представление о «гидрофобном взаимодействии» в настоящее время широко используется в энзимологии. На примерах различных ферментов, таких как пепсин, химотрипсин, трипсин, карбоксипептидаза и др. показано, что скорость ферментативного гидролиза субстратов существенно зависит от величины входящих в их состав углеводородных радикалов, способных сорбироваться на гидрофобных участках каталитического центра фермента^{35–39}.

Механизм ингибирования холинэстераз с этой точки зрения ранее не рассматривался. Настоящая статья посвящена изложению результатов систематического изучения «топографии» гидрофобных участков, расположенных на активной поверхности холинэстеразы лошадиной сыворотки и ацетилхолинэстеразы бычьих эритроцитов.

II. МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

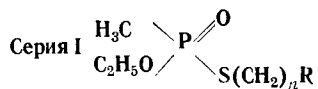
Ферменты. При исследовании использован препарат холинэстеразы из сыворотки крови лошади (БуХЭ, КФ 3.1.1.8), производимый в Институте им. И. И. Мечникова, который имел 60-кратную степень очистки и характеризовался удельной активностью 1,2—1,6 мкмоль АХ/мин на 1 мг белка при 25°, рН 7,5 и концентрации субстрата 0,02 М.

Источником ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ, 3.1.1.7) служила тщательно отмытая от гемоглобина и лиофильно высушенная строма бычьих эритроцитов^{40, 41}.

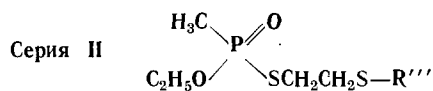
Препараты ФОИ, представляющие собой тиольные производные метилтиофосфоновой кислоты, и некоторые их физико-химические константы представлены в табл. 1. Общий способ получения О-этил-S-алкил-метилтиофосфонатов и О-этил-S-(ω-фенил-

ТАБЛИЦА 1

Обозначения и константы ФОИ

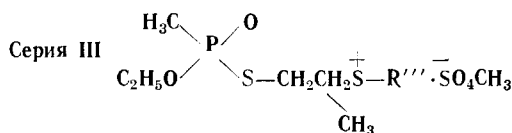


№ Номер	R	n	Т. кип. °C/мм	n_D^{20}	d_4^{20}
1	2	3	4	5	6
1	CH ₃	1	62—64/1	1,4760	1,0969
2	CH ₃	2	85—86/2,5	1,4820	1,0712
3	CH ₃	3	100—102/2	1,4810	1,0530
4	CH ₃	4	108—110/3	1,4678	1,0306
5	CH ₃	5	105—106/1	1,4712	1,0178
6	CH ₃	6	124—126/2,5	1,4650	1,0040
7	CH ₃	7	155—156/5	1,4690	0,9957
8	CH ₃	8	142—144/2	1,4702	0,9841
9	CH ₃	9	152—153/2	1,4705	0,9725
10	(CH ₃) ₃ C	1	78—80/2	1,4640	1,0262
11	(CH ₃) ₃ C	2	76—77/1	1,4746	1,0120
12	(CH ₃) ₃ C	3	84—85/1	1,4710	1,0015
13	(CH ₃) ₃ C	4	124—126/2	1,4700	0,9896
14	(CH ₃) ₃ C	5	126—128/1,5	1,4670	0,9811
15	(CH ₃) ₃ C	6	134—136/2	1,4700	0,9723
16	(CH ₃) ₂ CH	1	120—121/2,5	1,4770	1,0610
17	(CH ₃) ₂ CH	2	73—74/1	1,4710	1,0394
18	(CH ₃) ₂ CH	3	84—85/1	1,4768	1,0270
19	(CH ₃) ₂ CH	4	126—127/1	1,4698	1,0010
20	(CH ₃) ₂ CH	6	132—134/1	1,4705	0,9862
21	C ₆ H ₅	1	135—136/1,5	1,5462	1,1521
22	C ₆ H ₅	2	136/2	1,5398	1,1369
23	C ₆ H ₅	3	150—151/2	1,5346	1,0808
24	C ₆ H ₅	4	137—139/1	1,5300	1,1068

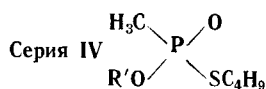


1	2	3	4	5
25	CH ₃	110—112/1,5	1,5211	1,1665
26	C ₂ H ₅	98—99/1	1,5181	1,1429
27	n-C ₄ H ₉	132—133/1	1,5082	1,0963
28	n-C ₆ H ₁₃	137—138/1	1,5037	1,0650
29	n-C ₈ H ₁₇	170—171/1	1,4998	1,0341
30	n-C ₁₀ H ₂₁	192—195/1	1,4880	1,0097

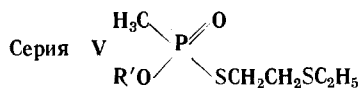
ТАБЛИЦА 1 (продолжение)



1	2	3	4	5
31	CH ₃	—	1,5255	—
32	C ₂ H ₅	—	1,5210	—
33	<i>n</i> -C ₄ H ₉	—	1,5212	—
34	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	—	1,4944	—
35	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	—	1,4898	—
36	<i>n</i> -C ₁₀ H ₂₁	—	1,5002	—

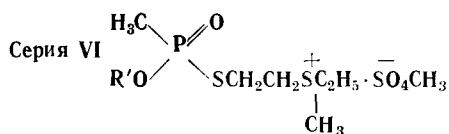


1	2	3	4	5
37	CH ₃	64—65/1	1,4772	1,0825
38	<i>n</i> -C ₃ H ₇	85—86/1	1,4692	1,0280
39	<i>n</i> -C ₄ H ₉	92—93/1,5	1,4675	1,0125
40	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	87/1,5	1,4700	0,9983
41	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	116/2	1,4706	0,9930
42	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	70/2·10 ⁻²	1,4693	0,9783
43	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	95/3·10 ⁻²	1,4697	0,9656
44	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉	110/2·10 ⁻²	1,4690	0,9680
45	<i>n</i> -C ₁₀ H ₂₁	120/2·10 ⁻²	1,4710	0,9643
46	(CH ₃) ₂ CH	79/1,5	1,4703	1,0166
47	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	80/1,5	1,4693	1,0053
48	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂	108/2	1,4693	0,9965
49	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₃	73/3·10 ⁻²	1,4725	0,9929
50	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₄	76/3·10 ⁻²	1,4693	0,9835
51	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₅	92—94/3·10 ⁻²	1,4730	0,9818
52	(CH ₃) ₃ CCH ₂	82—83/2	1,4636	0,9891



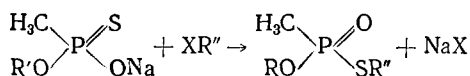
1	2	3	4	5
53	CH ₃	100/1,5	1,5252	1,1728
54	<i>n</i> -C ₃ H ₇	105/2	1,5101	1,1089
55	<i>n</i> -C ₄ H ₉	95—96/3·10 ⁻²	1,5082	1,0960
56	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	104—105/2·10 ⁻²	1,5040	1,0706
57	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	103—104/10 ⁻²	1,4984	1,0493
58	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	120—121/2·10 ⁻²	1,4994	1,0430
59	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	117/10 ⁻³	1,4974	1,0365

ТАБЛИЦА 1 (окончание)

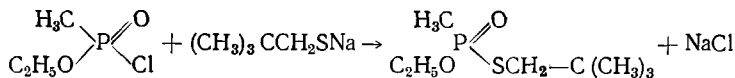


1	2	3	4	5
60	CH ₃	—	1,5201	—
61	<i>n</i> -C ₃ H ₇	—	1,5010	—
62	<i>n</i> -C ₄ H ₉	—	1,5092	—
63	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	—	1,5045	—
64	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	—	1,5044	—
65	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	—	1,4982	—
66	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	—	1,5000	—

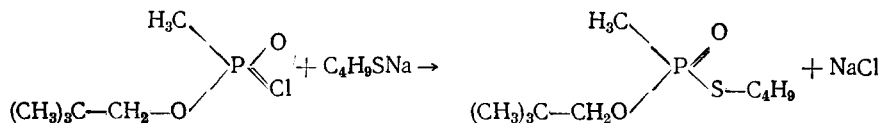
алкил) метилтиофосфонатов (серия I), а также О-алкил-S-*n*-бутил-метилтиофосфонатов (серия IV) состоял в алкилировании О-алкил-метилтиофосфоната натрия соответствующими галондными алкилами или ω-галондфенилалкилами ^{33, 34, 42-44}:



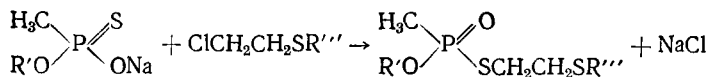
Исключение составляли О-этил-S-(2,2-диметилпропил)-метилтиофосфонат (табл. 1, соед. 1.10), который был синтезирован взаимодействием О-этил-метилхлорфосфоната с 2,2-диметилпропилмеркаптидом натрия ³⁴:



и О-2,2-диметилпропил-S-*n*-бутилметилтиофосфонат (табл. 1, соед. IV. 52), который был получен взаимодействием О-2,2-диметилпропилметилхлорфосфоната с бутилмеркаптидом натрия:



Все О-этил-S-(β-алкилмеркаптоэтил) метилтиофосфонаты (серия II) и О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил) метилтиофосфонаты (серия V) были получены взаимодействием О-алкил-метилтиофосфоната натрия с β-хлорэтил-алкилсульфидом ^{45, 46}:



Далее, соединения серий II и V действием диметилсульфата были превращены в соответствующие метилсульфометилаты:

