

На правах рукописи



РУДАКОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**О-ФОСФОРИЛИРОВАННЫЕ ЭТИЛТРИФТОРЛАКТАТЫ И
ГЕКСАФТОРИЗОПРОПАНОЛЫ КАК ИНГИБИТОРЫ СЕРИНОВЫХ
ЭСТЕРАЗ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Научный руководитель:

Махаева Галина Файвелевна

кандидат химических наук, заведующая лабораторией молекулярной токсикологии ИФАВ РАН

Официальные оппоненты:

Ротанова Татьяна Васильевна

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Козлов Владимир Андреевич

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фосфорорганических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им.

А.Н. Несмеянова Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 7 » октября 2014 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.102.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, Северный пр., д. 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН (www.ipas.ac.ru).

Автореферат разослан « ___ » _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук

Светлана Васильевна Афанасьева



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Органические производные пентавалентного фосфора (фосфорорганические соединения, ФОС) широко применяются в агрохимической практике и ветеринарии (инсектициды, акарициды, противопаразитные агенты), в промышленности (пластификаторы, компоненты смазочных материалов, антипирены), в качестве лекарственных средств лечения шистосомоза (метрифонат), глаукомы (экотиофат), рака (циклофосфамид), остеопороза (бисфосфонаты). Некоторые высокотоксичные ФОС являются химическими боевыми отравляющими веществами, огромные запасы которых, накопленные в мире (зарин, VX), как и проблемы, связанные с их транспортировкой, уничтожением и переработкой, представляют в настоящее время серьезную экологическую опасность.

Ряд ФОС помимо острого токсического действия, обусловленного ингибированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ) нервных синапсов, может индуцировать синдром «отставленной нейротоксичности, вызываемой фосфорорганическими соединениями» (ОНТФОС). Это дистальные нейропатии, проявляющиеся после 2-3 недельного латентного периода и характеризующиеся дегенерацией длинных аксонов периферической и центральной нервной системы. Высокая чувствительность человека к действию нейропатичных ФОС, наличие длительного скрытого периода между отравлением и клиническими проявлениями ОНТФОС, отсутствие специфических средств лечения и высокий уровень инвалидизации пострадавших делают чрезвычайно важной проблему оценки риска отставленного нейротоксического действия ФОС и ранней диагностики этого заболевания.

В связи с широким применением ФОС и необходимостью создания новых соединений и материалов, которые были бы безопасны для человека и теплокровных, весьма актуальной является задача выяснения механизмов формирования токсических эффектов данного класса соединений.

Фармакологическое применение антихолинэстеразных соединений и потребность в новых эффективных препаратах без опасных побочных эффектов обуславливают необходимость разработки методологии прогнозирования потенциальных биологических эффектов соединений на этапе синтеза и исследований *in vitro*.

Для характеристики эффективности взаимодействия антихолинэстеразных соединений с эстеразами-мишенями *in vitro* в нашей лаборатории предложена концепция «эстеразного профиля» – набора кинетических констант, описывающих ингибиторную активность соединения в отношении эстераз различной функциональной значимости: ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7, АХЭ, острая токсичность, улучшение когнитивных функций); нейротоксичной эстеразы (КФ 3.1.1.5, НТЭ, отставленная нейротоксичность, ОНТФОС), бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8, БХЭ, стехиометрический скэвенджер, улучшение когнитивных функций, модуляция метаболизма лекарств), карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1, КЭ, стехиометрический скэвенджер, модуляция метаболизма лекарств). Анализ эстеразного профиля позволяет получить более полную картину биологической активности соединения и оценить баланс между его терапевтическими свойствами и нейротоксичным потенциалом.

Эстеразы крови, с которыми взаимодействуют ФОС при попадании в организм –

АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ и PON1 (КФ 3.1.8.1, гидролиз и детоксикация ФОС, каталитический скэвенджер), составляют «эстеразный статус» организма, который в значительной степени определяет видовую и индивидуальную чувствительность к антихолинэстеразным соединениям.

В токсикологических и фармакологических исследованиях комплексная оценка химических рисков и потенциальных терапевтических свойств соединений основывается на предположении, что эффект, наблюдаемый на лабораторных животных, будет наблюдаться и у человека. Новые методологии создания лекарственных средств с заданными свойствами, а также этические нормы защиты животных ставят задачу постепенной замены тестов на животных для скрининговых исследований и оценки безопасности химических средств и продуктов на альтернативные модели (ферментные, клеточные, компьютерные и т.д.). Ценность таких моделей заключается не только или не столько в их способности заменить животных, сколько в получении максимально полной информации о потенциальных фармакологических и токсических свойствах соединений до проведения исследований на животных.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование эстеразного профиля ряда О-фосфорилированных этилтрифторлактатов и некоторых представителей родственных соединений – О-фосфорилированных гексафторизопропанолов, и проверка в экспериментах на тканевом уровне (кровь, мозг) и на уровне целого организма прогнозов и выводов, сделанных на основании анализа эстеразного профиля соединений.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

- оценка и анализ эстеразного профиля гомологичных О-фосфорилированных этилтрифторлактатов и выбор соединений для исследования на тканях и на целом организме;
- разработка методов определения АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ и PON1 в цельной крови и сравнительное исследование «эстеразного статуса» человека и грызунов путем определения в крови активностей указанных ферментов;
- исследование НТЭ мозга и крови мышей как биомаркера воздействия нейропатичных ФОС;
- исследование ингибиторной активности фосфорорганических соединений с различным эстеразным профилем в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ на препаратах мозга и крови мышей *in vitro*;
- исследование ингибиторной активности фосфорорганических соединений с различным эстеразным профилем в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ мозга и крови мышей на уровне целого организма при внутривентральном (в/вр) введении.

Научная новизна работы. На примере фосфорорганических соединений впервые показано, что эстеразный профиль ингибиторов холинэстераз в значительной степени определяет их эффекты на тканевом уровне и на уровне целого организма.

Впервые подробно охарактеризован «эстеразный статус» человека и лабораторных животных (мышь и крыса).

Установлено, что НТЭ мозга и крови мышей являются биохимическими маркерами отравления нейрпатичными ФОС. Разработана модель на мышах для биохимической оценки нейрпатичного потенциала ФОС.

Найден новый эффективный и селективный ингибитор карбоксилэстеразы плазмы крови мышей с низкой острой токсичностью.

Практическая значимость работы. Проведенное исследование показывает, что методология анализа эстеразного профиля антихолинэстеразных соединений, учитывающая конкурирующее взаимодействие соединения с несколькими мишенями, позволяет прогнозировать терапевтические и токсические эффекты соединения, и может быть использована в скрининговых исследованиях при создании новых эффективных и безопасных лекарственных средств.

Показана возможность использования стандартных лабораторных животных (мышей) для биохимической оценки нейрпатичного потенциала ФОС вместо дорогостоящих исследований, традиционно проводимых на курах.

Найденный в ходе работы эффективный и селективный ингибитор карбоксилэстеразы крови мышей, обладающий низкой острой токсичностью, может использоваться для стабилизации потенциальных фармакологических агентов, содержащих сложноэфирные или амидные группы, при проведении доклинических исследований на грызунах.

Полученные в настоящей работе данные по «эстеразному статусу» человека и грызунов важны при проведении исследований в области медицины и токсикологии, а также для более корректной экстраполяции экспериментальных результатов с животных на человека и в качестве базовых активностей при биомониторинге.

Личный вклад автора состоял в разработке условий и методов исследования, в планировании экспериментов, в подготовке образцов тканей животных и проведении экспериментальной работы, в обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, анализе литературных источников. Автор принимал активное участие в подготовке к публикации полученных результатов и их апробации на российских и международных научных форумах.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: 11th SAC Seminar “New Trends In Chemical Toxicology”, 22-25 September 2008, Moscow; Society of Toxicology, Annual Meeting, 15-19 March 2009, Baltimore, USA; 12th Medical Chemical Defense Conference, 21-24 April 2009, Munich, Germany; 10th International Meeting on Cholinesterases, 20-25 September 2009, Sibenik, Croatia; VII Всероссийская конференция Химия и медицина «Орхимед-2009», 1-5 июля 2009, Уфа, Россия; 13th International CWD Conference, 24-27 May 2010, Prague, Czech Republic; VIII Всероссийская конференция с международным участием “Химия и медицина”, 6-8 апреля 2010, УФА, Россия; 14th International CWD Conference, 23-26 May 2011, Interlaken, Switzerland; XIX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, 25-30 September 2011, Volgograd, Russia; 15th International CWD Conference, 21-25 May 2012, Glasgow, UK; 11th International Meeting on Cholinesterases, 4-9 June 2012, Kazan, Russia; 9-я Всероссийская конференции "Химия фтора", посвященная 100-летию со дня рождения академика А.В. Фокина, 22-26 октября 2012, Москва; Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013), 8-12 сентября 2013, Москва; 4th National

Congress of Clinical Toxicology with International Participation and Annual Meeting of Bulgarian Toxicological Society, 7-8 November 2013, Sofia, Bulgaria.

Публикации. По материалам исследований опубликовано 38 работ, в том числе 9 статей в международных и отечественных журналах, 3 статьи в материалах конференций, 7 глав в книгах, 18 тезисов докладов международных и российских конференций, получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 255 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения результатов в 5 главах, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 514 ссылок. Работа содержит 58 рисунков и 30 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Фосфорорганические соединения, изученные в данной работе, были синтезированы и предоставлены зав. лаб. синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН к.х.н. Соколовым В.Б. и в.н.с., к.х.н. Аксиненко А.Ю.

Кинетические исследования проводили с использованием коммерческих препаратов ферментов: АХЭ эритроцитов человека, БХЭ сыворотки крови лошади, КЭ печени свиньи (Sigma-Aldrich, США) и стабильного лиофилизованного препарата НТЭ мозга кур (ЛиюНТЭ), полученного по методике, разработанной в нашей лаборатории. Ферменты инкубировали с исследуемыми соединениями в соответствующем рабочем буфере при 25°C для АХЭ, БХЭ, КЭ и при 37°C для НТЭ в течение различных интервалов времени в условиях $[I]_0 \gg [E]_0$. Остаточную активность АХЭ и БХЭ определяли методом Элмана (рН 7.5, $\lambda=412$ нм, субстраты – ацетилтиохолин и бутирилтиохолин, соответственно); активность КЭ определяли с использованием 4-нитрофенилацетата (рН 8.0, $\lambda=405$ нм), остаточную активность НТЭ определяли дифференциальным методом согласно Johnson M.K. (1977), используя фенилвалерат в качестве субстрата (рН 8.0, $\lambda = 510$ нм). Измерения проводили на микропланшетном спектрофотометре BioRad Benchmark Plus (France). Кинетические константы ингибирования вычисляли методом линейной регрессии с использованием программы OriginPro 6.1 (OriginLab Corp., Northampton, MA). Эстеразный профиль соединений анализировали классическим методом QSAR с построением моделей Хэнча.

Исследование ингибирования эстераз *in vitro* в препаратах крови мышей и человека (гемолизат крови 1:100) и в препаратах мозга мышей и кур (9S-фракция гомогената мозга) проводили при 20 минутной инкубации с ингибиторами в диапазоне концентраций от 10^{-11} до 10^{-3} М. Активность АХЭ и БХЭ определяли методом Элмана, как указано выше (для крови $\lambda=436$ нм); измерение активности КЭ проводили с использованием 1-нафтилацетата при 25°C (рН 8.0, $\lambda=322$ нм). Активность НТЭ в препаратах мозга определяли методом Johnson M.K., как указано выше; активность НТЭ в крови – аналогичным способом, но с электрохимической детекцией фенола с использованием тирозиназного биосенсора. Арилэстеразную активность PON1 в крови определяли согласно методу Kitchen B.I. (1973), при 25°C (рН 8.0, $\lambda=270$ нм, субстрат – фенилацетат). Измерения проводили в трипликате на спектрофотометре Gilford-250 (England).

