

УДК 57.083.3

Потенцирующий синергизм ксенобиотиков – как негативный фактор в системе обеспечения безопасности экологии

© 2013. Э. Т. Гайнуллина¹, д.х.н., с.н.с., Д. К. Гуликова², с.н.с., С. В. Керко², н.с., В. Н. Фатеенков¹, к.х.н., начальник отдела, ¹27 научный центр Министерства обороны Российской Федерации, ²Научно-исследовательский центр Федерального управления по безопасному хранению и уничтожению химического оружия, e-mail: fubhuho@yandex.ru

В данном обзоре приведены примеры проявления потенцирующего синергизма соединениями антихолинэстеразного действия, а также механизма, по которому достигается увеличение скорости их взаимодействия с ацетилхолинэстеразой. Также рассматривается перспективность использования феномена синергизма для модификации ферментативного метода определения ингибиторов холинэстеразы.

In the given review examples of display of potentiation synergism by some anticholinesterase active compounds, and also the mechanism, on which the increase in speed of their interaction with acetylcholinesterase is reached, are considered. Also perspectivity of use of a synergism phenomenon for updating an enzymatic method of definition cholinesterase inhibitors assay is considered.

Ключевые слова: синергизм, ксенобиотики, ингибиторы, холинэстераза

Keywords: synergism, xenobiotics, inhibitors, cholinesterase

Понятие синергизм (от греч. *synergos* – вместе действующий) представляет собой взаимодействие двух или более факторов, характеризующееся тем, что их действие существенно превосходит эффект каждого отдельного компонента в виде их простой суммы [1]. В химии синергистами называют вещества, действующие таким образом, что активность их смеси превышает сумму активностей компонентов [2].

С древних времён известно проявление синергизма биологически активными соединениями. Например, при составлении лечебных сборов из трав наши предки учитывали, какие из них усиливают терапевтические свойства друг друга. В настоящее время в аннотации к любому лекарственному препарату указывается его совместимость с другими лекарственными препаратами. Особенно важно учитывать синергизм лекарственных препаратов, кото-

рые необходимо принимать пожизненно, например, для пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера.

Известны случаи, когда совместный эффект ксенобиотиков существенно ниже суммы эффектов каждого из веществ вплоть до полного устранения эффектов. Классификация синергизма приведена в таблице 1.

Явление синергизма лежит в основе разработки медицинских средств защиты: антидотов и лечебных препаратов при терапии отравлений.

Для решения проблемы загрязнения окружающей среды, прежде всего воды и продуктов сельского хозяйства, необходимо не только использовать чувствительные методы определения конкретных биологически активных соединений, но и учитывать возможность проявления ими потенцирующего синергизма. Потенцирующий синергизм проявляют многие

Таблица 1

Классификация синергизма по [3]

Аддитивный синергизм	Совместный эффект ксенобиотиков А и В равен сумме эффектов каждого из веществ. Вещества имеют либо близкую структуру, либо одинаковый механизм действия
Потенцирующий синергизм	Совместный эффект ксенобиотиков А и В больше суммы эффектов каждого из веществ. Вещества имеют различные механизмы действия
Антагонизм	Совместный эффект ксенобиотиков А и В существенно ниже суммы эффектов каждого из веществ вплоть до полного устранения эффектов

биологически активные соединения, в том числе и фосфорорганические токсиканты.

В данном обзоре рассмотрены примеры проявления потенцирующего синергизма некоторыми соединениями антихолинэстеразного действия и известные из литературных источников механизмы их воздействия на ферменты класса холинэстераз прежде всего с точки зрения перспективности использования феномена синергизма для повышения чувствительности методов определения соединений антихолинэстеразного действия.

В соответствии с «Правилами номенклатуры ферментов», опубликованными в 1972 году Комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC), холинэстеразы относятся к классу гидролаз. Холинэстеразы, преимущественно гидролизующие ацетилхолин, по номенклатуре ферментов получили название ацетилхолин-ацетилгидролаза (КФ 3.1.1.7). Однако в научной литературе чаще используют его тривиальное название ацетилхолинэстераза. Гидролазы, преимущественно гидролизующие холиновые эфиры других карбоновых кислот (пропионилхолин, бутирилхолин и др.), по номенклатуре ферментов получили название ацилхолин-ацилгидролаза (КФ 3.1.1.8); тривиальное название холинэстераза. В данном обзоре используются тривиальные названия ацетилхолинэстераза (АХЭ) и холинэстераза (ХЭ).