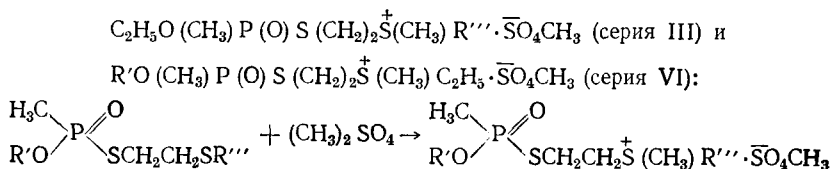
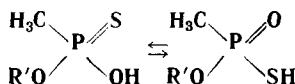


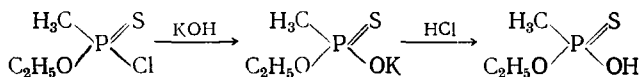
ТАБЛИЦА 2

Константы О-алкил-метилтиофосфонатов:



R'	Т. кип., °C/мм	n_D^{20}	d_4^{20}	pK_a		
				60%-ный спирт	80%-ный спирт Тионная форма	Тиональная форма
CH ₃	98—99/3	1,5062	1,2527	3,27	3,78	3,48
C ₂ H ₅	71—72/1	1,4927	1,1762	3,35	3,92	3,66
n-C ₃ H ₇	92—93/1	1,4874	1,1285	3,42	3,96	3,59
n-C ₄ H ₉	102—103/1	1,4830	1,0991	3,41	3,99	3,43
n-C ₅ H ₁₁	106/2	1,4823	1,0686	3,46	3,99	—
n-C ₆ H ₁₃	110/2	1,4814	1,0498	3,47	4,00	—
n-C ₇ H ₁₅	74/2·10 ⁻²	1,4794	1,0315	3,46	3,97	—
n-C ₈ H ₁₇	84/2·10 ⁻²	1,4790	1,0196	3,46	4,01	—
n-C ₉ H ₁₉	97/2·40 ⁻²	1,4786	1,0087	3,49	4,00	—
n-C ₁₀ H ₂₁	115/2·10 ⁻²	1,4780	0,9983	3,44	4,01	—

О-Алкилметилтиофосфонаты были получены гидролизом О-алкил-метилхлортофосфонатов ⁴⁷:



Некоторые физико-химические константы и pK_a этих веществ приведены в табл. 2.

III. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Оценка антихолинэстеразной активности

Антихолинэстеразную активность ФОИ оценивали по величине константы скорости k_{II} их взаимодействия с ферментом ^{4, 48, 49}.

Фермент (Е) с ингибитором (I) инкубировали в присутствии 0,007 М фосфатного буфера в течение определенного времени (t) в минутах, затем к этой реакционной смеси добавляли АХ. Разбавление реакционной смеси и наличие в ней АХ в концентрации, отвечающей полному насыщению фермента субстратом, создавали условия для прекращения реакции ФОИ с ферментом. Уксусную кислоту, образовавшуюся при гидролизе АХ под действием остаточной концентрации фермента, определяли методом потенциометрического титрования ее 0,1—0,12 N раствором NaOH. По тангенсу угла наклона экспериментальной прямой в координатах «объем раствора щелочи против времени» находили скорость реакции A_t , отвечающей t мин. инкубации Е с I. В части опытов величину A_t находили по изменению в реакционной смеси концентрации АХ, которую определяли по методу Хестрина ⁵⁰.

Поскольку реакцию проводили в стандартных условиях, то определяемые величины A_t были прямо пропорциональны соответствующим концентрациям активных центров фермента $[E]_t$. В соответствии с этим величины $[E]_t$ вычисляли по формуле:

$$[E]_t = [E]_0 A_t / A_0 \quad (1)$$

где A_0 — скорость ферментативной реакции в отсутствие I, но при постоянстве всех других условий $[E]_0$ — начальная концентрация активных центров фермента в реакционной смеси. Величину $[E]_0$ для данного исходного раствора фермента предварительно определяли по методу Берри ^{15, 52} путем частичного фосфорилирования активных центров фермента (от 20 до 80%) высокоактивным ФОИ—Гд-42 (см. табл. 1 и 6, соед. III, 32) известной концентрации при полном израсходовании его в реакции. О конце реакции судили по неизменности A_t от времени инкубации Е с I. Полученные данные использовали для вычисления k_{II} по уравнению:

$$k_{II} = \frac{2,303}{t ([I]_0 - [E]_0)} \lg \frac{[E]_0 ([I]_0 - x)}{[I]_0 ([E]_0 - x)} \quad (2)$$

где $[I]_0$ — исходная концентрация ФОИ в реакционной смеси, а x — убыль концентрации фермента и ФОИ, вычисляемая по разности $[E]_0 - [E]_t$. Эта формула легко преобразуется в другую более удобную для практического использования⁵³:

$$k_{II} = \frac{2,303}{t ([I]_0 - [E]_0)} \lg \left[\frac{A_0}{A_t} \left(1 - \frac{[E]_0}{[I]_0} \right) + \frac{[E]_0}{[I]_0} \right] \quad (3)$$

Концентрация малоактивных ингибиторов в реакционной смеси была всегда во много раз больше концентрации фермента, т. е. $[I]_0 \gg [E]_0$. В этом случае уравнение (2) и (3) принимают вид:

$$k_{II} = \frac{2,303}{t [I]} \lg \frac{A_0}{A_t} \quad (4)$$

Однако для большинства ФОИ величина k_{II} существенно снижается при возрастании t ^{54, 55}.

Приведенные кинетические исследования^{55–57} показали, что такая зависимость k_{II} от t вытекает из общепринятой двухстадийной схемы взаимодействия Е с I:



где EI — фермент-ингибиторный комплекс, аналогичный комплексу Михаэлиса, EI' — фосфорилированный фермент, а Pt — соответствующий тиоспирт, отщепляющийся от ФОИ при фосфорилировании фермента. В связи с этим находили величину k_{II} , отвечающую началу реакции Е с I.

Для некоторых ФОИ величина k_{II} была определена при разных температурах, что позволяло находить энергию активации $E_{акт}$ ингибирования холинэстераз и вычислить предэкспоненциальные множители FZ в уравнении Аррениуса.

2. Определение констант щелочного гидролиза

Для оценки электрофильной реакционной способности ФОИ были определены константы скорости щелочного гидролиза. Водный или водно-спиртовой раствор ФОИ инкубировали при 25° с 2,5-кратным избытком NaOH. Концентрация ФОИ в реакционной смеси $[I]_0$ обычно равнялась 0,01 М, а концентрация щелочи $[B]_0$ 0,025 М. Величина pH к началу реакции была 10,5–10,8. Через определенные интервалы времени отбирали пробы, в которых определяли концентрацию NaOH методом потенциометрического титрования. Величина pH в течение опыта снижалась не более чем на 0,3. Константу скорости гидролиза $k_{ОН}$ рассчитывали по формуле:

$$k_{ОН} = \frac{2,303}{t ([B]_0 - [I]_0)} \lg \frac{[I]_0 ([B]_0 - x)}{[B]_0 ([I]_0 - x)},$$

где x — снижение концентрации NaOH и ФОИ в опыте, определяемое по разности количества щелочи при титровании реакционной смеси в контроле ($t=0$) и в опыте при времени инкубации t .

ФОИ, содержащие в молекуле катионную группу, обладают высокой скоростью гидролиза и величину $k_{ОН}$ для них находили методом непосредственного титрования реакционной смеси при pH 10,5⁵⁸. Поскольку концентрация ионов OH⁻ в этих опытах была постоянной, то $k_{ОН}$ вычисляли по уравнению:

$$k_{ОН} = \frac{2,303}{t [OH]} \lg \frac{[I]_0}{([I]_0 - x)},$$

где x — убыль концентрации ингибитора, определяемая по расходу щелочи на титрование.

Определение pK_a . Для оценки электрофильной реакционной способности некоторых ФОИ были использованы также константы ионизации pK_a соответствующих О-алкил-метилтиофосфонатов.

Все определения pK_a проводили методом измерения pH частично нейтрализованных растворов кислот 30, 50 и 80% нейтрализации (с применением хлорсеребряного электрода при 20°) концентрация кислоты $3,5 \cdot 10^{-3}$ – $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль, л⁻¹. Поскольку ион-

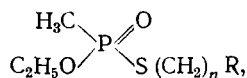
ная сила растворов не превышала 0,01, поправки на активности не вносились. Расчет проводили по формуле:

$$K_a = [H^+] \frac{[Na^+] + [H^+] - \frac{K_w}{[H^+]}}{M - \left\{ [Na^+] + [H^+] - \frac{K_w}{[H^+]} \right\}}$$

В связи с тем, что О-алкил-метилтиофосфонаты могут существовать в двух таутомерных формах (см. табл. 2), были вычислены pK_a для обоих форм по ранее описанному методу⁵⁹. Эти величины характеризуют собой эффективный положительный заряд на атоме фосфора в кислотах, а следовательно, до какой-то степени фосфорилирующую способность соответствующих эфиров. Поскольку pK_a кислот изменяется очень мало при возрастании R от CH_3 до $C_{10}H_{21}$ (см. табл. 2), то можно считать, что и фосфорилирующая способность соответствующих ФОИ практически одинакова. Для других серий ФОИ такой же вывод вытекает из постоянства величин констант щелочного гидролиза внутри каждой серии (см. табл. 3, 5, 6). Таким образом, ФОИ каждой серии выступают в реакции с эстеразным участком холинэстераз как практически одинаковые по силе фосфорилирующие агенты.