Результаты представлены в виде $\text{mean} \pm \text{SEM}$, которые рассчитывали с использованием программы GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA).

В экспериментах *in vivo* использовали самцов белых аутбредных мышей линии CD1 весом 20-25 г в возрасте 1.5-2 месяцев. При исследовании дозозависимого ингибирования АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ в крови и мозге мышей соединения растворяли в DMSO и вводили животным однократно в/бр 5-10 возрастающих доз в объеме ~ 0.1 мл. Животных забивали через 1 час после введения. Активность ферментов определяли в 9S-фракции гомогената мозга и гемолизате крови (1:100), как описано выше.

Определение острой токсичности соединений выполняли на самцах мышей линии CD1 при в/бр введении: 5-7 доз для каждого соединения, 6-8 животных для каждой дозы, срок наблюдения – 24 часа. Величину LD_{50} вычисляли методом пробит-анализа с использованием программы BioStat 2006 Professional (AnalystSoft).

Результаты и обсуждение

Исследование эстеразного профиля новых фосфорорганических соединений для оценки их биологической активности как потенциальных ингибиторов сериновых эстераз

Целью данного этапа работы являлось получение и анализ эстеразного профиля серии *O,O*-диалкил-*O*-(1-этоксикарбонил-2,2,2-трифторэтил) фосфатов (*O*-фосфорилированных этилтрифторлактатов, TFL) общей формулы $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{OCH}(\text{CF}_3)\text{COOC}_2\text{H}_5$, где $\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, i\text{-C}_3\text{H}_7, n\text{-C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_4\text{H}_9, n\text{-C}_4\text{H}_9, n\text{-C}_5\text{H}_{11}$.

Для получения эстеразного профиля TFL исследована кинетика ингибирования данными соединениями четырех сериновых эстераз – АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ.

Показано, что TFL необратимо ингибируют АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ с типичной для ФОС кинетикой ингибирования: зависимость степени ингибирования эстеразной активности от времени имеет псевдо-первый порядок, а наклоны прямых в полулогарифмических координатах $\lg(V_0/V_t) = f(t)$ в случае АХЭ, БХЭ и КЭ пропорциональны концентрации ингибитора. При ингибировании НТЭ наблюдалось кинетическое проявление образования комплекса Михаэлиса, что позволило определить индивидуальные кинетические константы процесса ингибирования фермента – константы Михаэлиса (K_a, M) и константы фосфорилирования ($k_{+2}, \text{мин}^{-1}$).

Тангенс угла наклона, близкий к 1, в зависимости $\lg K_a(\text{НТЭ})$ от гидрофобности алкильных радикалов (Рис. 1А) подтверждает экстракционный механизм взаимодействия НТЭ с фосфорорганическими ингибиторами. Наблюдается строгая корреляция между ингибиторной активностью TFL в отношении НТЭ ($k_i, M^{-1}\text{мин}^{-1}$) и связыванием соединений в активном центре фермента (K_a, M): $r = 0.998, n = 7, p < 0.0001$ (Рис. 1Б).

Установлено, что константы фосфорилирования ($k_{+2}, \text{мин}^{-1}$) не зависят от структуры соединения и составляют в среднем $(1.92 \pm 0.13) \times 10^{-2} \text{мин}^{-1}$. Таким образом, ингибиторная активность TFL в отношении НТЭ определяется их эффективностью связывания с ферментом. Полученные величины бимолекулярных констант ингибирования всех исследуемых эстераз производными TFL, характеризующие эстеразный профиль соединений, приведены в Табл. 1.

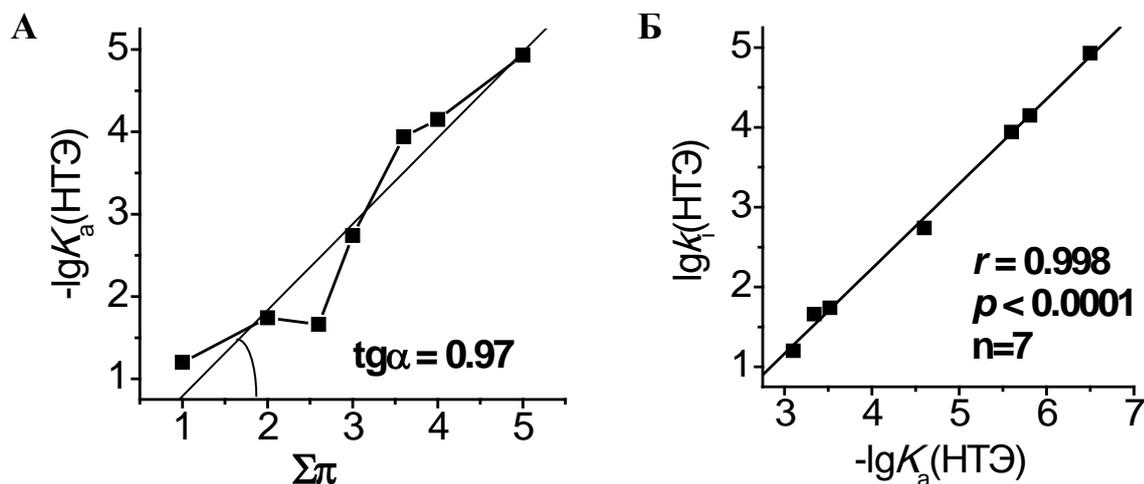


Рис. 1. А - Зависимость константы Михаэлиса (K_a , М) для ингибирования НТЭ под действием TFL от гидрофобности алкильных радикалов; Б - корреляция между константами Михаэлиса (K_a , М) и бимолекулярными константами ингибирования (k_i , $M^{-1}min^{-1}$) для ингибирования НТЭ под действием TFL.

Таблица 1. Ингибиторная активность TFL (k_i , $M^{-1}min^{-1}$) в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ и их ингибиторная селективность в отношении НТЭ по сравнению с АХЭ (RIP); $\Sigma\pi$ - аддитивная гидрофобность алкильных радикалов по Хэнчу ($\pi CH_2=0.5$).

R	$\Sigma\pi$	k_i , $M^{-1}min^{-1}$				RIP = $k_i(HTЭ)/k_i(AXЭ)$
		АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ	
CH_3	1.0	$(4.19 \pm 0.32) \times 10^2$	$(1.58 \pm 0.11) \times 10^1$	$(3.56 \pm 0.22) \times 10^3$	$(2.58 \pm 0.05) \times 10^2$	0.038
C_2H_5	2.0	$(1.19 \pm 0.05) \times 10^3$	$(5.49 \pm 0.47) \times 10^1$	$(1.59 \pm 0.07) \times 10^4$	$(1.47 \pm 0.09) \times 10^3$	0.046
<i>i</i> - C_3H_7	2.6	$(3.33 \pm 0.27) \times 10^2$	$(4.57 \pm 0.06) \times 10^1$	$(9.55 \pm 0.81) \times 10^3$	$(1.92 \pm 0.06) \times 10^3$	0.137
<i>n</i> - C_3H_7	3.0	$(2.14 \pm 0.12) \times 10^3$	$(5.49 \pm 0.41) \times 10^2$	$(5.93 \pm 0.42) \times 10^4$	$(2.05 \pm 0.12) \times 10^4$	0.257
<i>i</i> - C_4H_9	3.6	$(1.15 \pm 0.01) \times 10^4$	$(8.71 \pm 0.09) \times 10^3$	$(3.39 \pm 0.16) \times 10^5$	$(3.49 \pm 0.33) \times 10^5$	0.759
<i>n</i> - C_4H_9	4.0	$(6.56 \pm 0.58) \times 10^3$	$(1.41 \pm 0.11) \times 10^4$	$(2.32 \pm 0.17) \times 10^5$	$(3.79 \pm 0.28) \times 10^5$	2.15
<i>n</i> - C_5H_{11}	5.0	$(2.11 \pm 0.03) \times 10^4$	$(8.51 \pm 0.03) \times 10^4$	$(2.16 \pm 0.03) \times 10^5$	$(8.59 \pm 0.61) \times 10^5$	4.04

На Рис. 2 представлена зависимость изменения эстеразного профиля TFL – их ингибиторной активности в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ с увеличением гидрофобности алкильных радикалов R в фосфорильной части молекулы.

Как следует из Табл. 1 и Рис. 2, ингибиторная активность TFL в отношении всех четырех сериновых гидролаз возрастает с увеличением гидрофобности алкильных радикалов. Стерические препятствия – наличие заместителя в α -положении алкоксильного радикала - снижают ингибиторную способность соединений. Эстеразы-скэвенджеры - БХЭ и КЭ в большинстве случаев ингибируются более эффективно по сравнению с первичными мишенями АХЭ и НТЭ.

Для анализа эстеразного профиля TFL использованы величины их ингибиторной активности в отношении 4-х эстераз (k_i , $M^{-1}min^{-1}$) и величины ингибиторных селективностей, рассчитанные как $S_{X/Y} = k_i(E_X)/k_i(E_Y)$, где X, Y = АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ. В сумме это дает для моделирования 9 параметров, каждый из которых важен для

определенных аспектов результирующего фармакологического профиля ФОС.

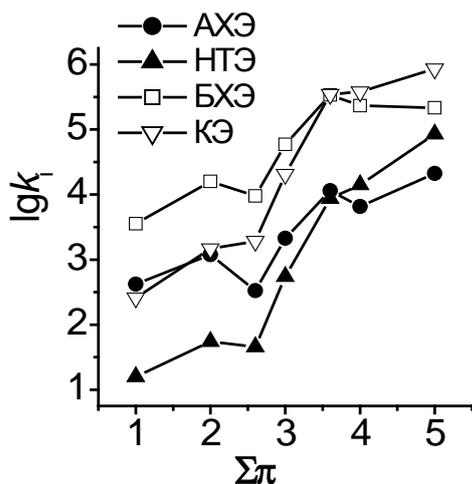


Рис. 2. Изменение эстеразного профиля TFL (ингибиторной активности соединений в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ) с увеличением гидрофобности алкильных радикалов R в фосфорильной части молекулы

Отношения $k_i(\text{БХЭ})/k_i(\text{АХЭ})$ и $k_i(\text{КЭ})/k_i(\text{АХЭ})$ характеризуют селективность соединений в отношении БХЭ и КЭ по сравнению с АХЭ, и, как мы полагаем, могут рассматриваться в качестве характеристики вкладов БХЭ и КЭ как вторичных мишеней-скэвнджеров в формирование острой холинергической токсичности соединения. Аналогично отношения $k_i(\text{БХЭ})/k_i(\text{НТЭ})$ и $k_i(\text{КЭ})/k_i(\text{НТЭ})$ характеризуют потенциальный вклад БХЭ и КЭ в формирование отставленной нейротоксичности.

Отношение $k_i(\text{НТЭ})/k_i(\text{АХЭ}) = \text{RIP}$ (Relative Inhibitor Potency) - относительная ингибиторная активность соединений в отношении ферментов-мишеней отставленной (НТЭ) и острой (АХЭ) нейротоксичности, коррелирует с отношением между LD_{50} и минимальной нейропатичной дозой. Для ФОС, которые в соответствии со своей структурой способны «стареть», RIP используется в качестве индекса, характеризующего нейропатичный потенциал соединения. Величина $\text{RIP} > 1$ указывает на то, что доза, необходимая для инициирования ОНТФОС данным соединением, будет меньше LD_{50} , тогда как при $\text{RIP} < 1$ ОНТФОС может инициироваться при дозах, больших LD_{50} .