А. Влияние структуры углеводородного радикала в отщепляемой части ФОИ на их антихолинэстеразную активность

Первая серия ФОИ, с помощью которых исследовалось влияние гидрофобной сорбции на скорость фосфорилирования фермента, имеет общую формулу:



где R = H, C(CH₃)₃, CH(CH₃)₂, C₆H₅.

Результаты исследования приведены в табл. 3. Из этих данных видно, что константы скорости щелочного гидролиза (k_{OH}), а также и величины энергии активации $E_{акт}$ исследованных соединений с холинэстеразами практически постоянны, в то время как константы скорости ингибирования k_{II} резко отличаются.

В ряду производных нормальных алканов (соед. I.1—I.9) величины k_{II} возрастают с удлинением цепи алкильного радикала для БуХЭ до гексильного производного (I.5), а для АХЭ до октильного производного (I.7). Дальнейшее удлинение алкильной цепи в случае БуХЭ не вызывает существенных изменений k_{II} , а в случае АХЭ приводит даже к заметному снижению этой константы^{33,34} (рис. 1). Таким образом, простое удлинение углеводородного радикала приводит к резкому возрастанию скорости ингибирования для АХЭ — в 170 раз, а для БуХЭ — в 600 раз.

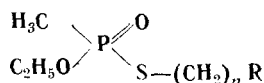
Весьма интересным оказался второй ряд соединений, тиоалкильный радикал которых содержал *трет.*-бутильную группировку на разном расстоянии от атома фосфора (соед. I.10—I.15). Группа C(CH₃)₃ является полным стерическим аналогом группы N(CH₃)₃ молекулы АХ. Первый член этого ряда (I.10) имеет относительно высокую антихолинэстеразную активность. Затем (I.11) следует снижение величины k_{II} . У последующих членов ряда в опытах с БуХЭ (I.12—I.13) наблюдается повышение k_{II} по мере увеличения числа метиленовых групп n , однако при переходе к соединениям I.14 ($n=5$) и I.15 ($n=6$) k_{II} уже изменяется мало (рис. 2).

Для АХЭ наблюдается непрерывный рост k_{II} с увеличением n .

Далее оказалось, что в этом ряду ФОИ имеют значение все три метильных остатка при четвертичном атоме углерода. Замена одного метильного остатка на атом водорода, т. е. замена *трет.*-бутильной группы на изопропильную, вызывает существенное снижение k_{II} , особенно у ФОИ с малым n

ТАБЛИЦА 3

Ингибирующая активность соединений серии I. О-этил-S-алкилметилтиофосфонаты и О-этил-S-(ω-фенилалкил)-метилтиофосфонаты, общей формулы



Серия и номер	R	n	БухЭ			АХЭ			k _{OH} , л/моль, мин
			k _{II} , л/моль, мин	E _{акт} , ккал/моль	pз, л/моль, мин 10 ⁻¹⁰	k _{II} , л/моль, мин	E _{акт} , ккал/моль	pз, л/моль, мин 10 ⁻¹⁰	
I.1	CH ₃	1	6,4·10 ¹	12,0	4	2,2·10 ²	11,0	3	0,15
I.2	CH ₃	2	1,4·10 ²	12,0	12	5,2·10 ²	—	—	0,13
I.3	CH ₃	3	8,2·10 ²	12,5	90	1,2·10 ³	—	—	0,15
I.4	CH ₃	4	2,6·10 ³	12,0	170	2,6·10 ³	—	—	0,13
I.5	CH ₃	5	3,8·10 ⁴	12,5	4100	1,6·10 ⁴	10,8	130	0,12
I.6	CH ₃	6	3,3·10 ⁴	—	—	2,1·10 ⁴	—	—	0,13
I.7	CH ₃	7	4,1·10 ⁴	—	—	3,6·10 ⁴	10,7	260	0,13
I.8	CH ₃	8	3,4·10 ⁴	—	—	3,1·10 ⁴	—	—	0,13
I.9	CH ₃	9	3,8·10 ⁴	—	—	1,6·10 ⁴	—	—	0,13
I.10	C(CH ₃) ₃	1	2,1·10 ⁴	12,5	3470	2,0·10 ⁴	11,0	120	0,10
I.11	C(CH ₃) ₃	2	4,7·10 ³	12,5	510	1,6·10 ³	11,0	16	0,16
I.12	C(CH ₃) ₃	3	1,8·10 ⁴	12,2	1660	2,2·10 ³	—	—	0,13
I.13	C(CH ₃) ₃	4	9,1·10 ⁴	12,0	5870	7,2·10 ³	—	—	0,15
I.14	C(CH ₃) ₃	5	9,0·10 ⁴	—	—	1,1·10 ⁴	—	—	0,12
I.15	C(CH ₃) ₃	6	9,9·10 ⁴	—	—	1,9·10 ⁴	—	—	0,15
I.16	CH(CH ₃) ₂	1	6,7·10 ²	—	—	1,6·10 ³	—	—	0,14
I.17	CH(CH ₃) ₂	2	2,3·10 ³	12,0	150	1,3·10 ³	—	—	0,16
I.18	CH(CH ₃) ₂	3	2,5·10 ³	—	—	8,3·10 ²	—	—	0,13
I.19	CH(CH ₃) ₂	4	5,9·10 ⁴	—	—	9,0·10 ³	—	—	0,16
I.20	CH(CH ₃) ₂	6	9,3·10 ⁴	—	—	2,2·10 ⁴	—	—	0,13
I.21	C ₆ H ₅	1	1,2·10 ⁵	—	—	—	—	—	0,11
I.22	C ₆ H ₅	2	1,4·10 ⁴	—	—	1,2·10 ⁴	—	—	0,14
I.23	C ₆ H ₅	3	8,5·10 ⁴	—	—	1,8·10 ⁴	—	—	0,11
I.24	C ₆ H ₅	4	1,1·10 ⁵	—	—	3,4·10 ⁴	—	—	0,12

соединения (I.16—I.18). Отличительной особенностью соединений данного третьего ряда от соединений второго, является отсутствие падения k_{II} при переходе от первого члена (I.16, n=1) ко второму (I.17, n=2). По характеру зависимости k_{II} от n данный ряд соединений имеет больше сходства с соединениями первого ряда.

В четвертом ряду рассматриваемой первой серии ФОИ (I.21—I.24), к сере присоединена ω-фенилалкильная группа. Здесь обращает на себя внимание большая антихолинэстеразная активность первого члена ряда (I.21, n=1). При переходе ко второму члену (I.22, n=2) имеет место резкое падение величины k_{II}. Дальнейшее увеличение n приводит к повышению значения k_{II}, вплоть до n=4⁴⁴.

Необходимо отметить весьма высокую антихолинэстеразную активность отдельных представителей этой серии ФОИ. Так, соединения I.13, I.14, I.15, I.20, I.21, I.23 и I.24 по скорости ингибирования БухЭ не уступают такому сильному ингибитору, как армин (k_{II}=2·10⁵)⁴⁹.

Полученные данные дают возможность выяснить влияние на величину k_{II} постепенного превращения концевой метильной группировки в трет.-бутильную. Это влияние видно из рассмотрения табл. 4, в которой приведены для соответствующих ФОИ относительные величины k_{II}. Величина k_{II} для пер-

вого соединения каждой из пяти групп ($n=1, n=2, n=3, n=4$ и $n=6$) принята за единицу.

Табл. 4 наглядно показывает, что постепенное «превращение» метильной группы в *трет.*-бутильную во всех случаях, за исключением ингибирования

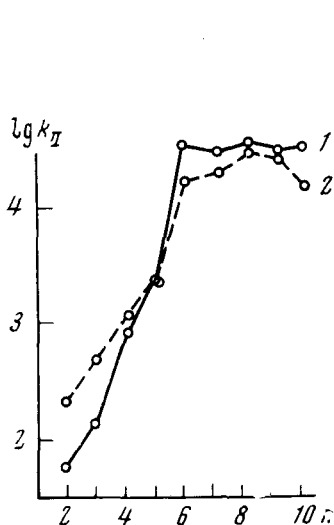


Рис. 1. Зависимость констант скорости ингибирования k_{II} БуХЭ (1) и АХЭ (2) соединениями $C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_nH_{2n+1}$ от длины нормальной алкильной цепи (n).

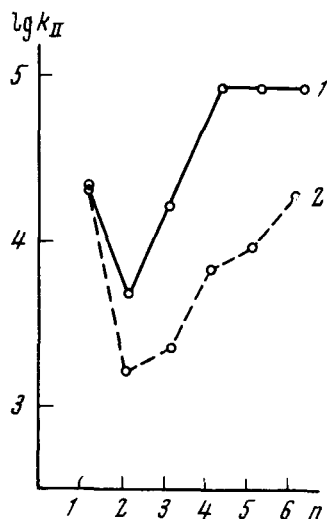
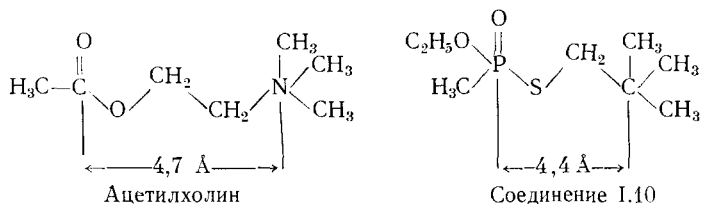


Рис. 2. Зависимость констант скорости ингибирования k_{II} БуХЭ (1) и АХЭ (2) соединениями $C_2H_5O(CH_3)P(O)S(CH_2)_nC(CH_3)_3$ от числа метиленовых групп (n).

АХЭ соединениями при n равном 4 и 6, сопровождается повышением k_{II} . Насколько это повышение специфично, т. е. связано ли оно с наличием именно тетраэдрической *трет.*-бутильной группировки, или оно обусловлено простым «утяжелением» алкильного радикала, видно из сопоставления величин k_{II} для соединений, содержащих *трет.*-бутильную группировку, с величинами k_{II} для соответствующих соединений, имеющих бутильную группу нормального строения. Наибольший эффект *трет.*-бутильной группировки для БуХЭ и АХЭ наблюдался у соединения с $n=1$. У него расстояние между четвертичным атомом углерода и атомом фосфора практически равно расстоянию между четвертичным атомом азота и карбонильным атомом углерода в молекуле АХ:



Характерно, что здесь k_{II} для вещества I.10 примерно в 8 раз больше k_{II} для его изомера I.4. Аналогичный эффект от полного превращения метильной группы в *трет.*-бутильную наблюдался для соединений I.3 ($n=4$) и I.6 ($n=4$) по отношению к БуХЭ. Во всех других случаях изомеры с нормальной алкильной группой имеют большую величину k_{II} , чем соединения с *трет.*-бутильной группировкой.

Из табл. 3 видно, что наблюдаемое увеличение значения k_{II} при удлинении и разветвлении углеводородного радикала ФОИ происходит только за счет изменения вероятностного фактора — предэкспоненциального множителя (pz) уравнения Аррениуса. Величина энергии активации ($E_{акт.}$) практически остается постоянной: для взаимодействия исследованных ФОИ с БУХЭ она составляет 12,0—12,5 ккал/моль, а с АХЭ от 10,7 до 11,0 ккал/моль. В равной мере постоянными оказались и константы скорости неферментативного щелочного гидролиза этих соединений: их величины при pH 10,5 колеблются от 0,13 до 0,15 л/моль. мин.^{33, 34}. Как указывалось выше, эти факты свидетельствуют о том, что электрофильная фосфорилирующая способность ФОИ в данной серии соединений одинакова. Различия между ними определяются различной скоростью их сорбции на мембране, а, следовательно, и различной текущей концентрацией сорбированных и надлежащим образом ориентированных на поверхности фермента молекул ФОИ. Это эквивалентно различиям в скорости образования фермент-ингибиторного комплекса EI, что подтвердил и обстоятельный кинетический анализ^{56, 57}.

Поскольку реакция протекает в воде, то возрастание сорбции молекул ФОИ при утяжелении их S-алкильных радикалов может быть связано только с наличием на поверхности фермента гидрофобных участков: гидрофильная среда—вода, вытесняет углеводородные радикалы ФОИ на эти гидрофобные участки фермента и тем самым обеспечивает более полную сорбцию их. Такого рода участки полипептидной цепи фермента могут формироваться остатками лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина.

Очевидно, один из таких гидрофобных участков, адаптированный к сорбции триметиламмониевой группы АХ, обрамляет анионный участок активного центра фермента. Не исключена возможность, что именно на этом гидрофобном участке сорбируется трет.-бутильная группировка соединения I.10, у которого расстояние между этой группировкой и атомом фосфора близко расстоянию между эстеразным и анионным участками фермента. В связи с этим, следует еще раз отметить более высокую величину k_{II} для соединения I.10 по сравнению с k_{II} для его изомера I.4.

Ближайший гомолог вещества I.10 — вещество I.11 ($R = \text{трет.-C}_4\text{H}_9$, $n=2$) характеризуется константой k_{II} в 3,5 раза меньшей. Расстояние

ТАБЛИЦА 4

Изменение ингибирующей активности соединений $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{O})\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{R}$ в процессе изменения радикала R от метильного до трет.-бутильного при разном n
(составлена по данным табл. 1)

Соединение	n	R	k_{II} (относительные величины)	
			БУХЭ	АХЭ
I.1	1	CH_3	1	1
I.2	1	CH_2CH_3	2	2
I.16	1	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	10	7
I.10	1	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	330	90
I.4	1	C_4H_9	40	12
I.2	2	CH_3	1	1
I.3	2	CH_2CH_3	6	2
I.17	2	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	17	2
I.11	2	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	34	3
I.5	2	C_4H_9	275	30
I.3	3	CH_3	1	1
I.4	3	CH_2CH_3	3	2
I.18	3	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	3	1
I.12	3	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	22	2
I.6	3	C_4H_9	40	18
I.4	4	CH_3	1	1
I.5	4	CH_2CH_3	15	6
I.19	4	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	23	3
I.13	4	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	35	3
I.7	4	C_4H_9	16	14
I.6	6	CH_3	1	1
I.7	6	CH_2CH_3	1	1,5
I.20	6	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	3	2
I.15	6	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	3	1
I.9	6	C_4H_9	1	0,7

между атомом фосфора и третичным атомом углерода в нем (5,3 Å) несколько больше оптимального (4,7 Å), и метильные группы, сорбируясь на гидрофобном окружении анионного участка, препятствуют точной ориентации электрофильного атома фосфора по отношению к гидроксильной группе эстеразного участка фермента. Отсюда резкое снижение вероятностного фактора p_z (в 6 раз для БУХЭ и в 8 раз для АХЭ).

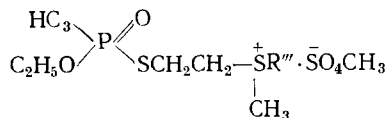
Однако при дальнейшем увеличении n в этом ряду снова наблюдается рост k_{II} (до $n=4$ для БУХЭ и до $n=6$ для АХЭ). Скорость образования фермент-ингибиторного комплекса становится больше. Видимо, на поверхности фермента есть еще один гидрофобный участок аналогичного типа, отделенный от первого гидрофильными звеньями. У БУХЭ он бесспорно комплементарен *трет.*-бутильной группе, что видно из данных табл. 4 (группы с $n=4$ и $n=6$). У АХЭ этого нет, и здесь за исключением первого соединения ($n=1$), во всех случаях, изомерные соединения с нормальными алкильными радикалами оказываются активнее соединений с *трет.*-бутильным радикалом, а у ФОИ, где $n=6$, активность вообще мало зависит от структуры концевой группы. Изопропильные производные (табл. 3) повторяют нормальный ряд с тем лишь различием, что эти соединения достигают второго гидрофобного участка фермента, начиная с $n=4$ (соед. I.19). Это соответствует по длине цепи $n=6$ в ряду нормальных алкильных производных.

Фенилалкильные производные, содержащие на конце цепи объемистую фенильную группу, повторяют закономерности изменения k_{II} в ряду с *трет.*-бутильной группой.

Хотя по отношению к АХЭ эти закономерности выражены менее резко, однако повышение величины k_{II} с возрастанием длины углеводородного радикала у соединений первого и второго рядов (табл. 3) дает основание говорить о том, что и у АХЭ вблизи анионного участка также имеется гидрофобная область, хотя ее роль менее выражена по сравнению с ролью гидрофобного участка, обрамляющего анионный.

Необходимо отметить, что близкая зависимость между скоростью ингибирования АХЭ и структурой углеводородных радикалов у производных диэтокситиофосфорной кислоты была получена О'Брайном и Браха⁶⁰. Их работы подтвердили приведенные выше выводы о существовании гидрофобных участков в районе анионного пункта фермента.

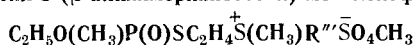
Чтобы убедиться в том, что вторая гидрофобная область и у БУХЭ и у АХЭ находится именно за анионным пунктом, были исследованы соединения серии II и III. Особый интерес представляют соединения серии типа III:



с положительно заряженным атомом серы, который должен точно фиксироваться на анионном участке фермента. Если гипотеза о существовании и расположении указанной гидрофобной области верна, то при увеличении углеводородного радикала R''' должен наблюдаться рост ингибирующей активности и у этих соединений. Как показывают данные табл. 5 и рис. 3, величины k_{II} действительно возрастают с увеличением R''' , особенно в реакциях с БУХЭ. Соединение III.36 активнее соединения III.31 по отношению к БУХЭ в 180 раз, а по отношению к АХЭ в 7,3 раза. В связи с этим с увеличением R''' происходит заметное выравнивание величин k_{II} для этих ферментов. Если первые соединения III.31 и III.32 ингибируют АХЭ в 60—70 раз быстрее, чем БУХЭ, то последнее соединение III.36 только в 2,2 раза^{46, 61} (табл. 6).

ТАБЛИЦА 5

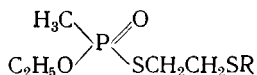
Ингибирующая активность соединений серии III метилсульфометилаты
О-этил-S-(β-алкилмеркаптоэтил) метилтиофосфонатов



Серия и номер	R'''	k_{II} л/моль·мин		k_{II} АХЭ k_{II} БУХЭ	k_{OH} л/моль·мин
		БУХЭ	АХЭ		
III.31	CH ₃	$1,0 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^7$	55,0	17,0
III.31	C ₂ H ₅	$3,7 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^8$	67,5	17,0
III.33	n-C ₄ H ₉	$1,1 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^8$	20,0	20,0
III.34	n-C ₆ H ₁₃	$8,9 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^9$	12,4	21,4
III.35	n-C ₈ H ₁₇	$1,0 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^8$	4,6	25,0
III.36	n-C ₁₀ H ₂₁	$1,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	2,2	19,0

При всем этом существенно, что и в этом ряду соединений константы скорости неферментативного щелочного гидролиза колеблются в очень узких пределах 16,0—22,0 л/моль·мин., поэтому можно и здесь говорить о постоянстве электрофильной реакционной способности ФОИ.