Эстеразный профиль исследуемых соединений анализировали методом количественного анализа связи «структура-ингибиторная активность» и «структура-ингибиторная селективность» (QSAR) с построением моделей Хэнча. В качестве физико-химических дескрипторов использовали константы гидрофобности Хэнча ($\pi_{\text{CH}_2} = 0.5$) и стерические константы Чартона (E_s^V) для алкильных и алкоксильных заместителей. Учитывая, что наилучшие уравнения получались в случае стерических констант Чартона для алкоксильных заместителей $E_s^V(\text{RO})$, общий вид полученных уравнений зависимости ингибиторной активности соединений в отношении фермента E_X ($X = \text{АХЭ}, \text{НТЭ}, \text{БХЭ}, \text{КЭ}$) от гидрофобных и стерических свойств заместителей можно представить как $\text{lg}k_i(E_X) = A + B(\Sigma\pi) + C(\Sigma\pi)^2 + D\Sigma E_s^V(\text{RO})$.

Общее уравнение для ингибиторной селективности соединения по отношению к эстеразам E_X и E_Y имеет вид: $\text{lg} S_{X/Y} = A + B(\Sigma\pi) + C(\Sigma\pi)^2$.

Номера, коэффициенты A, B, C, D наилучших уравнений структура-ингибиторная активность/селективность и статистические характеристики моделей представлены в

Табл. 2 (r – коэффициент множественной корреляции, s – стандартное отклонение, F – секвенциальный критерий Фишера и p – уровень значимости критерия Фишера).

Анализ зависимости структура–ингибиторная активность для TFL (уравнения 1-4, Табл. 2) показывает, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль при ингибировании всех исследуемых эстераз, а стерические препятствия снижают ингибиторную способность соединений.

Таблица 2. Модели Хэнча структура-ингибиторная активность и структура-ингибиторная селективность и их статистические характеристики (количество соединений N=7).

№ / Параметр	A	B	C	D	r	s	F	p
1 $\lg k_i(\text{АХЭ})$	2.98±0.54	0.58 ±0.10	0	-1.2±0.55	0.964	0.272	17.14	0.0109
2 $\lg k_i(\text{НТЭ})$	1.05±0.66	1.19±0.12	0	-1.56±0.68	0.981	0.341	52.13	0.0014
3 $\lg k_i(\text{БХЭ})$	2.91±0.63	1.91±0.63	-0.21±0.10	-1.62±0.81	0.962	0.298	12.58	0.033
4 $\lg k_i(\text{КЭ})$	1.44±0.92	2.26±0.93	-0.18±0.14	-1.81±1.19	0.975	0.437	19.48	0.018
5 $\lg S_{\text{НТЭ/АХЭ}}$	-2.24±0.21	0.58±0.06	0	0	0.971	0.207	82.45	0.0003
6 $\lg S_{\text{БХЭ/АХЭ}}$	0.17±0.25	0.81±0.18	-0.13±0.03	0	0.919	0.123	10.80	0.0244
7 $\lg S_{\text{КЭ/АХЭ}}$	-1.35±0.51	1.05±0.37	-0.08±0.06	0	0.962	0.256	24.72	0.0056
8 $\lg S_{\text{БХЭ/НТЭ}}$	2.11±0.22	0.47±0.16	-0.17±0.03	0	0.993	0.109	140.4	0.0002
9 $\lg S_{\text{КЭ/НТЭ}}$	0.59±0.13	0.71±0.09	-0.12±0.02	0	0.975	0.063	37.92	0.0025

Рис. 3А демонстрирует рост ингибиторной селективности TFL в отношении эстераз-скэвэнджеров, БХЭ и особенно КЭ, при увеличении гидрофобности алкильных радикалов по сравнению с ингибиторной активностью в отношении мишени острой токсичности – АХЭ (уравнения 6 и 7 соответственно). Возрастание связывания TFL на токсико-кинетической стадии с эстеразами-скэвэнджерами с увеличением гидрофобности молекулы уменьшает количество соединения, достигающего мишени – АХЭ, снижая таким образом его острую токсичность. Это полностью согласуется с результатами экспериментов по определению острой токсичности (мыши, в/бр, 24 ч): более гидрофобный diBu-TFL вдвое менее токсичен, чем diEt-TFL: $LD_{50} = 1560$ ($1350 \div 1780$) и 720 ($623 \div 817$) мг/кг соответственно.

Селективность TFL в отношении БХЭ и КЭ по сравнению с мишенью отставленной нейротоксичности (НТЭ) описывается уравнениями (8) и (9) соответственно. Из Рис. 3Б видно, что с ростом гидрофобности алкильных радикалов в фосфорильной части молекулы связывание TFL с БХЭ в сравнении с НТЭ существенно снижается, при этом линейно возрастает нейропатичный потенциал соединений (RIP) (уравнение 5). Это означает, что с ростом гидрофобности алкильных радикалов снижается защитная роль эстераз-скэвэнджеров в формировании отставленной нейротоксичности, и соответственно возрастает опасность развития ОНТФОС.

Таким образом, анализ эстеразного профиля показывает различное влияние связывания TFL с неспецифическими эстеразами – КЭ и БХЭ – на формирование острой и отставленной нейротоксичности: с увеличением гидрофобности наблюдается повышение защитного эффекта в отношении острой холинэргической токсичности и снижение

защитного эффекта в отношении способности соединения вызывать ОНТФОС. Согласно полученным данным, TFL с короткими алкильными радикалами ($R = Me, Et$) могут рассматриваться как потенциальные антихолинэстеразные терапевтические средства, у которых отсутствует такой опасный побочный эффект, как способность вызывать ОНТФОС.

Приведенные результаты показывают, что анализ эстеразного профиля ФОС позволяет получить более полную картину их биологических эффектов, тем самым оценить терапевтический потенциал и возможные побочные эффекты исследуемых соединений, а также позволяет получить информацию о механизмах формирования токсичности.

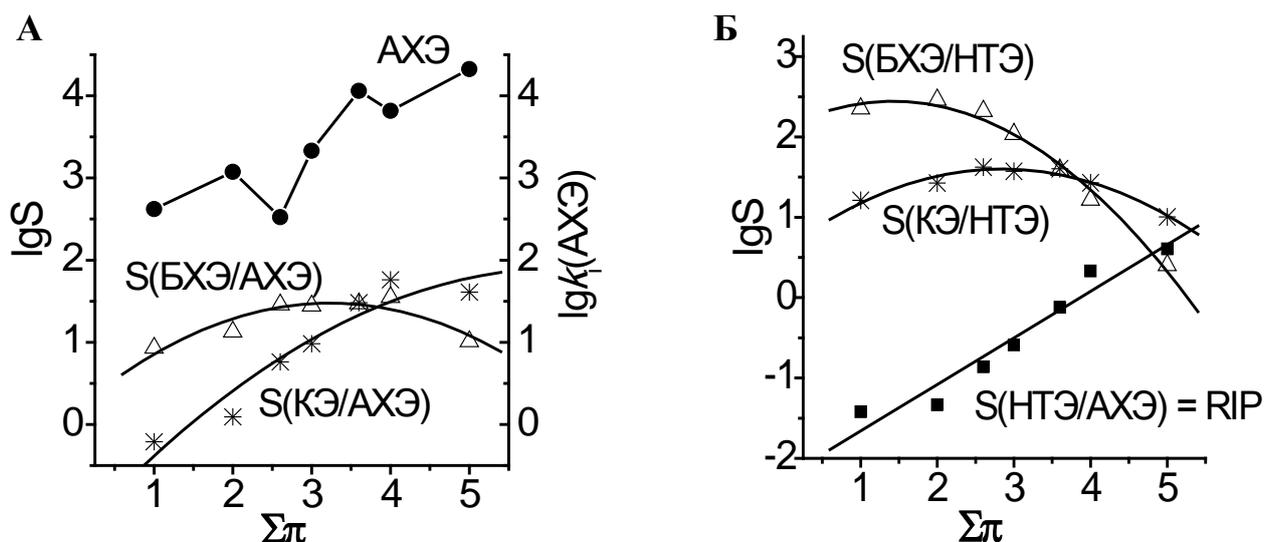


Рис. 3. А - зависимость анти-АХЭ активности TFL и их селективности (S) в отношении КЭ и БХЭ по сравнению с АХЭ от гидрофобности алкильных радикалов ($\Sigma\pi$);
 Б - зависимость нейропатического потенциала TFL и их селективности (S) в отношении КЭ и БХЭ по сравнению с НТЭ от гидрофобности алкильных радикалов ($\Sigma\pi$).

Выбор соединений для исследований на тканях и на целом животном

Мы полагаем, что эстеразный профиль антихолинэстеразного соединения в значительной степени определяет его эффекты на уровне тканей и целого организма. Для проверки этой гипотезы было необходимо исследовать ингибиторную активность ФОС с разным эстеразным профилем в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ на препаратах тканей мышей (кровь и мозг) и на целом животном.

Ранее изученные *O,O*-диалкил-*O*-(1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил) фосфаты (*O*-фосфорилированные гексафторизопропанола, PFP) имеют близкую структуру с TFL и сходный характер зависимостей структура–активность/селективность



($R = CH_3, C_2H_5, i-C_3H_7, n-C_3H_7, i-C_4H_9, n-C_4H_9, n-C_5H_{11}$)

Для исследования на тканях и на целом животном была выбрана пара соединений –

(C₂H₅O)₂P(O)OCH(CF₃)₂ (**diEt-PFP**) и (C₄H₉O)₂P(O)OCH(CF₃)₂ (**diBu-PFP**), которая имеет большие различия в величине нейротоксического потенциала, селективности эстераз-скэвенджер/эстераза-мишень и острой токсичности для мышей по сравнению с аналогичной парой diEt-TFL – diBu-TFL. В качестве маркерного соединения использовали *O,O*-ди-*n*-пропил-*O*-дихлорвинилфосфат (C₃H₇O)₂P(O)OCH=CCl₂ (diPr-DCIVP) – известное нейротоксическое соединение, ранее изученное в нашей лаборатории в экспериментах на курах и крысах.

Мы воспроизвели данные по эстеразному профилю ресинтезированных diEt-PFP и diBu-PFP, охарактеризовали эстеразный профиль diPr-DCIVP (Табл. 3) и оценили острую токсичность всех соединений для мышей (в/бр, 24 ч). Величины ингибиторной селективности исследуемых ФОС в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ, рассчитанные как $S(E_X/E_Y) = k_i(E_X)/k_i(E_Y)$, и величины LD₅₀ приведены в Табл. 4.

Таблица 3. Ингибиторная активность *in vitro* (k_i , М⁻¹мин⁻¹) diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении ферментных препаратов АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ (эстеразный профиль соединений).

Соединение	k_i , М ⁻¹ мин ⁻¹			
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ
diEt-PFP	(1.80±0.11)×10 ³	(1.31±0.08)×10 ²	(4.50±0.19)×10 ³	(1.02±0.04)×10 ⁵
diBu-PFP	(8.44±0.34)×10 ⁴	(5.6±0.18)×10 ⁵	(2.47±0.43)×10 ⁶	(1.09±0.08)×10 ⁷
diPr-DCIVP	(5.97±0.12)×10 ⁵	(2.10±0.16)×10 ⁶	(1.03±0.11)×10 ⁷	(4.7±0.21)×10 ⁷

Таблица 4. Ингибиторная селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ и острая токсичность соединений.