Аналогичная зависимость k_{II} от R имеет место и у соединений с незаряженным атомом серы (серия II, табл. 6 и рис. 3).



Соединение II.30 ингибирует БУХЭ примерно в 130 раз быстрее, а АХЭ лишь в 5 раз быстрее, чем соединение II. 25. В этом ряду увеличение R приводит не только к выравниванию, но даже к перемене соотношения величины k_{II} для исследованных ферментов: вещество II.25 ингибирует АХЭ в 12,5 раз быстрее, чем БУХЭ, а соединение II.30, наоборот, ингибирует АХЭ в 2 раза медленнее, чем БУХЭ (рис. 3). И здесь скорость щелочного гидролиза для всех веществ практически одинакова.

Таким образом, полученные данные не оставляют никаких сомнений в существовании гидрофобной области за анионным участком. Эта область имеет относительно большую протяженность: причем у БУХЭ на расстоянии 3—5 метиленовых групп от анионного пункта на ней имеется участок, значительно усиливающий сорбцию трет.-бутильной группы.

У АХЭ такой участок менее выражен и, очевидно, в связи с этим гидрофобность ФОИ при ингибировании АХЭ не играет такой большой роли, как при ингибировании БУХЭ.

При определении ингибирующей активности соединений серий II и III были получены дополнительные данные о различной роли анионных пунктов у БУХЭ и АХЭ в сорбции заряженных ФОИ. Отношение k_{II} для

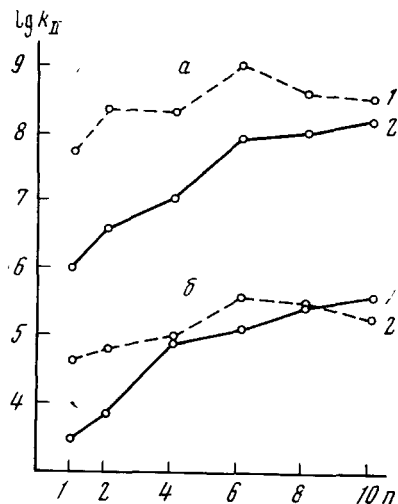


Рис. 3. Зависимость констант скорости ингибирования k_{II} БУХЭ (1) и АХЭ (2) соединениями $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (а) и $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{SC}_n\text{H}_{2n+1}$ (б) от длины нормальной алкильной цепи (n).

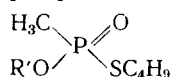
заряженных ФОИ к k_{II} для незаряженных у соответствующих пар соединений для БУХЭ колеблется от 140 до 680, а для АХЭ от 1400 до 4200 (табл. 7).

Таким образом, в сорбции ФОИ ферментами анионный участок играет большую роль у АХЭ, чем у БУХЭ, а гидрофобное окружение анионного участка, наоборот, имеет большее значение у БУХЭ.

Б. Влияние структуры углеводородного радикала в неотщепляемой части ФОИ на их антихолинэстеразную активность

Три следующие серии (IV, V и VI) соединений были синтезированы с целью выяснения гидрофобного окружения эстеразного участка фермента.

В первую очередь была изучена реакционная способность ряда О-*n*-алкил-S-*n*-бутилметилтиофосфонатов:

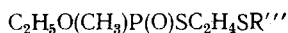


(серия IV, табл. 8), где R' представляет собой *n*-алкильные группы с длиной цепи от 1 до 10 углеродных атомов ^{47, 62, 63}. Как упоминалось выше, фосфорилирующая способность этих соединений практически одинакова.

Из табл. 8 видно, что антихолинэстеразная активность исследованных соединений существенно зависит от длины О-алкильного радикала. В случаях БУХЭ постепенное удлинение этого радикала до гептильного

ТАБЛИЦА 6

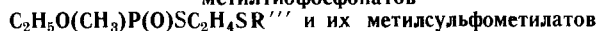
Ингибирующая активность соединений серии II. О-этил-S-(3-алкилмеркаптоэтил) метилтиофосфонаты



Серия и номер	R'''	k_{II} л/моль, мин		k_{II} АХЭ k_{II} БУХЭ	k_{OH} л/моль, мин
		БУХЭ	АХЭ		
II.25	CH ₃	$3,2 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^4$	12,5	0,29
II.26	C ₂ H ₅	$6,8 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^4$	8,8	0,28
II.27	<i>n</i> -C ₄ H ₉	$7,8 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$	1,2	0,31
II.28	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	$1,3 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	3,1	0,28
II.29	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	$3,0 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$	1,1	0,29
II.30	<i>n</i> -C ₁₀ H ₂₁	$4,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	0,5	0,27

ТАБЛИЦА 7

Сравнительная оценка ингибирующей активности О-этил-S-(3-алкилмеркаптоэтил) метилтиофосфонатов



R		CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	C ₆ H ₁₃	C ₈ H ₁₇	C ₁₀ H ₂₁
Отношение k_{II} заряженного ФОИ к k_{II} незаряженного ФОИ	БухЭ	320	550	140	680	330	450
	АХЭ	1370	4200	2440	2750	1400	2000

ТАБЛИЦА 8

**Ингибирующая активность соединений серии IV. О-*n*-алкил-S-*n*-бутилметил-
тиофосфонаты:
 $R'O(CH_2)_nP(O)SC_4H_9$**

Серия и номер	R'	k_{11} , л/моль·мин		Серия и номер	R'	k_{11} , л/моль·мин	
		БуХЭ	АХЭ			БуХЭ	АХЭ
IV.37	CH ₃	$5,8 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^2$	IV.41	C ₆ H ₁₃	$5,0 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^3$
I.3	C ₂ H ₅	$5,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$	IV.42	C ₇ H ₁₅	$1,1 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^3$
IV.38	C ₃ H ₇	$4,5 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$	IV.43	C ₈ H ₁₇	$3,6 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^3$
IV.39	C ₄ H ₉	$1,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	IV.44	C ₉ H ₁₉	$7,0 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^3$
IV.40	C ₅ H ₁₁	$1,6 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^3$	IV.45	C ₁₀ H ₂₁	$6,2 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^3$

приводит к увеличению константы скорости ингибирования. Гептильное производное оказалось очень мощным ингибитором БуХЭ и по силе антихолинэстеразного действия в 18 000 раз превышало метильное производное. Дальнейшее удлинение радикалов сопровождается некоторым снижением величины k_{11} .

Иной характер зависимости от строения наблюдается при взаимодействии ФОИ этого ряда с АХЭ. Возрастание антихолинэстеразной активности происходит только при удлинении радикала до бутильного (бутильное производное в 50 раз эффективнее метильного).

У ФОИ, содержащих более длинные алкильные группы (от пентильного до децильного) антихолинэстеразная активность несколько ниже и колеблется в узких пределах. Изменение антихолинэстеразной активности в этом ряду определяется, как и в предыдущих сериях, главным образом изменением способности ФОИ к образованию фермент-ингибиторного комплекса за счет сорбции углеводородных радикалов алкоксильных групп на гидрофобных участках активной поверхности фермента.

Найденные в этой серии опытов закономерности напоминают те, которые были описаны выше при исследовании ряда О-этил-S-*n*-алкилметилтиофосфонатов (см. табл. 3), но отличаются от них в важных деталях.

Сравнением действия обоих рядов ФОИ на БуХЭ установлено, что при изменении длины алкоксильного радикала максимальный эффект наблюдается у гептильного производного, а при изменении длины алктиольного радикала — у гексильного. Учитывая, что в первом случае углеводородный радикал связан с атомом фосфора через атом кислорода, а во втором — через атом серы, можно считать, что максимум антихолинэстеразной активности этих двух рядов соединений соответствует одинаковой длине алкоксильных или алктиольных радикалов.

Этот факт может иметь два объяснения. Первое — это допущение, что гидрофобные участки, расположенные за анионным и за эстеразным участками активного центра фермента, находятся на равном расстоянии от этих пунктов. Второе — признание того, что сорбция алкоксильных и алктиольных группировок происходит на одном и том же участке поверхности фермента.

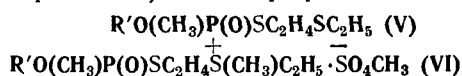
Последнее предположение сразу отпадает в отношении АХЭ. В ряду О-этил-S-*n*-алкилметилтиофосфонатов максимальное действие на АХЭ (так же как и на БуХЭ) достигается, начиная с гексильного производного (см. табл. 3), тогда как в ряду О-алкил-S-*n*-бутилметилтиофосфонатов им обладает бутильное (см. табл. 8).

Для получения дополнительной информации о локализации гидрофобных участков холинэстеразы, с которыми может взаимодействовать алкоксильная группа и, в частности, для решения вопроса о том, могут ли эти радикалы сорбироваться в районе анионного участка фермента, была предпринята специальная серия опытов, состоящая в исследовании антихолинэстеразного действия двух рядов ФОИ⁶² О-*n*-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил) метилтиофосфонатов (серия V) и соответствующих метилсульфометилатов (серия VI). При выборе этих ФОИ исходили из того, что реакция холинэстеразы с ФОИ типа VI, содержащими сульфониновую серу, должна протекать при обязательном взаимодействии оние-вой группы с анионным участком. В этих условиях алкоксильная группа лишена возможности сорбироваться на гидрофобных областях, расположенных вблизи анионного центра.

Результаты исследования действия этих двух серий ФОИ на БУХЭ представлены в табл. 9.

ТАБЛИЦА 9

Ингибирующая активность соединений серий V и VI по отношению к БУХЭ.
О-*n*-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил) метилтиофосфонаты и их метилсульфометилаты:



Серия и номер	R'	k_{II} л/моль·мин	Серия и номер	R'	k_{II} л/моль·мин
V.53	CH ₃	$9,6 \cdot 10^2$	VI.60	CH ₃	$7,7 \cdot 10^5$
II.26	C ₂ H ₅	$4,4 \cdot 10^3$	III.32	C ₂ H ₅	$3,8 \cdot 10^6$
V.54	C ₃ H ₇	$5,8 \cdot 10^4$	VI.61	C ₃ H ₇	$3,8 \cdot 10^7$
V.55	C ₄ H ₉	$1,6 \cdot 10^5$	VI.62	C ₄ H ₉	$4,8 \cdot 10^7$
V.56	C ₅ H ₁₁	$1,7 \cdot 10^5$	VI.63	C ₅ H ₁₁	$7,5 \cdot 10^7$
V.57	C ₆ H ₁₃	$3,7 \cdot 10^5$	VI.64	C ₆ H ₁₃	$1,8 \cdot 10^8$
V.58	C ₇ H ₁₅	$2,8 \cdot 10^6$	VI.65	C ₇ H ₁₅	$2,5 \cdot 10^8$
V.59	C ₈ H ₁₇	$1,1 \cdot 10^6$	VI.66	C ₈ H ₁₇	$2,8 \cdot 10^8$

Как видно из табл. 9, при удлинении радикала алкоксильной группы в ряду ФОИ типа V происходит значительное возрастание величин k_{II} . Максимальное значение k_{II} отмечено у гептильного производного (в 2900 раз выше, чем у метильного производного). При переходе к октильному производному происходит некоторое снижение величины k_{II} . В ряду ФОИ типа VI тоже наблюдается возрастание антихолинэстеразного эффекта с удлинением радикала в алкоксильной группировке. Сравнение этих рядов ингибиторов показывает, что все метилсульфометилаты имеют k_{II} на 2—3 порядка выше, чем их незаряженные аналоги.

Можно с уверенностью считать, что наблюдающаяся во всех случаях большая антихолинэстеразная активность метилсульфометилатов зависит от взаимодействия сульфонинового заряда с анионным участком БУХЭ и связанного с этим в частности ориентирующего эффекта. В связи с этим можно полагать, что и увеличение антихолинэстеразной активности по мере удлинения углеводородного радикала в алкоксильной группировке также является следствием ориентирующего влияния, вызываемого сорбцией этого радикала на подходящем гидрофобном участке БУХЭ.

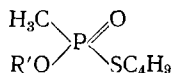
Так как анионный центр БУХЭ в случае ФОИ серии VI занят группировкой, содержащей сульфониновую серу, то можно сделать вывод, что

гидрофобный участок активной поверхности БУХЭ, на котором сорбируется алкоксильная группа, находится вне анионного участка фермента. По всей вероятности, и у незаряженных ФОИ алкоксильная группа сорбируется на том же гидрофобном участке холинэстеразы. Это заключение вытекает из рассмотрения рис. 4, на котором показана зависимость $\lg k_{II}$ от числа углеродных атомов в алкоксильной группе для ФОИ серий IV, V, VI.

Из рис. 4 видно, что кривые действия на БУХЭ для ингибиторов всех трех серий имеют совершенно симбатный ход, совпадающий даже в деталях (крутой подъем при увеличении n от 1 до 3, перегиб в области $n=3-5$ и снова более крутой подъем при увеличении n до 7). Такое совпадение можно объяснить только тем, что радикалы алкоксильных групп ФОИ всех трех серий взаимодействуют с одним и тем же гидрофобным участком БУХЭ. Общая протяженность и расположение этого участка, по-видимому, стерически соответствуют гептильному радикалу. Однако ступенеобразный ход кривых может служить указанием на то, что на самом деле здесь имеются два гидрофобных участка, разделенных какой-то гидрофильной группой.

Из рис. 4 видно также, что характер действия одного и того же ряда ФОИ на БУХЭ и АХЭ (кривые 1 и 2) существенно отличаются. Если до $n=4$ угнетение обоих ферментов протекает практически одинаково, то дальнейшее удлинение радикала, приводящее к значительному росту эффективности в отношении БУХЭ, совершенно не влияет на способность ФОИ ингибировать АХЭ. Мы склонны объяснить это различие тем, что в области эстеразного центра АХЭ имеет не два, а только один гидрофобный участок, пространственно соответствующий бутильному радикалу.

Для более полной характеристики пространственной конфигурации гидрофобных участков, расположенных в районе эстеразного центра холинэстераз, было изучено действие на холинэстеразы соединений, содержащих в алкоксильной группе разветвленный радикал⁶⁴ (соед. IV.46—IV.51).



где $\text{R}' = (\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_n$.

Из табл. 10 видно, что с удлинением углеводородного радикала антихолинэстеразное действие соединений по отношению к БУХЭ возрастает до изогептильного производного, а по отношению к АХЭ до изогексильного. Дальнейшее удлинение радикала приводит к уменьшению величины k_{II} , причем для БУХЭ это уменьшение незначительно (приблизительно в 2 раза). Тогда как в случае АХЭ при переходе от изогексильного к изогептильному производному k_{II} уменьшается в 46 раз. Кроме того,

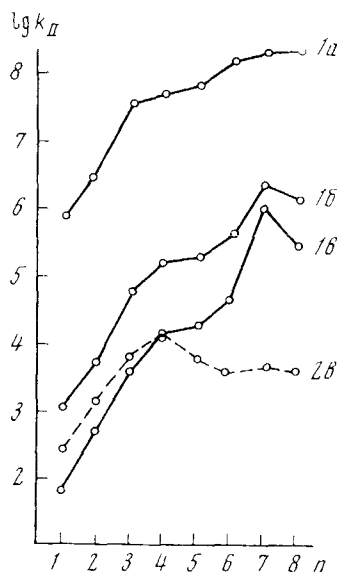


Рис. 4. Зависимость констант скорости ингибирования k_{II} БУХЭ (1) и АХЭ (2) соединениями $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{O}(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{SR}$ от длины нормальной алкильной цепи (n): а. $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_4\text{S}$ (CH_3) C_2H_5 ; б. $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_5$; в. $\text{R} = \text{C}_4\text{H}_9 = n$.

можно отметить, что первые члены исследованного ряда соединений до изогексильного обладают более высокой активностью по отношению к АХЭ, чем к БУХЭ.

Выше было показано, что удлинение алкоксильного радикала в ряду О-*n*-алкил-S-бутилметилтиофосфонатов не вызывает существенного из-

ТАБЛИЦА 10

Ингибирующая активность соединений серии IV. О-изоалкил-S-бутилметилтиофосфонаты: $R'O(CH_2)_nP(O)SC_4H_9$

Серия и номер	$R'=(CH_2)_2CH(CH_2)_n$ <i>n</i>	k_{II} л/моль·мин	
		БУХЭ	АХЭ
IV.46	0	$4,5 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^3$
IV.47	1	$4,4 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$
IV.48	2	$3,4 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^4$
IV.49	3	$3,9 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$
IV.50	4	$6,5 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^3$
IV.51	5	$3,1 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10$

менения электрофильной реакционной способности атома фосфора этих соединений. Можно думать, что и в ряду О-*i*-алкил-производных длина радикала не будет оказывать существенного влияния на величину эффективного положительного заряда на атоме фосфора. Значит, и для этого ряда фактором, определяющим антихолинэстеразную активность, должно быть гидрофобное взаимодействие изоалкильного радикала с гидрофобными участками на поверхности холинэстеразы.

Поскольку есть все основания полагать, что углеводородные радика-

лы *i*-алкильных и *n*-алкильных производных взаимодействуют с одними и теми же участками фермента, представляет интерес сопоставить действие обоих рядов соединений друг с другом. Такое сопоставление сдела-

но на рис. 5. На этом рисунке изоалкильные производные представлены как соединения, имеющие изопропильный радикал, расположенный на разном расстоянии от атома фосфора (кривая б), а ряд ФОИ с нормальным алкоксильным радикалом — как соединения, имеющие на таком же расстоянии этильную группу (кривая а). Таким образом, в каждой точке сравниваются соединения, имеющие одинаковую длину нормальной углеродной цепочки. В случае БУХЭ (рис. 5) можно отметить, что вначале (при $n=0$ и 1) разветвление радикала не дает никакого эффекта. При $n=2-3$, т. е. в области перегиба кривой изосоединения оказываются несколько более эффективными, а при дальнейшем удлинении радикала изо-группировка не только не повышает антихолинэстеразной активности, но становится серьезной помехой при взаимодействии ФОИ с ферментом: k_{II} — у изо-соединения с $n=5$ в 34 раза ниже, чем у соответствующего нормального алкильного производного.

При взаимодействии с АХЭ (рис. 5) разветвление радикала вначале заметно усиливает антихолинэстеразный эффект. Особенно выраженным становится вклад изогруппы при $n=3$, k_{II} этого соединения в 63 раза больше константы соответствующего ФОИ с радикалом нормального строения. Дальнейшее отодвигание изопропильного радикала от атома фосфора препятствует взаимодействию ФОИ с АХЭ: величина k_{II} уменьшается в 46 раз и приближается к значениям констант ФОИ нор-

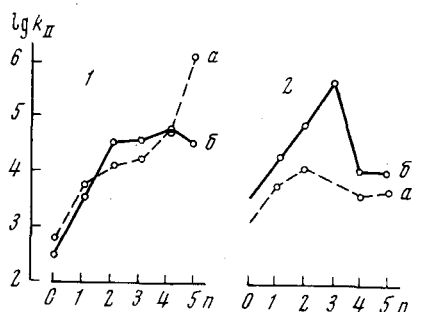


Рис. 5 Зависимость констант скорости ингибирования (k_{II}) БУХЭ (1) и АХЭ (2) соединениями $C_2H_5(CH_2)_nO(CH_3)P(O)SC_4H_9$ (а) и $(CH_3)_2CH(CH_2)_nO(CH_3)P(O)SC_4H_9$ (б) от числа метиленовых групп (n).