Соединение	Селективность, $S(E_X/E_Y) = k_i(E_X)/k_i(E_Y)$				RIP	LD ₅₀ , мг/кг
	БХЭ/АХЭ	КЭ/АХЭ	БХЭ/НТЭ	КЭ/НТЭ	НТЭ/АХЭ	
diEt-PFP	2.5	56.6	34.6	778.6	0.07	200 (161÷239)
diBu-PFP	29.3	129	4.4	19.5	6.6	>2000
diPr-DCIVP	17.25	78.7	4.9	23.5	3.5	15 (13.4÷17.3)

Как видно из Табл. 4, diEt-PFP имеет очень низкий нейротоксический потенциал (RIP = 0.07), умеренную острую токсичность (LD₅₀ = 200 мг/кг) и проявляет высокую селективность в отношении эстераз-скэвенджеров БХЭ и КЭ по сравнению с НТЭ. В то же время гидрофобный diBu-PFP является потенциально опасным отставленным нейротоксикантом (RIP = 6.6), обладает очень низкой острой токсичностью (LD₅₀>2000 мг/кг) и проявляет высокую селективность в отношении БХЭ и КЭ по сравнению с АХЭ. diPr-DCIVP является наиболее активным ингибитором всех исследуемых эстераз, имеет высокий нейротоксический потенциал (RIP=3.5) и высокую острую токсичность (LD₅₀=15 мг/кг). Для удобства сравнения с результатами экспериментов на препаратах мозга и крови мышей, величины констант ингибирования исследуемых соединений в отношении ферментных препаратов АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ (k_i , М⁻¹мин⁻¹, Табл.3) были пересчитаны на

величины IC_{50} (М) (Табл. 5). Для расчета использовали соотношение: $IC_{50} = (\ln 2)/(k_i \times t)$, где t - фиксированное время инкубации с ингибиторами (20 мин).

Таблица 5. Ингибиторная активность исследуемых соединений в отношении ферментных препаратов АХЭ, НТЭ, БХЭ, КЭ, представленная величинами IC_{50} (эстеразный профиль соединений).

Соединение	IC_{50} , М (время инкубации 20 мин)			
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ
diEt-PFP	$(1.93 \pm 0.16) \times 10^{-5}$	$(2.67 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	$(7.70 \pm 0.49) \times 10^{-6}$	$(3.39 \pm 0.23) \times 10^{-7}$
diBu-PFP	$(4.10 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	$(6.21 \pm 0.31) \times 10^{-8}$	$(1.40 \pm 0.08) \times 10^{-8}$	$(3.18 \pm 0.23) \times 10^{-9}$
diPr-DCIVP	$(5.80 \pm 0.16) \times 10^{-8}$	$(1.65 \pm 0.12) \times 10^{-8}$	$(3.36 \pm 0.22) \times 10^{-9}$	$(7.37 \pm 0.19) \times 10^{-10}$

Исследование активности АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ и PON1 в крови и оценка «эстеразного статуса» человека и грызунов

Определение активностей эстераз проводили в цельной крови, поскольку именно цельная, а не фракционированная кровь является средой, более приближенной к условиям целого организма, т.к. в одной пробе локализованы все указанные ферменты в физиологическом соотношении. В связи с этим был отработан и стандартизован метод пробоподготовки, а также методики определения активности АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ и PON1 в цельной крови. PON1 играет важную роль в детоксикации ФОС и, соответственно, влияет на видовую и индивидуальную чувствительность к этим соединениям.

Определены базовые активности АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ и PON1 в крови человека, крысы и мыши, т.е. охарактеризован «эстеразный статус» данных видов. Установлены существенные различия в «эстеразном статусе» человека и грызунов: у человека значимыми являются активности холинэстераз (АХЭ и БХЭ), активность КЭ незначительна. У грызунов наибольший вклад вносит КЭ, причем максимальная активность КЭ наблюдается у мышей. Во всех случаях была показана высокая арилэстеразная активность PON1 и низкая активность НТЭ (Рис. 4).

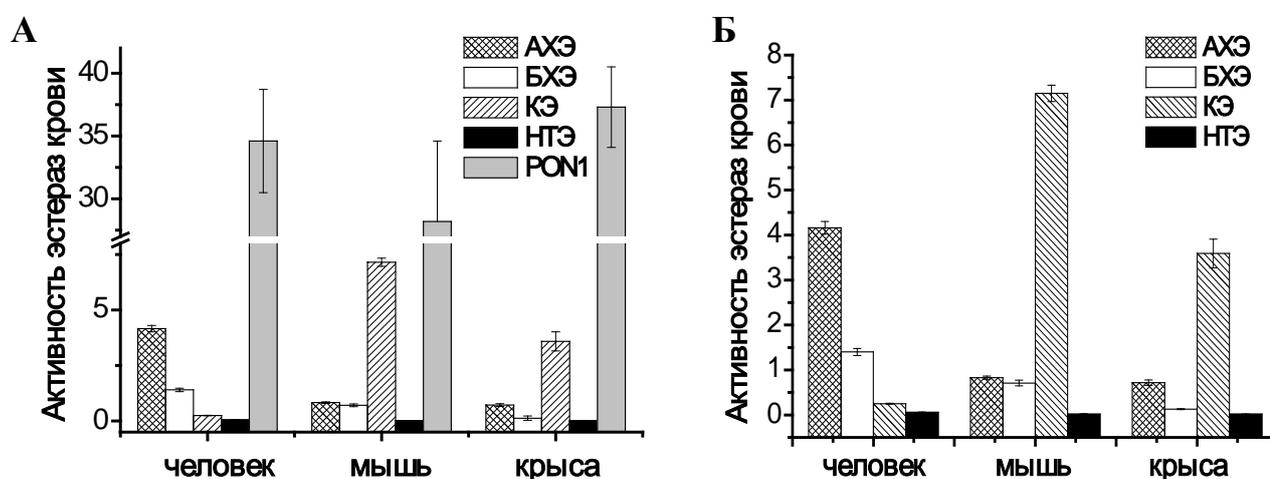


Рис. 4. Активности АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ и PON1 в цельной крови человека (N=6), мыши (N=24) и крысы (N=6) [$\mu\text{кмоль}$ субстрата/(мин \times мл крови)]. **А)** арилэстеразная активность PON1 включена, **Б)** арилэстеразная активность PON1 не включена.

Данные по «эстеразному статусу» человека и грызунов стали основой для проведения наших экспериментов по исследованию эффектов ФОС на тканях и целом организме.

Мыши как модель для биохимической оценки нейропатического потенциала фосфорорганических соединений

Эксперименты по исследованию поведения соединений с различным эстеразным профилем на уровне целого организма мы проводили с использованием мышей линии CD1. Так как мыши являются нестандартным и малочувствительным объектом для изучения ОНТФОС в связи с отсутствием у них клинической картины – атаксии и параличей конечностей, следовало выяснить, насколько НТЭ мозга и крови мышей могут служить биохимическими маркерами воздействия нейропатических ФОС, и показать принципиальную возможность использования мышей в качестве модели для биохимической оценки нейропатической опасности соединений.

Для решения этой задачи проведено сравнительное изучение чувствительности НТЭ и АХЭ мозга мышей и мозга кур - стандартного объекта - к действию нескольких ФОС на препаратах мозга в опытах *in vitro* и на целом животном. Исследовали два известных нейропатических соединения - мипафокс (МХ) и diPr-DCIVP, а также диэтильное и дибутильное производные О-фосфорилированных гесафторизопропанолов (diEt-PFP и diBu-PFP), обладающие по результатам анализа их эстеразного профиля различным нейропатическим потенциалом. diPr-DCIVP, изученный ранее на курах и крысах в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, использовали в качестве маркерного соединения.

Сравнительное исследование чувствительности НТЭ и АХЭ мозга мышей и кур к действию ФОС с различным эстеразным профилем в экспериментах *in vitro*. В опытах *in vitro* на препаратах мозга были определены бимолекулярные константы ингибирования АХЭ и НТЭ мозга мышей и мозга кур соединениями diEt-PFP, diBu-PFP, МХ и diPr-DCIVP (Табл. 6).

Таблица 6. Ингибиторная активность (k_i , $M^{-1}min^{-1}$) и ингибиторная селективность соединений в отношении АХЭ и НТЭ мозга мышей и кур *in vitro*.

Соединение	k_i , $M^{-1}min^{-1}$				RIP	
	мыши		куры		$k_i(НТЭ)/k_i(АХЭ)$	
	АХЭ	НТЭ	АХЭ	НТЭ	мыши	куры
diEt-PFP	$7.22 \pm 0.36 \times 10^2$	$1.22 \pm 0.05 \times 10^2$	$1.11 \pm 0.06 \times 10^3$	$2.50 \pm 0.14 \times 10^2$	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.02
diBu-PFP	$7.12 \pm 0.33 \times 10^4$	$5.11 \pm 0.23 \times 10^5$	$1.80 \pm 0.14 \times 10^5$	$1.27 \pm 0.09 \times 10^6$	7.20 ± 0.46	7.10 ± 0.74
diPr-DCIVP	$3.67 \pm 0.22 \times 10^5$	$1.44 \pm 0.06 \times 10^6$	$3.60 \pm 0.12 \times 10^5$	$1.25 \pm 0.11 \times 10^6$	3.90 ± 0.28	3.47 ± 0.33
МХ	$4.41 \pm 0.28 \times 10^2$	$1.65 \pm 0.08 \times 10^3$	$1.2 \pm 0.07 \times 10^3$	$5.31 \pm 0.5 \times 10^3$	3.74 ± 0.29	4.43 ± 0.49

Результаты показывают, что НТЭ мозга мышей имеет сходную с ферментом кур чувствительность к нейропатическим соединениям. Величины RIP, полученные на препаратах мозга кур и мышей, очень близки (Табл. 6) и отражают одинаковый ряд нейропатической опасности соединений для обоих видов: diEt-PFP << МХ ≤ diPr-DCIVP <

diBu-PFP. Для всех исследуемых соединений показаны четкие корреляции между величинами констант ингибирования АХЭ мозга кур и мозга мышей ($r=0.991$, $p=0.0087$, $N=4$); между величинами констант ингибирования НТЭ мозга кур и мозга мышей ($r=0.993$, $p=0.006$, $N=4$), а также между величинами RIP, полученными на препаратах мозга кур и мозга мышей ($r=0.997$, $p=0.003$, $N=4$).

Таким образом, видовые различия в чувствительности к отставленному нейротоксическому действию ФОС у мышей по сравнению с курами не связаны с различиями в чувствительности фермента-мишени – НТЭ. Это позволяет сделать вывод о возможности использования НТЭ и АХЭ мозга мышей для биохимической оценки нейропатичного потенциала ФОС в экспериментах *in vitro*.

Сравнительное исследование ингибирования НТЭ и АХЭ мозга мышей и кур фосфорорганическими соединениями в экспериментах на целом животном. Для выяснения характера и степени ингибирования ферментов мозга мышей в сравнении с ферментами мозга кур как стандартного объекта для изучения ОНТФОС мы исследовали ингибирование НТЭ и АХЭ в мозге мышей через 1 час после однократного в/бр введения возрастающих доз маркерного соединения - diPr-DCIVP и двух экспериментальных ФОС diEt-PFP и diBu-PFP, обладающих согласно данным *in vitro* разным нейропатичным потенциалом.

Показано, что diPr-DCIVP ингибирует АХЭ и НТЭ мозга мышей дозозависимым образом (Рис. 5А). Величины ED₅₀ (средняя эффективная доза соединения, приводящая к снижению активности фермента на 50%) для ингибирования АХЭ и НТЭ в головном мозге мышей составляли 4.3 ± 0.6 и 2.2 ± 0.4 мг/кг. Для ферментов мозга кур ED₅₀(АХЭ) = 0.79 ± 0.07 мг/кг и ED₅₀(НТЭ) = 0.44 ± 0.01 мг/кг. Несмотря на меньшую чувствительность ферментов мозга мышей *in vivo*, отношение ED₅₀(АХЭ)/ED₅₀(НТЭ), которое является аналогом RIP и характеризует опасность соединения как отставленного нейротоксиканта на уровне целого организма, для обоих видов практически одинаково: 2 для мышей и 1.8 для кур. Следовательно, НТЭ головного мозга мышей является биомаркером воздействия нейропатичных ФОС. Определение НТЭ и АХЭ в мозге мышей через 1 час после в/бр введения ФОС может быть использовано для биохимической оценки нейропатичной опасности соединения.

diEt-PFP (RIP = 0.07) при в/бр введении слабо ингибирует НТЭ и АХЭ мозга: в дозе, соответствующей LD₅₀ (200 мг/кг), активность НТЭ снижена лишь на 10%, активность АХЭ – на 26%. Это означает, что дозы, при которых данное соединение может инициировать ОНТФОС, существенно выше LD₅₀, и соединение не представляет опасности как отставленный нейротоксикант, что согласуется с его эстеразным профилем.

diBu-PFP ингибирует АХЭ и НТЭ мозга мышей дозозависимым образом (Рис. 5Б), при этом ED₅₀(АХЭ) = 516 ± 84 мг/кг и ED₅₀(НТЭ) = 127 ± 8 мг/кг. Отношение ED₅₀(АХЭ)/ED₅₀(НТЭ) = 4.1, что подтверждает высокую нейропатичную опасность данного соединения (RIP = 6.6). Критичное для инициирования ОНТФОС 70-80%-ное снижение активности НТЭ при введении diBu-PFP достигается в дозе 200 мг/кг, что существенно ниже LD₅₀ (>2000 мг/кг). Следовательно, diBu-PFP, имеющий низкую острую токсичность, представляет опасность как отставленный нейротоксикант,

способный вызывать ОНТФОС в дозах, не вызывающих признаков острого холинергического отравления.

Таким образом, эксперименты на целом животном подтверждают прогнозы *in vitro*: diEt-PFP не представляет опасности как отставленный нейротоксикант, тогда как diPr-DCIVP и diBu-PFP являются нейропатичными соединениями. При этом наблюдается тот же ряд нейропатичной опасности соединений, который был получен в опытах *in vitro*: diEt-PFP \ll diPr-DCIVP $<$ diBu-PFP. Полученные результаты позволяют рассматривать НТЭ мозга мышей как достоверный биомаркер отравления нейропатичными ФОС. Соотношение ингибирования НТЭ/АХЭ в мозге мышей при действии ФОС, определяемое через 1 час после в/бр введения ФОС, отражает нейропатичную опасность соединения.

Использование НТЭ крови мышей в качестве биохимического маркера отравления нейропатичными ФОС. Проведено сравнительное исследование ингибирования НТЭ и АХЭ в крови и мозге мышей при однократном в/бр введении возрастающих доз нейропатичных соединений diPr-DCIVP и diBu-PFP. Показано, что ингибирование НТЭ и АХЭ обоими соединениями в крови, как и в мозге, носит дозозависимый характер (Рис.5).

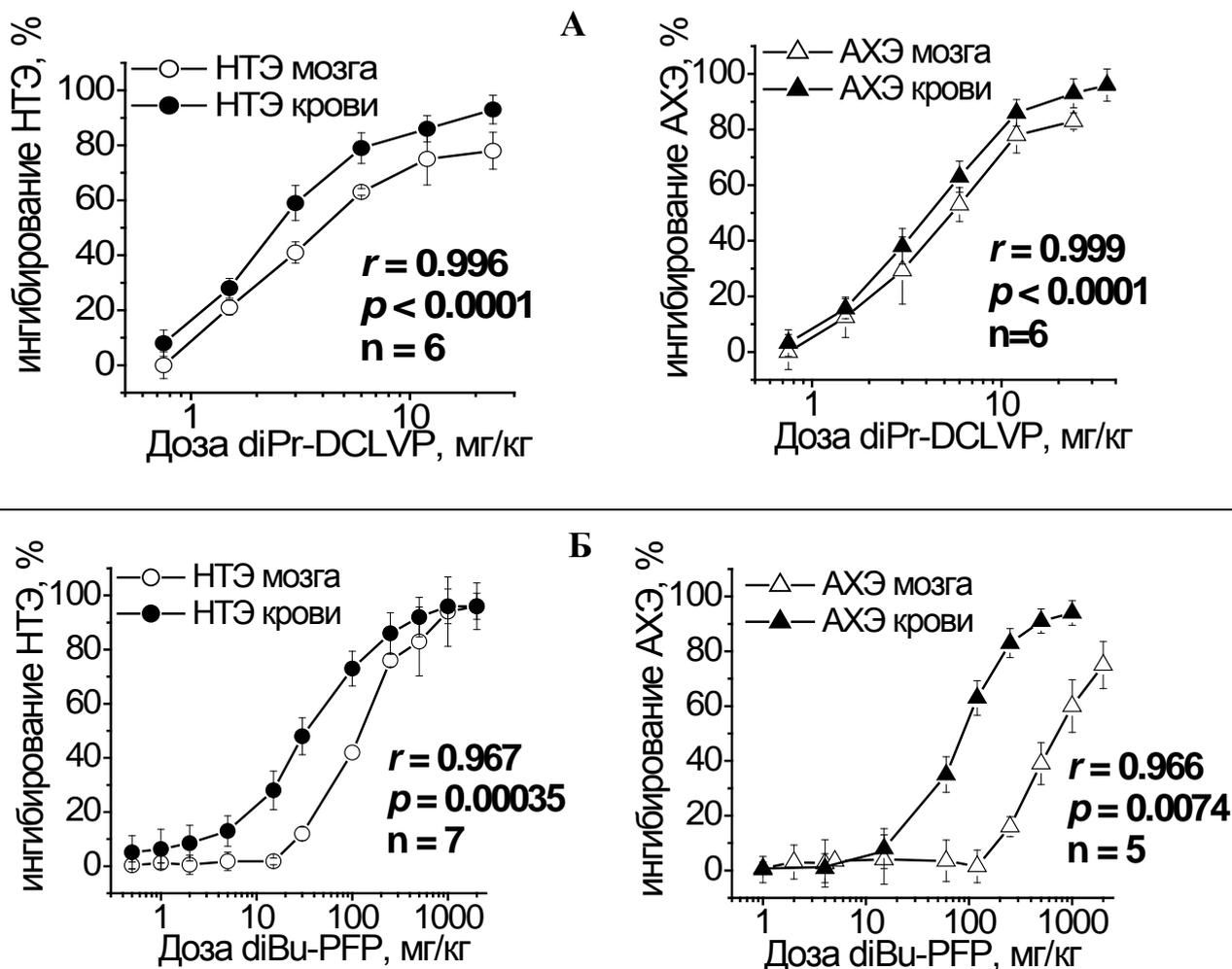


Рис. 5. Дозозависимое ингибирование НТЭ и АХЭ в головном мозге и крови мышей через 1 час после в/бр введения возрастающих доз (А) diPr-DCIVP и (Б) - diBu-PFP (мг/кг). Результаты представлены в виде % ингибирования активности НТЭ и АХЭ у контрольных животных. Активности эстераз у контрольных животных в мозге нмоль/(мин×мг белка): АХЭ = 69.2 ± 3.5 ($N=10$), НТЭ = 13.4 ± 0.52 ($N=8$); в крови нмоль/(мин×мл крови): АХЭ = 829 ± 35 ($N=12$). НТЭ = 18 ± 2 ($N=6$).

В Таблице 7 представлены величины ED₅₀ для ингибирования НТЭ и АХЭ крови и данные по ингибированию ферментов мозга мышей, полученные из анализа дозозависимостей (Рис. 5). Наличие корреляции между степенью ингибирования эстеразмишеней в мозге и в крови (коэффициенты корреляции приведены на Рис. 5) подтверждают, что ингибирование НТЭ и АХЭ в крови мышей в целом отражает изменение активности ферментов в мозге. Величины отношения ED₅₀(АХЭ)/ED₅₀(НТЭ) в мозге и крови совпадают, т.е. соотношение между ингибированием НТЭ и АХЭ в крови характеризует вероятность развития ОНТФОС по сравнению с острой токсичностью.

Полученные результаты позволяют рассматривать НТЭ крови мышей как достоверный биохимический маркер воздействия нейротоксичных ФОС. Одновременное определение активности АХЭ и НТЭ в крови позволяет дифференцировать воздействие острых и отставленных нейротоксикантов.

Таблица 7. Эффективность ингибирования (ED₅₀, мг/кг) АХЭ и НТЭ мозга и крови мышей через 1 час после однократного в/бр введения diPr-DCIVP и diBu-PFP и ингибиторная селективность соединений в отношении НТЭ по сравнению с АХЭ *in vivo*.

Соединение	ED ₅₀ , мг/кг				ED ₅₀ (АХЭ)/ED ₅₀ (НТЭ)	
	мозг		кровь		мозг	кровь
	АХЭ	НТЭ	АХЭ	НТЭ		
diPr-DCIVP	4.3±0.6	2.2±0.4	4.0±0.2	2.0±0.1	2	2
diBu-PFP	516±41	127±8	154±5	36.3±3.6	4.1	4.3

Таким образом, показана возможность использования мышей в качестве адекватной модели для биохимической оценки нейротоксичной опасности ФОС *in vitro* и в эксперименте на целом животном.

Исследование эффектов фосфорорганических соединений с различным эстеразным профилем на препаратах мозга и крови мышей *in vitro*

Ингибиторная активность и селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении эстераз мозга мышей *in vitro*. Проведено титрование активностей АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в 9S фракции гомогената мозга мышей (далее препараты мозга) исследуемыми соединениями. Определены величины IC₅₀ при 20 минутной инкубации с ингибиторами (Табл. 8) и рассчитана ингибиторная селективность соединений в отношении эстераз мозга (Табл. 9).

Таблица 8. Ингибиторная активность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ в препаратах мозга мышей (IC₅₀, М, t = 20 мин).

Соединение	IC ₅₀ , М			
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ
diEt-PFP	(4.83±0.20)×10 ⁻⁵	(2.82±0.15)×10 ⁻⁴	(1.26±0.07)×10 ⁻⁵	(1.81±0.13)×10 ⁻⁵
diBu-PFP	(4.93±0.20)×10 ⁻⁷	(6.75±0.41)×10 ⁻⁸	(2.33±0.11)×10 ⁻⁸	(1.52±0.16)×10 ⁻⁷
diPr-DCIVP	(9.36±0.56)×10 ⁻⁸	(2.41±0.10)×10 ⁻⁸	(5.30±0.26)×10 ⁻⁹	(3.2 ±0.29)×10 ⁻⁸

Таблица 9. Ингибиторная селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ в препаратах мозга мышей: $S(E_X/E_Y) = IC_{50}(E_Y)/IC_{50}(E_X)$.