мального ряда. Еще большее удлинение радикала не изменяет антихолинэстеразной активности обоих рядов ФОИ.

Приведенные данные подтверждают и дополняют высказанные выше соображения об особенностях гидрофобных участков в районе эстеразного участка активного центра холинэстераз. По-видимому, у БУХЭ этот участок действительно состоит из двух гидрофобных областей. Обе они, в общем, комплементарны радикалам нормального строения, но первая из них, расположенная ближе к эстеразному участку, ограничена не столь строго и поэтому разветвление углеводородного радикала ФОИ не препятствует его сорбции. Что касается структуры второй (более удаленной) гидрофобной области, то она приспособлена только для сорбции радикала нормального строения.

У АХЭ имеется лишь один гидрофобный участок. По своему строению он существенно отличается от первой гидрофобной области БУХЭ и строго комплементарен изогексильному радикалу (максимум на кривой 2б рис. 4).

Для характеристики конфигурационных особенностей гидрофобных участков в области эстеразного участка холинэстераз представляет интерес еще одно сопоставление.

Выше при обсуждении антихолинэстеразных свойств ФОИ, содержащих разветвленный радикал в алкильной группировке, было отмечено, что введение в эту группу трет.-бутильного радикала существенно повышает способность ФОИ угнетать холинэстеразу (табл. 3).

Был синтезирован ФОИ, содержащий трет.-бутильную группу в алкоксильной части молекулы⁶⁴. Сравнивая его действие с рядом других ФОИ, описанных выше, можно проследить как влияет постепенное построение такой группы на антихолинэстеразные свойства (см. табл. 11).

ТАБЛИЦА 11

Антихолинэстеразная эффективность и скорость щелочного гидролиза (40° ФОИ) типа $RCH_2O(CH_3)P(O)SC_4H_9$

Серия и номер	R	БУХЭ		АХЭ		k_{OH^-} л/моль·мин
		k_{II} , л/моль·мин	относит. велич.	k_{II} , л/моль·мин	относит. велич.	
I.3	CH ₃	5,2·10 ²	1	1,1·10 ³	1	0,145
IV.38	CH ₃ CH ₂	4,5·10 ³	9	5,8·10 ³	5	0,160
IV.47	(CH ₃) ₂ CH	4,4·10 ³	8	1,5·10 ⁴	13	0,146
IV.52	(CH ₃) ₃ C	9,5·10 ²	2	5,9·10 ³	5	0,200
IV.39	n-C ₄ H ₉	1,6·10 ⁴	30	6,8·10 ³	6	—

Для сравнения в этой же таблице приведена антихолинэстеразная активность веществ с R=n-C₄H₉, изомерной трет.-бутильной группе.

Из табл. 11 видно, что степень разветвленности радикала R мало влияет на подвижность Р—S-связи, которую мы оценивали по константе скорости щелочного гидролиза. Следовательно, найденные изменения антихолинэстеразной активности также следует приписать различной способности углеводородных радикалов сорбироваться на активной поверхности фермента.

Рассмотрение данных для БУХЭ еще раз ясно показывает, что гидрофобный участок этого фермента имеет структуру, комплементарную неразветвленному радикалу. Действительно, замена одного атома Н на

CH_3 -группу, при переходе от I.3 к IV.38 (удлинение цепочки нормального строения) повышает активность в 9 раз, замена второго водорода на метильную группу (соед. IV.47), несмотря на общее утяжеление радикала, не дает никакого эффекта, а введение третьей метильной группы (соед. IV.52) приводит к отчетливому снижению активности. В то же время соед. IV.39 в 15 раз более активно, чем изомерное ему, *трет.*-бутильное производное.

В случае АХЭ наиболее эффективным является вещество IV.47, а введение третьей метильной группы снижает активность в 2,5 раза. Соединение нормального ряда с $\text{R}=\text{n-C}_4\text{H}_9$ не имеет никаких преимуществ по сравнению с *трет.*-бутильным производным.

Таким образом, гидрофобный участок АХЭ, в отличие от БуХЭ, наиболее комплементарен изобутильному радикалу. Из сделанного сопоставления можно заключить, что гидрофобные участки в районе эстеразного центра обеих холинэстераз плохо соответствуют тетраэдрической структуре *трет.*-бутильной группировки. Поэтому в изученном ряду соединений введение такой группировки в алкоксильный радикал отчетливо препятствует сорбции ингибитора на активной поверхности.

* * *

Анализ результатов исследований позволяет составить общее представление о расположении гидрофобных участков вблизи активных центров БуХЭ и АХЭ и некоторых особенностях этих участков⁶⁵. Структура

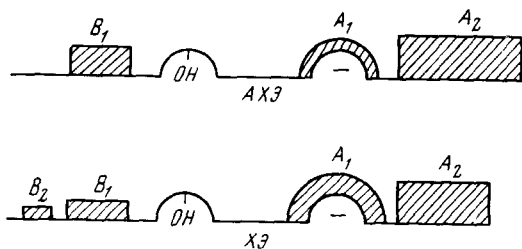


Рис. 6. Топография гидрофобных участков активной поверхности АХЭ и БуХЭ.

гидрофобных областей на активной поверхности холинэстеразы изображена схематически на рис. 6. В районе анионного центра имеются два гидрофобных участка: A_1 —составляющий непосредственное обрамление анионного центра и A_2 , расположенный на некотором расстоянии за ним. Есть основания считать, что у БуХЭ участок A_1 играет относительно большую роль, чем у АХЭ.

Так, по мнению Аугустинсона⁶⁶, при взаимодействии субстратов и ингибиторов с анионным участком в случае БуХЭ наряду с кулоновскими силами большую роль играют силы Ван-дер-Ваальса, тогда как у АХЭ доминируют чисто кулоновские. Участок A_2 тоже неодинаков у разных холинэстераз: у БуХЭ он по протяженности соответствует цепочке из шести атомов углерода, а у АХЭ из восьми. Пространственная конфигурация этого участка у обоих ферментов такова, что он оказывается наиболее комплементарным радикалам, содержащим сильно разветвленную *трет.*-бутильную группировку.

В районе эстеразного центра БуХЭ имеются два гидрофобных участка, разделенных гидрофильной группой. Общая протяженность этой гидрофобной области соответствует цепочке из семи атомов. Оба составляющие ее участка в общем комплементарны радикалам нормального строения, но первый из них — B_1 ограничен не столь строго, и на нем могут сорбироваться также и разветвленные радикалы.

У АХЭ имеется лишь один гидрофобный участок, который по своему строению существенно отличается от участка B_1 у БуХЭ: он строго комплементарен изо-гексильному радикалу.

Важной особенностью пространственной конфигурации участков В₁ обоих ферментов является то, что они совершенно не приспособлены для сорбции радикалов, содержащих *трет.*-бутильную группу.

Таким образом, установлены различия в структуре и протяженности гидрофобных участков, расположенных на активной поверхности БУХЭ и АХЭ. Вполне вероятно, что эти различия в значительной мере определяют разные свойства обеих холинэстераз.

Естественно поставить вопрос: в чем биологическая целесообразность подобного устройства активной поверхности холинэстераз? Зачем нужны обширные гидрофобные области вокруг каталитического центра фермента? Вряд ли гидрофобные участки сформировались в процессе эволюции только как необходимые конструктивные детали. Можно высказать такое предположение: АХ — сильно гидрофильная молекула, способная сорбироваться не только на активном участке холинэстераз, но и на любых других участках полипептидных цепей энзима. Такая сорбция привела бы к замедлению гидролиза АХ. Гидрофобные области препятствуют «паразитной» сорбции АХ, и тем самым увеличивают вероятность его сорбции на активном центре ХЭ. Гидрофобные участки играют роль своеобразных энергетических «холмов», с которых молекула АХ «скатывается» на активный центр фермента. Тем самым увеличивается эффективное сечение активного центра фермента в реакции гидролиза АХ.

В этой связи необходимо затронуть и вопрос о строении активного центра холинорецептора (ХР). Есть очень веские основания предполагать, что и вокруг активного центра ХР тоже имеются гидрофобные участки⁶, причем их должно быть по меньшей мере три: один для метильных групп АХ, другой — за анионным пунктом ХР и третий — за эстерофильным пунктом. В пользу такого предположения свидетельствует огромный фактический материал, накопленный к настоящему времени в области связи между строением и действием веществ, блокирующих ХР. Уже давно было высказано эмпирическое правило «утяжеления» молекулы АХ для получения блокирующих веществ. Действительно, введение в ацетильную часть молекулы АХ фенильных, циклогексильных, больших алкильных радикалов превращает АХ из возбуждающего в блокирующий агент. «Утяжеление» катионной головки дает тот же эффект. Характерно, что по мере «утяжеления» молекулы АХ с любого конца постепенно ослабевает холиномиметическое, возбуждающее действие, а затем появляется и нарастает блокирующее. Это понятно. Для возбуждающего действия важна не только быстрая сорбция, но и легкая десорбция вещества с рецептора^{67, 68}. Замедление десорбции приводит к блокирующему эффекту. Естественно, что введение тяжелых гидрофобных радикалов в молекулу АХ увеличивает взаимодействие с гидрофобными участками в районе активного центра ХР и затрудняет десорбцию.