Селективность (S)					
Соединение	БХЭ/АХЭ	КЭ/АХЭ	БХЭ/НТЭ	КЭ/НТЭ	НТЭ/АХЭ
diEt-PFP	3.8	2.7	22.4	15.7	0.17
diBu-PFP	21.2	3.2	2.9	0.44	7.3
diPr-DCIVP	17.7	2.9	4.9	0.76	3.9

Сравнение эстеразных профилей соединений (Табл. 5) и их ингибиторной активности в отношении эстераз мозга мышей (Табл. 8) показывает, что ингибиторная активность исследуемых ФОС в отношении всех эстераз мозга мышей, за исключением КЭ, соответствует эстеразному профилю соединений. Значительно меньшая ингибиторная активность соединений в отношении КЭ мозга мышей по сравнению с ферментом микросом печени свиньи, используемым в кинетических исследованиях, а также с КЭ печени мыши, может быть связана с наличием тканеспецифичных изоформ этого фермента. Величины ингибиторной селективности diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, БХЭ и НТЭ мозга (Табл. 9) близки соответствующим значениям, рассчитанным из эстеразного профиля соединений (Табл. 4). Селективность в отношении НТЭ по сравнению с АХЭ мозга мышей (Табл. 9) хорошо соответствует величинам RIP и подтверждает ряд нейropaтической опасности соединений (Табл. 4).

Ингибиторная активность и селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении эстераз крови мышей *in vitro*. Проведено титрование активности АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в препаратах крови мышей исследуемыми соединениями, определены величины IC_{50} (M) при 20 минутной инкубации (Табл. 10) и рассчитаны селективности ФОС в отношении указанных эстераз (Табл. 11).

Таблица 10. Ингибиторная активность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в препаратах крови мышей (IC_{50} , M, t = 20 мин).

Соединение	IC_{50} , M			
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ
diEt-PFP	$(8.98 \pm 0.68) \times 10^{-5}$	$(7.93 \pm 0.45) \times 10^{-4}$	$(2.83 \pm 0.18) \times 10^{-5}$	$(1.89 \pm 0.11) \times 10^{-6}$
diBu-PFP	$(1.56 \pm 0.12) \times 10^{-6}$	$(2.28 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	$(1.67 \pm 0.08) \times 10^{-7}$	$(2.4 \pm 0.13) \times 10^{-8}$
diPr-DCIVP	$(1.23 \pm 0.04) \times 10^{-7}$	$(2.54 \pm 0.25) \times 10^{-8}$	$(1.42 \pm 0.19) \times 10^{-8}$	$(2.31 \pm 0.13) \times 10^{-9}$

Таблица 11. Ингибиторная селективность diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ, НТЭ в препаратах крови мышей: $S(E_X/E_Y) = IC_{50}(E_Y)/IC_{50}(E_X)$.

Селективность (S)						
Соединение	БХЭ/АХЭ	КЭ/АХЭ	БХЭ/НТЭ	КЭ/НТЭ	НТЭ/АХЭ	КЭ/БХЭ
diEt-PFP	3.2	47.5	28	420	0.11	15
diBu-PFP	9.34	65	1.4	9.5	6.8	7
diPr-DCIVP	8.7	53.2	1.8	11	4.8	6

Из Таблицы 10 видно, что ингибиторная активность соединений в препаратах крови

мышей в целом ниже показателей их эстеразного профиля (Табл. 5). При этом величины ингибиторной селективности ФОС в отношении эстераз крови (Табл. 11) хорошо соответствуют значениям, рассчитанным из эстеразных профилей данных соединений (Табл. 4), что подтверждают высокие показатели корреляции между этими параметрами: для diEt-PFP $r = 0.999$, $p < 0.0001$; для diBu-PFP $r = 0.938$, $p = 0.0184$; для diPr-DCIVP $r = 0.918$, $p = 0.0279$. Ряд нейropaтичной опасности соединений на препаратах крови мышей, как и на препаратах мозга, соответствует прогнозам эстеразного профиля: diEt-PFP \ll diPr-DCIVP $<$ diBu-PFP.

Таким образом, на препаратах крови мышей diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP проявляют эффекты, соответствующие их эстеразными профилями, как с точки зрения ингибиторной активности в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ, так и с точки зрения ингибиторной селективности.

Исследование эффектов фосфорорганических соединений с различным эстеразным профилем на уровне целого организма

Для оценки соответствия выводов и прогнозов о биологических эффектах ФОС, сделанных на основании анализа их эстеразных профилей, эффектам на уровне целого организма исследовано изменение активности АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ мозга и крови мышей через 1 ч после однократного в/бр введения возрастающих доз трех соединений – diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP. Соединения обладают различным эстеразным профилем, имеют разную острую токсичность и разный нейropaтичный потенциал.

Ингибирование эстераз мозга мышей при внутрибрюшинном введении ФОС. Показано, что diEt-PFP в исследуемом интервале доз, не превышающем LD₅₀, практически не ингибирует НТЭ, слабо ингибирует АХЭ (26 %) и тормозит активность БХЭ на 50%. diBu-PFP и diPr-DCIVP ингибируют АХЭ, БХЭ и НТЭ в мозге мышей дозозависимым образом. Величины ED₅₀ для ингибирования эстераз мозга мышей и ингибиторная селективность соединений *in vivo*, рассчитанная в соответствии с уравнением $S(E_X/E_Y) = ED_{50}(E_Y)/ED_{50}(E_X)$, представлены в Табл.12.

Таблица 12. Ингибиторная активность (ED₅₀, мг/кг) и ингибиторная селективность (S) diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ и БХЭ мозга мышей через 1 час после в/бр введения.

Соединение	ED ₅₀ мг/кг			Селективность (S)	
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	НТЭ/ АХЭ	БХЭ/ АХЭ
diEt-PFP	26%-ное ингибирование*	10 %-ное ингибирование*	50 % -ное ингибирование*	–	–
diBu-PFP	498.3 ± 41.2	121.9 ± 2.7	38.45 ± 5.61	4.1	13
diPr-DCIVP	3.9 ± 0.5	1.9 ± 0.1	1.12±0.27	2.1	3.5

* % ингибирования фермента при введении дозы, равной LD₅₀.

Литературные данные и наши эксперименты показали, что КЭ мозга является тканеспецифичной изоформой фермента и отличается от КЭ крови и печени. В связи с

этим мы не рассматривали ингибирование КЭ в мозге в контексте данного эксперимента.

Из Таблицы 12 видно, что эффективность ингибирования исследуемых эстераз мозга мышцей на уровне целого организма (величины ED₅₀) возрастает в ряду соединений: diEt-PFP < diBu-PFP << diPr-DCIVP, что соответствует их эстеразному профилю (Табл. 5).

В соответствии с эстеразным профилем располагается и ряд чувствительности ферментов мозга к каждому соединению: для diEt-PFP: НТЭ < АХЭ < БХЭ; для diBu-PFP и diPr-DCIVP: АХЭ < НТЭ < БХЭ (Табл. 11).

Получены хорошие корреляции между величинами ингибиторной селективности diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении эстераз мозга *in vivo* (Табл. 12) и селективностью, рассчитанной из эстеразного профиля соединений (Табл.3): для diBu-PFP $r = 0.998$, $p = 0.00425$, $n = 3$; для diPr-DCIVP $r = 0.882$, $p = 0.03126$, $n = 3$.

Таким образом, эффекты соединений в мозге *in vivo* соответствуют их эстеразным профилям (за исключением КЭ): diEt-PFP проявляет избирательную активность в отношении БХЭ в сравнении с АХЭ, он наименее активен в отношении исследуемых эстераз и не является нейротоксичным соединением; diBu-PFP проявляет селективность в отношении БХЭ в сравнении с АХЭ, при этом является опасным отставленным нейротоксикантом; diPr-DCIVP – высокоактивное соединение в отношении всех исследуемых эстераз, эффективно ингибирует АХЭ и НТЭ и обладает высоким нейротоксичным потенциалом.

Ингибирование эстераз крови мышцей при внутрибрюшинном введении ФОС.

Изменение активности эстераз крови через 1 ч после в/бр введения возрастающих доз diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP представлено на Рис. 6. Для diEt-PFP отсутствует значимый ингибиторный эффект в отношении НТЭ крови и наблюдается довольно слабое торможение АХЭ: 30% ингибирования при дозе 200 мг/кг, равной LD₅₀ (Рис.6 А).

Для diBu-PFP и diPr-DCIVP показано дозозависимое ингибирование всех исследуемых эстераз крови мышцей (Рис. 6 Б и В). Величины ED₅₀ для ингибирования АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ и ингибиторная селективность соединений *in vivo*, $S(E_X/E_Y) = ED_{50}(E_Y)/ED_{50}(E_X)$, представлены в Табл.13.

Таблица 13. Ингибиторная активность (ED₅₀, мг/кг) и ингибиторная селективность (S) diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ крови мышцей через 1 час после в/бр введения.

Соединение	ED ₅₀ , мг/кг				Селективность (S)				
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ	КЭ/ АХЭ	БХЭ/ АХЭ	КЭ/ НТЭ	БХЭ/ НТЭ	НТЭ/ АХЭ
diEt-PFP	>200	–	46.8±1.5	25.0 ± 1.0	> 8	> 4	–	–	–
diBu-PFP	154±5	36.3±3.6	25.1±3.6	3.1 ± 0.3	49.7	6.1	11.7	1.44	4.3
diPr-DCIVP	4.0±0.2	2.0±0.1	1.6±0.1	< 0.3	> 15	2.5	> 7	1.25	2.0

Из Табл. 13 видно, что эффективность ингибирования эстераз крови мышцей исследуемыми соединениями на уровне целого организма (величины ED₅₀) располагается в ряду: diEt-PFP < diBu-PFP << diPr-DCIVP, что соответствует эстеразным профилям. В соответствии с эстеразным профилем находится и ряд чувствительности эстераз крови к каждому соединению: для diEt-PFP: НТЭ << АХЭ < БХЭ < КЭ; для diBu-PFP и

diPr-DCIVP: AXЭ < HTЭ ≤ БХЭ < КЭ (Рис. 6).

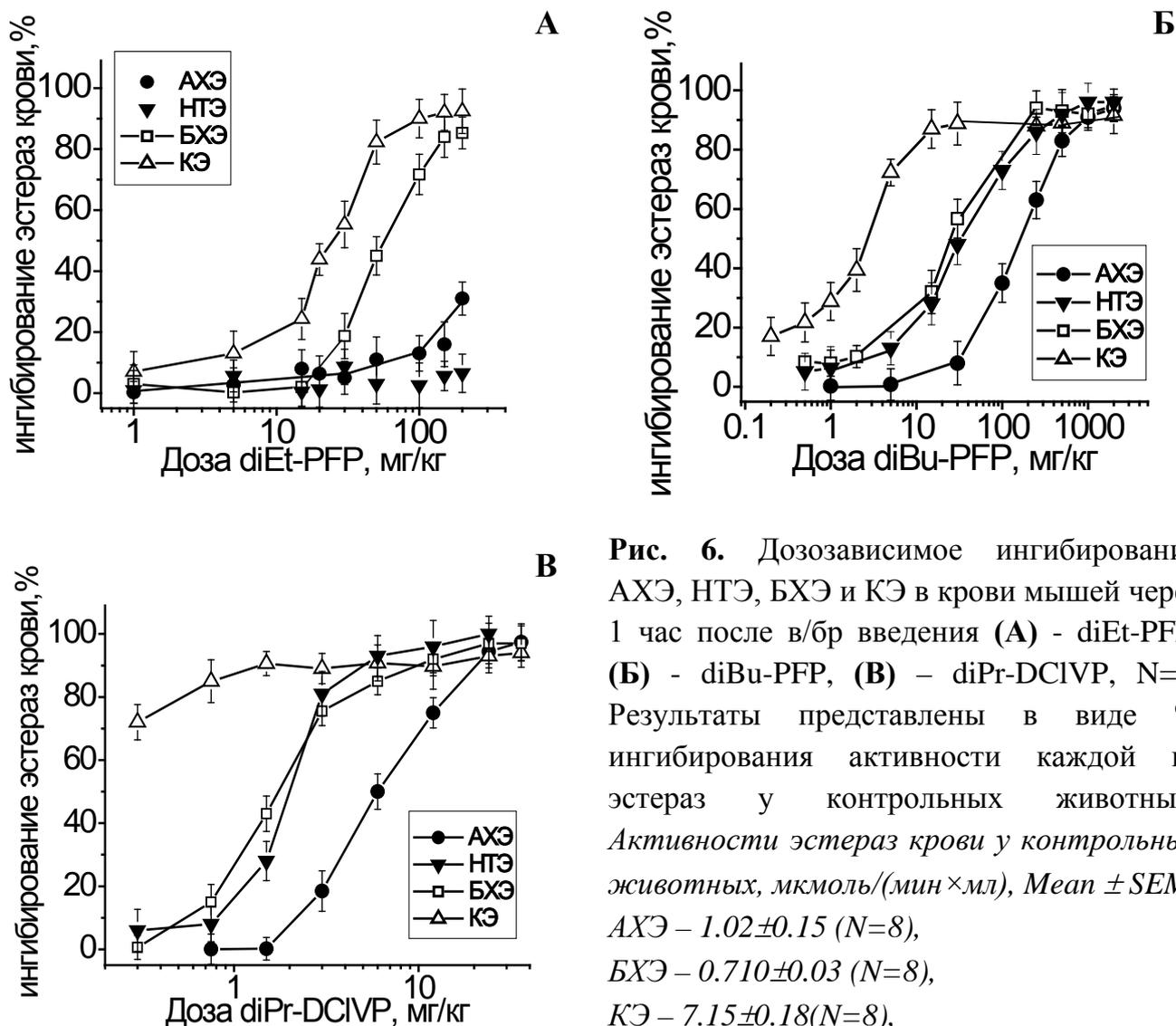


Рис. 6. Дозозависимое ингибирование АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в крови мышей через 1 час после в/бр введения (А) - diEt-PFP, (Б) - diBu-PFP, (В) – diPr-DCIVP, N=6. Результаты представлены в виде % ингибирования активности каждой из эстераз у контрольных животных. Активности эстераз крови у контрольных животных, мкмоль/(мин × мл), Mean ± SEM: АХЭ – 1.02 ± 0.15 (N=8), БХЭ – 0.710 ± 0.03 (N=8), КЭ – 7.15 ± 0.18 (N=8), НТЭ – 0.019 ± 0.002 (N=6).

Наблюдаются хорошие корреляции между величинами ингибиторной селективности diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении эстераз крови мышей *in vivo* и величинами селективности, полученными из анализа эстеразного профиля соединений (Рис. 7).

Таким образом, показано хорошее соответствие ингибиторной активности и селективности diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP в отношении АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в крови мышей на уровне целого организма эстеразному профилю данных соединений.

Вклад эстераз-скэвенджеров в формирование токсических эффектов. Для гидрофобного diBu-PFP наблюдаются высокие величины селективности *in vivo* в отношении эстераз-скэвенджеров по сравнению с АХЭ: $S(КЭ)/S(АХЭ) = 49.7$ и $S(БХЭ)/S(АХЭ) = 6.1$ (Табл. 13), что свидетельствует о высоком защитном эффекте КЭ и БХЭ в отношении формирования острой токсичности и хорошо согласуется с низкой острой токсичностью соединения ($LD_{50} > 2000$ мг/кг). При этом ингибиторная селективность diBu-PFP в отношении КЭ и БХЭ по сравнению с НТЭ, т.е. защитный эффект от ОНТФОС, существенно ниже: $S(КЭ)/S(НТЭ) = 11.7$ и $S(БХЭ)/S(НТЭ) = 1.44$ (Табл. 13). Учитывая высокий нейропатичный потенциал diBu-PFP, можно ожидать

высокой вероятности развития ОНТФОС при отравлении этим соединением.

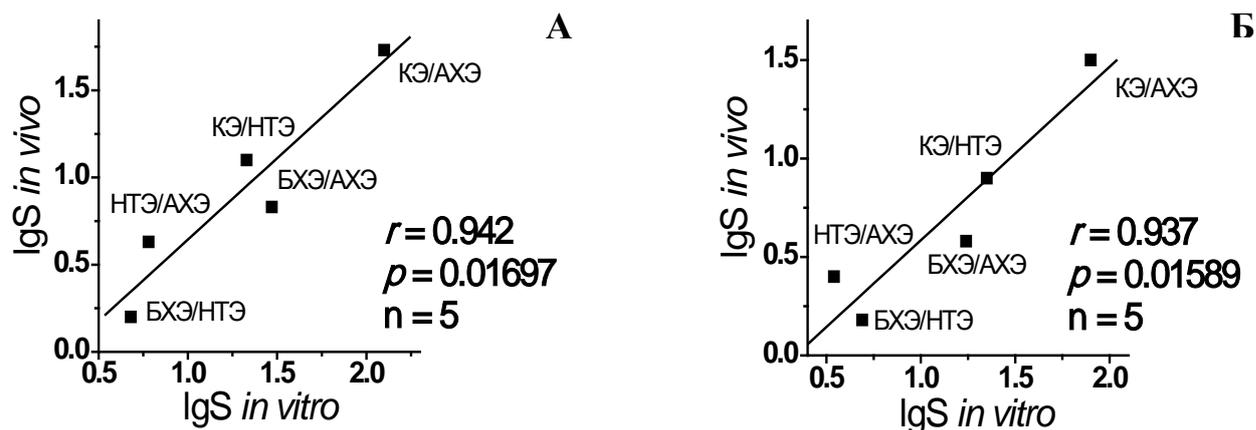


Рис. 7. Корреляции между ингибиторной селективностью diBu-PFP – (А) и diPr-DCIVP – (Б) в отношении АХЭ, БХЭ, КЭ и НТЭ согласно эстеразному профилю соединений ($\lg S$ *in vitro*) и селективностью в отношении эстераз крови мышей при в/бр введении соединений ($\lg S$ *in vivo*).

Для менее гидрофобного diEt-PFP защитный эффект КЭ и БХЭ в отношении острой холинергической токсичности ниже по сравнению с diBu-PFP: $S(\text{КЭ}/\text{АХЭ}) > 8$ и $S(\text{БХЭ}/\text{АХЭ}) > 4$ (Табл.13), что отражается на величине острой токсичности соединения ($\text{LD}_{50} = 200$ мг/кг), которая значительно выше, чем у более гидрофобного diBu-PFP ($\text{LD}_{50} > 2000$ мг/кг), несмотря на существенно более низкую собственную анти-АХЭ активность diEt-PFP в сравнении с diBu-PFP: $k_i = (1.80 \pm 0.11) \times 10^3$ и $(8.44 \pm 0.34) \times 10^4$ $\text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ соответственно (Табл. 3). Отсутствие ингибирования НТЭ *in vivo* характеризует diEt-PFP как безопасное соединение с точки зрения ОНТФОС. Это может быть связано как с довольно низкой собственной анти-НТЭ активностью diEt-PFP: $k_i = (1.31 \pm 0.08) \times 10^2$ $\text{M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ (Табл. 3), так и с высоким защитным эффектом эстераз-скэвенджеров, обусловленным высокой ингибиторной селективностью соединения *in vitro*: $S(\text{КЭ}/\text{НТЭ})=779$ и $S(\text{БХЭ}/\text{НТЭ})=34.6$ (Табл. 4), а также с довольно высокой эффективностью связывания соединения с эстеразами-скэвенджерами *in vivo*: $\text{ED}_{50}(\text{БХЭ}) = 46.8 \pm 1.5$, $\text{ED}_{50}(\text{КЭ})= 25.0 \pm 1.0$ (Табл. 13).

Таким образом, результаты эксперимента на целом животном полностью подтверждают высказанную нами гипотезу о различном вкладе эстераз-скэвенджеров – КЭ и БХЭ, в формирование острой и отставленной нейротоксичности ФОС при увеличении гидрофобности соединения, сделанные на основании анализа эстеразного профиля. А именно: для более гидрофобного diBu-PFP наблюдается выраженный защитный эффект КЭ и БХЭ в отношении развития острой токсичности и снижение данного эффекта в отношении развития ОНТФОС; в то время как для менее гидрофобного diEt-PFP наоборот: защитный эффект эстераз-скэвенджеров выше в отношении ОНТФОС по сравнению с острой токсичностью.

Селективные ингибиторы КЭ плазмы крови мышей. Известно, что КЭ гидролизует большинство терапевтических средств, содержащих сложноэфирную или амидную группировку. Грызунам свойственна высокая активность КЭ плазмы, в то время как у человека ее активность практически отсутствует, что осложняет экстраполяцию

результатов токсикологических и фармакокинетических исследований с животных на человека. Это обуславливает потребность в селективных ингибиторах КЭ для проведения исследований на плазме мышей и на целом животном. В последнем случае ингибиторы должны обладать низкой острой токсичностью.

Анализ эстеразного профиля diEt-PFP и diBu-PFP (Табл. 3) показал выраженную ингибиторную селективность соединений в отношении КЭ по сравнению с АХЭ и БХЭ: для diEt-PFP $S(\text{КЭ}/\text{АХЭ}) = 56.6$ и $S(\text{КЭ}/\text{БХЭ}) = 22.7$; для diBu-PFP $S(\text{КЭ}/\text{АХЭ}) = 129$ и $S(\text{КЭ}/\text{БХЭ}) = 4.4$. При этом diBu-PFP является в 100 раз более эффективным ингибитором КЭ по сравнению с diEt-PFP: константы ингибирования КЭ составляют $(1.09 \pm 0.08) \times 10^7$ и $(1.02 \pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, соответственно.

Результаты экспериментов на препаратах крови мышей продемонстрировали выраженную селективность данных соединений в отношении КЭ крови (Табл. 11): для diEt-PFP $S(\text{КЭ}/\text{АХЭ}) = 47.5$ и $S(\text{КЭ}/\text{БХЭ}) = 15$; для diBu-PFP $S(\text{КЭ}/\text{АХЭ}) = 65$ и $S(\text{КЭ}/\text{БХЭ}) = 7$. При этом diBu-PFP в 80 раз более эффективно ингибирует КЭ крови по сравнению с diEt-PFP: величины IC_{50} составляют $(2.4 \pm 0.13) \times 10^{-8}$ и $(1.89 \pm 0.11) \times 10^{-6} \text{ M}$, соответственно (Табл. 10). Использование diBu-PFP в концентрации $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ позволяет эффективно (более чем на 90%) и длительно (не менее 7 ч) ингибировать КЭ в препаратах крови мышей.

Анализ дозозависимостей ингибирования эстераз крови мышей при в/бр введении соединений показывает, что diEt-PFP (Рис. 6А) в дозе 45 мг/кг (0.22 LD_{50}) эффективно (на 80%) ингибирует КЭ, снижает активность БХЭ на 50%, при этом не затрагивает активность АХЭ.