Естественно предположить, что для действия самого АХ в случае ХЭ, биологическая целесообразность наличия гидрофобных участков состоит в уменьшении «паразитной» сорбции и повышении вероятности соударения молекулы АХ с активным центром ХР.

Возвращаясь к вопросу о холинэстеразах, следует, в заключение, прийти к выводу, что ингибирующая способность ФОИ зависит, по крайней мере, в исследованных нами рядах соединений, а может быть и во многих других, не только от собственной фосфорилирующей способности соединения (электрофильная реакционная способность), но, главным образом, от скорости сорбции, т. е. скорости образования фермент-ингибиторного комплекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Nachmansohn, Chemical and molecular basis of nerve activity, Acad. Press, N. Y., 1959.
2. G. B. Koelle, Cholinesterases and anticholinesterase agents, Handbuch der Exp. Pharmacol., 1963, Bd. 15.
3. С. Н. Голиков, В. И. Розенгарт. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества, «Медицина», Л., 1964.
4. В. А. Яковлев, Кинетика ферментативного катализа, «Наука», М., 1965.
5. М. И. Кабачник, А. П. Бресткин, М. Н. Михельсон, IX Менделеевский съезд, «Наука», 1965.
6. A. P. Brestkin, E. V. Rozengart, Nature, **205**, 388 (1965).
7. R. D. O'Brien, Toxic phosphorus esters, Acad. Press, N. Y., 1960.
8. D. F. Heath, Organophosphorus poisons, Pergamon Press, Oxford, 1961.
9. B. Holmstedt, in Handbuch der Exp. Pharmacol., **15**, 428 (1963).
10. М. И. Кабачник, Вестник АН СССР, **1964**, № 10, 60.
11. J. R. Vocque, Ann. Roy. Soc. Med., Bruxelles, **9**, 161 (1956).
12. Т. Фукуто, в кн. Успехи в области борьбы с вредителями растений, ИЛ, 1960, стр. 157.
13. М. И. Кабачник, Вестник АН СССР, **1968**, № 5, 86.
14. F. Hobbiger, Brit. J. Pharmacol., **9**, 159 (1954).
15. G. B. Koelle, E. C. Steiner, J. Pharmacol., **118**, 420 (1956).
16. L. E. Tammelin, Acta chem. Scand., **11**, 859 (1957).
17. L. E. Tammelin, Svensk. kem. tidskr., **70**, 157 (1958).
18. T. R. Fukuto, R. L. Metcalf, M. J. Maxon, Econ. Entomol., **48**, 347 (1955).
19. Н. Н. Годовиков, Химия и применение фосфорорганических соединений, Изд. АН СССР, М., 1957, стр. 212.
20. И. В. Семенов, Н. К. Фруентов. Тезисы докл. совещ. по проблеме связей между структурой и действием лекарственных веществ, Тарту, 1956, стр. 79.
21. И. В. Семенов, Н. К. Фруентов, в кн. Физиологическая роль ацетилхолина и изыскание лекарственных веществ. Л., 1957, стр. 245.
22. И. В. Семенов, Н. К. Фруентов, Сб. трудов кафедры судебной медицины I ЛМИ, Л., 1958, вып. 2, стр. 183.
23. Э. В. Зеймаль, М. Я. Михельсон, Р. С. Рыболовлев, см. ²¹, стр. 424.
24. Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Л. Г. Магазаник, Т. А. Маштюкова, М. Я. Михельсон, Е. К. Рожкова, Н. К. Фруентов, В. А. Яковлев, Вопросы мед. химии, **7**, 250 (1961).
25. M. J. Michelson, M. I. Kabachnik, V. A. Jakovlev, N. K. Fruentov, N. N. Godovikov, L. G. Magazanik, T. A. Mastrjukova, E. K. Roshkova, R. J. Volkova, Abstr. V Intern. Congr. Bioch., Moscow, 1961.
26. В. А. Яковлев, Р. И. Волкова, ДАН, **146**, 217 (1962).
27. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, Н. Е. Теплов, М. И. Кабачник, ДАН, **163**, 365 (1965).
28. R. J. Kitz, S. Ginsburg, I. B. Wilson, Molec. Pharmacol., **3**, 225 (1967).
29. I. B. Wilson, J. Biol. Chem., **197**, 215 (1952).
30. F. Bergman, R. Segal, Biochem. J., **50**, 652 (1954).
31. D. H. Adams, V. P. Wittaker, Biochem. biophys. acta, **3**, 358 (1949).
32. V. P. Wittaker, Physiol. Revs., **31**, 312 (1951).
33. Н. Н. Годовиков, Е. М. Годына, М. И. Кабачник, М. Я. Михельсон, Е. В. Розенгарт, В. А. Яковлев, ДАН, **151**, 1104 (1963).
34. А. П. Бресткин, Н. Н. Годовиков, Е. И. Годына, М. И. Кабачник, М. Я. Михельсон, Е. В. Розенгарт, В. А. Яковлев, ДАН, **158**, 880 (1964).
35. W. Kauzmann, Adv. Protein Chem., **14**, 37 (1959).
36. J. Tang, Nature, **199**, 1094 (1963).
37. B. N. Hofstee, J. Biochem. biophys. acta, **32**, 182 (1959).
38. B. Baker, Design of Active-Site-Direct Irreversible Enzyme Inhibitors, N. Y., 1967.
39. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Н. Е. Теплов, Биохимия, 1968 (в печати).
40. C. A. Zittle, E. S. Delle Monica, J. H. Custer, Arch. Biochem. biophys., **48**, 43 (1954).
41. Д. Л. Певзнер, Биохимия, **30**, 5 (1965).
42. Е. В. Розенгарт, Е. И. Годына, Н. Н. Годовиков, Изв. АН СССР, сер. хим., **1965**, 1370.
43. А. А. Абдувахабов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Там же, **1968**, 744.
44. А. П. Бресткин, Н. Н. Годовиков, Е. И. Годына, М. И. Кабачник, Е. В. Розенгарт, Изв. АН СССР, сер. хим., **1968**, 2294.
45. М. И. Кабачник, Н. Н. Годовиков, ЖОХ, **33**, 1941 (1963).
46. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Изв. АН СССР, сер. хим., **1968**, 2028.

47. А. А. Абдувахабов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, Химия органических соединений фосфора, «Наука», Л., 1967, стр. 3.
48. W. Aldridge, Biochem. J., **46**, 451 (1950).
49. В. А. Яковлев, Р. И. Волкова, ДАН, **128**, 843 (1959).
50. S. Hestrin, J. Biol. Chem., **180**, 279 (1949).
51. W. K. Berry, Biochem. J., **49**, 615 (1951).
52. И. Л. Брик, В. А. Яковлев, Биохимия, **27**, 993 (1962).
53. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Там же, **32**, 1004 (1967).
54. J. L. Krysan, L. E. Chadwick, Entomol. Expt. et Appl., **5**, 179 (1962).
55. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, А. А. Сагал, ДАН, **167**, 1381 (1966).
56. А. П. Бресткин, Е. В. Розенгарт, Реакционная способность органических соединений, 3, вып. 2 (8), 231 (1966).
57. А. П. Бресткин, И. Л. Брик, Р. И. Волкова, Е. В. Розенгарт, А. А. Сагал, Сб. трудов III конф. Химия и применение фосфорорганических соединений, АН СССР, М., 1970 (в печати).
58. L. Larsson, Acta chem. Scand., **11**, 1131 (1957).
59. M. I. Kabachnik, T. A. Mastrojukova, A. E. Shipov, T. A. Melentjeva, Tetrahedron, **9**, 10 (1960).
60. R. D. O'Brien, P. Bracha, Biochemistry, **7**, 1545, 1555 (1968).
61. А. П. Бресткин, Р. И. Волкова, Т. В. Токарева. Биохимия, 1968 (в печати).
62. А. А. Абдувахабов, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, С. С. Михайлов, В. И. Розенгарт, Р. В. Ситкевич, Изв. АН СССР, сер. хим., **1968**, 744.
63. А. А. Абдувахабов, В. А. Абдеева, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, А. Б. Кацнельсон, С. С. Михайлов, В. И. Розенгарт, Р. В. Ситкевич, Я. С. Смусин, Там же, **1968**, 2033.
64. А. А. Абдувахабов, И. И. Агабекова, Н. Н. Годовиков, М. И. Кабачник, В. И. Розенгарт, Изв. АН СССР, сер. хим., **1970**, 1588.
65. V. I. Rozengart, A. P. Brestkin, N. N. Godovikov, M. I. Kabachnik, S. S. Michailov, M. J. Michelson, E. V. Rozengart, R. V. Sitkevich, Abstr. VII Intern. Congr. Biochem., Tokio, 1967, IV, 817.
66. K. B. Augustinsson, Biochim. biophys. acta, **128**, 351 (1966).
67. W. D. M. Paton, Proc. Roy. Soc., Ser. B, **154**, 954 (1961).
68. W. D. M. Paton, Proc. II Intern. Pharmacol. Meeting, V, 6 (Pharmacology of Smooth Muscle) 71 (1964).

Институт элементоорганических соединений

АН СССР, Москва

1 Ленинградский мед. институт им. И. П. Павлова,

Институт эволюционной физиологии и биохимии

им. И. М. Сеченова АН СССР,

Ленинград