В случае diBu-PFP (Рис. 6Б) полное ингибирование КЭ достигается в дозе 10 мг/кг ($<0.004 \text{ LD}_{50}$), в то время как БХЭ и НТЭ ингибируются незначительно, изменений активности АХЭ при этой дозе не наблюдается. Следовательно, применение diBu-PFP уже в малых дозах позволяет практически полностью ингибировать КЭ плазмы крови мышей, не затрагивая активностей остальных эстераз. Низкая острая токсичность diBu-PFP для мышей дает возможность использовать его в экспериментах на целом животном.

Таким образом, diBu-PFP можно рассматривать в качестве нового эффективного и селективного ингибитора КЭ плазмы крови мышей *in vitro* и *in vivo* при исследовании на грызунах фармакологически активных веществ, содержащих гидролитически нестабильные сложноэфирные или амидные группы.

ВЫВОДЫ

1. Получен и проанализирован эстеразный профиль О-фосфорилированных этилтрифторлактатов (ТФЛ). Показано линейное возрастание нейропатического потенциала соединений с увеличением гидрофобности молекулы и различная роль эстераз-скэвенджеров БХЭ и КЭ в формировании острой и отставленной нейротоксичности соединений.

2. Выдвинуто предположение о том, что эстеразный профиль антихолинэстеразного соединения в значительной степени определяет его эффекты в мозге и крови *in vitro* и на уровне целого организма. Проверку гипотезы проводили с использованием этильного и бутильного аналогов О-фосфорилированных гексафторизопропанолов (PFP), которые

имеют сходные с TFL закономерности структура–ингибиторная активность/ селективность при более выраженных биологических эффектах.

3. Разработаны методы определения активности АХЭ, БХЭ, НТЭ, КЭ и PON1 в цельной крови и охарактеризован «эстеразный статус» человека и лабораторных животных (мышей и крыс). Установлено, что в крови человека значимыми являются активности холинэстераз (АХЭ и БХЭ), активность КЭ незначительна, тогда как грызуны имеют высокую активность КЭ. Для всех видов показана высокая активность параоксоназы и низкая активность НТЭ.

4. Показано, что НТЭ мозга мышей является достоверным биохимическим маркером воздействия ФОС, вызывающих отставленную нейротоксичность. Разработана модель для биохимической оценки нейропатичного потенциала ФОС, основанная на сравнительной оценке ингибирования НТЭ и АХЭ в мозге мышей, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* при внутрибрюшинном введении.

5. Установлено, что НТЭ крови мышей является биомаркером отравления нейропатичными ФОС. Впервые показано, что одновременное определение активности АХЭ и НТЭ в крови позволяет дифференцировать воздействие острых и отставленных нейротоксичных агентов.

6. В экспериментах *in vitro* на тканях (препаратах мозга и крови мышей) показано, что ингибиторная активность и селективность О-фосфорилированных гексафтор-изопропанолов в отношении АХЭ, БХЭ, НТЭ и КЭ мозга и крови соответствуют эстеразному профилю соединений, за исключением КЭ мозга – тканеспецифичной изоформы фермента.

7. В экспериментах *in vivo* при внутрибрюшинном введении исследуемых ФОС показано, что ингибиторная активность и селективность соединений в отношении эстераз мозга и крови соответствуют их эстеразному профилю. Продемонстрирована различная роль эстераз-скэвнджеров в формировании острой и отставленной нейротоксичности ФОС.

8. Найден новый эффективный и селективный ингибитор карбоксилэстеразы плазмы крови мышей, обладающий низкой острой токсичностью.

9. Результаты работы показывают, что концепция эстеразного профиля антихолинэстеразных соединений позволяет прогнозировать их терапевтические и токсические эффекты и может быть использована в скрининговых исследованиях для поиска эффективных и безопасных лекарственных средств.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F., **Rudakova E.V.**, Boltneva N.P., Porus M.V., Dubacheva G.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J. Biosensor analysis of blood esterases for organophosphates exposure assessment: Approaches to simultaneous determination of several esterases // *Chem. Biol. Interact.* 2010. V. 187 (1-3). P. 312-317.
2. Махаева Г.Ф., **Рудакова Е.В.**, Аксиненко А.Ю., Соколов В.Б., Серебрякова О.Г., Галенко Т.Г. Средство для необратимого ингибирования *in vivo* карбоксилэстеразы на основе фосфорилированных 1-гидроперфторизопропанолов, обладающее низкой острой токсичностью для теплокровных, и способ его применения для ингибирования карбоксилэстеразы в плазме грызунов // Патент РФ на изобретение

№ 2423132. 2011.

3. **Рудакова Е.В.**, Болтнева Н.П., Махаева Г.Ф. Сравнительный анализ эстеразной активности крови человека, мыши и крысы // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2011. Т. 152. № 7. С. 80-83.
4. **Рудакова Е.В.**, Махаева Г.Ф., Галенко Т.Г., Аксиненко А.Ю., Соколов В.Б., Ричардсон Р.Дж., Мартынов И.В. Эстеразный профиль О-фосфорилированных этилтрифторлактатов в прогнозировании их терапевтических и токсических эффектов // ДАН. 2012. Т. 443. № 2. С. 253–257.
5. Громова М.С., Крайнова Н.А., Торгонская А.А., Сиголаева Л.В., **Рудакова Е.В.**, Махаева Г.Ф., Еременко А.В., Курочкин И.Н. Определение холинэстераз крови с использованием высокочувствительного амперометрического биосенсора на основе фермент-полиэлектродных нанопленок // Токсикол. Вестн. 2012. № 5. С. 27-36.
6. **Рудакова Е.В.**, Серебрякова О.Г., Болтнева Н.П., Галенко Т.Г., Махаева Г.Ф. Биохимическая модель на мышах для оценки нейропатического потенциала фосфорорганических соединений // Токсикол. Вестн. 2012. № 6. С. 20-24.
7. Makhaeva G.F., Radchenko E.V., Palyulin V.A., **Rudakova E.V.**, Aksinenko A.Yu., Sokolov V.B., Zefirov N.S., Richardson R.J. Organophosphorus compound esterase profiles as predictors of therapeutic and toxic effects // Chem. Biol. Interact. 2013. V. 203. P. 231-237.
8. **Рудакова Е.В.**, Махаева Г.Ф., Галенко Т.Г., Аксиненко А.Ю., Соколов В.Б., Мартынов И.В. Новый селективный ингибитор карбоксилэстеразы плазмы мышей // ДАН. 2013. Т. 449. № 2. С. 232–235.
9. Sigolaeva L.V., Dubacheva G.V., Porus M.V., Eremenko A.V., **Rudakova E.A.**, Makhaeva G.F., Richardson R.J., Kurochkin I.N. Layer-by-layer tyrosinase biosensor for assay of carboxylesterase and neuropathy target esterase activities in blood // Anal. Meth. 2013. V.5 (16). P. 3872-3879.
10. Makhaeva G.F., **Rudakova E.V.**, Hein N.D., Serebryakova O.G., Kovaleva N.V., Boltneva N.P., Fink J.K., Richardson R.J. Further studies toward a mouse model for biochemical assessment of neuropathic potential of organophosphorus compounds // J. Appl. Toxicol. 2014, DOI:10.1002/jat.2977.
11. Курочкин И.Н., Ерёменко А.В., Сиголаева Л.В., Громова М.С., Донцова Е.А., Торгонская А.А., Крайнова Н.А., Дубачева Г.В., Порус М.С., Махаева Г.Ф., **Рудакова Е.В.**, Болтнева Н.П., Пергушов Д.В., Будашов И.А., Евтушенко Е.Г., Зезин А.Б., Варфоломеев С.Д. Фермент-полимерные наноконпозиты как основа диагностической платформы для медико-биологических исследований. В книге: Постгеномные исследования и технологии. М.: МГУ, 2011. С. 219-296.
12. **Рудакова Е.В.**, Болтнева Н.П., Махаева Г.Ф. Сравнительный анализ «эстеразного статуса» человека и крысы // Материалы VIII Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 11-13 ноября, 2008. С. 191-196.
13. **Рудакова Е.В.**, Галенко Т.Г., Махаева Г.Ф. Взаимосвязь между эстеразным профилем фосфорорганических соединений и их ингибиторной активностью в отношении эстераз крови *in vivo* // Материалы IX Международной молодежной

конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 9-11 ноября, 2009. С. 221-225.

14. **Рудакова Е.В.**, Махаева Г.Ф., Горева Т.В., Аксиненко А.Ю., Соколов В.Б. Эстеразный профиль гомологичных фосфорилированных этилтрифторлактатов // Материалы X Международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 8-10 ноября, 2010. С.198-210.
15. Makhaeva G.F., **Rudakova E.V.**, Boltneva N.P., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J. Blood esterases as a complex biomarker for exposure to organophosphorus compounds. In: Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in the East Europe Countries. NATO Security through Science. Series A / Eds C. Dishovsky, A. Pivovarov / Dordrecht: Springer, 2009. P. 177-194.
16. Makhaeva G.F., **Rudakova E.V.**, Sigolaeva L.V. Investigation of esterase status as a complex biomarker of exposure to organophosphorus compounds. In: Toxicological Problems / Eds C. Dishovsky, J. Radenkova – Saeva / Sofia: Military Publishing House, 2014. P. 15-26.
17. Boltneva N.P., **Rudakova E.V.**, Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. Esterase Status of Various Species in Assessment of Exposure to Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems / Eds C. Dishovsky, J. Radenkova – Saeva / Sofia: Military Publishing House, 2014. P. 27-38.
18. **Rudakova E.V.**, Sigolaeva L.V., Makhaeva G.F. Investigation of Mice Blood Neuropathy Target Esterase as Biochemical Marker of Exposure to Neuropathic Organophosphorus Compounds. In: Toxicological Problems / Eds C. Dishovsky, J. Radenkova – Saeva / Sofia: Military Publishing House, 2014. P. 39-50.
19. Kurochkin I.N., Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., Dontsova E.A., Gromova M.S., **Rudakova E.V.**, Makhaeva G.F. Layer-by-layer electrochemical biosensor for blood esterases assay. In: Toxicological Problems / Eds C. Dishovsky, J. Radenkova – Saeva / Sofia: Military Publishing House, 2014. P. 51-67.
20. Sigolaeva L.V., Eremenko A.V., **Rudakova E.V.**, Makhaeva G.F., Kurochkin I.N. Tyrosinase-based biosensors for assay of carboxylesterase, neuropathy target esterase, and paraoxonase activities in blood. In: Toxicological Problems / Eds C. Dishovsky, J. Radenkova – Saeva / Sofia: Military Publishing House, 2014. P. 68-81.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.х.н., зав. лабораторией молекулярной токсикологии Г.Ф. Махаевой за помощь в постановке задачи, за ценные замечания и поддержку в ходе выполнения и написания данной работы. Автор выражает искреннюю благодарность своим соавторам: н.с. лаборатории молекулярной токсикологии ИФАВ РАН О.Г. Серебряковой за помощь в проведении кинетических исследований и в работе с животными, м.н.с лаборатории молекулярной токсикологии Т.Г. Галенко за помощь в проведении токсикологических экспериментов, с.н.с., к.х.н. Химфака МГУ Л.В. Сиголаеву за помощь в проведении электрохимических измерений. Автор благодарит зав. лаб. синтеза ФАВ к.х.н. Соколова В.Б. и к.х.н., вед. н.с. А.Ю. Аксиненко за предоставленные для исследований фосфорорганические соединения.

Заказ № 011-Р/09/2014 Подписано в печать 02.09.14 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,2

ООО "Цифровичок", г. Москва, Большой Чудов пер., д.5
тел. (495)649-83-30
 www.cfr.ru ; e-mail: zakpark@cfr.ru