Потенцирующий синергизм соединений антихолинэстеразного действия

В качестве примера следует привести двойное ингибирующее действие *in vitro* экстрактов чая *Camellia sinensis* L. на холинэстеразу (ХЭ) и β -секретазу [4]. Показано, что экстракты зелёного и чёрного чая данного вида ингибировали АХЭ человека на 50% при концентрации 0,03 и 0,06 мг/мл соответственно, а также бутирилхолинэстеразу (БХЭ) человека – на 50% при концентрации 0,05 мг/мл для каждого вида чая. Зелёный чай при конечной концентрации 0,03 мг/мл ингибировал β -секретазу на 38%. Столь высокую ингибирующую способность экстракта чая по отношению к ХЭ и β -секретазе авторы объясняют содержанием в чае биологически активных соединений, являющихся синергистами. Выявленные зависимости авторы [4] предлагают использовать для лечения болезни Альцгеймера, поскольку первичная цель лицензионных лекарств для лечения болезни

Альцгеймера как ингибирование АХЭ, так и защита от амилоидоза.

Антихолинэстеразную активность проявляют многие инсектициды, используемые в сельском хозяйстве, в том числе фосфорорганические инсектициды (ФОИ) и карбаматы. Бесконтрольное применение пестицидов и других биологически активных соединений приводит к серьёзным экологическим последствиям.

Экологические нарушения приводят к реальному содержанию в почве, воде и продуктах сельского хозяйства смесей вместо индивидуальных пестицидов. Известны примеры проявления синергизма ФОИ и карбаматами [5] при совместном воздействии на ХЭ.

Так, исследования *in vivo* на крысах на примере смеси из пяти ФОИ (хлопирифоса, диазинона, диметоата, ацефата и малатиона) показали проявление ими синергизма [5].

Для построения модели аддитивности авторы предварительно исследовали характеристики отклика крыс на дозы индивидуального ФОИ. Оценивали в качестве отклика поведение крыс при воздействии определённых доз индивидуального ФОИ (сердечная деятельность, счёт походки и др.). При воздействии орально летальной дозы оценивали активность АХЭ мозга и крови. Данные исследования были статистически оценены для построения модели аддитивности. Построенная модель аддитивности использовалась для предсказания эффекта воздействия смеси ФОИ на подопытных крыс в интервалах концентраций 10–450 мг/кг и 1,75–78,8 мг/кг. Аналогично была построена модель аддитивности для опытных смесей ФОИ с целью сравнения с полученной ранее моделью для индивидуального ФОИ. Анализ модели аддитивности смеси из пяти ФОС показал существенное отклонение от аддитивности для всех откликов. Так, потенцирующий синергизм наблюдался и при более низких дозах в смеси из ФОИ, которые при индивидуальном воздействии вовсе не влияли на отклик крысы. Кроме того, эффективные дозы ФОИ (LD_{20} , LD_{50}) для АХЭ мозга и сердечной деятельности составляли приблизительно половину той, которая предсказана моделью аддитивности [5].

Проявление синергизма ФОИ установлено *in vivo* и по отношению к рыбе *Gambusia yucatanana* [6]. В указанной работе представлены результаты исследования влияния в естественных условиях коммерческих ФОИ хлорпирифоса, карбофурана и глифосата на ХЭ, глута-

тион S-трансферазу и лактат дегидрогеназу рыбы *G. yucatanana*, выбранных в качестве биомаркеров. На первой стадии изучения активности ХЭ головы и мышцы с использованием различных субстратов тиохолиновых эфиров карбоновых кислот, а также ряда селективных ингибиторов было установлено, что в голове и мышцах *G. yucatanana* главным образом содержится АХЭ. Рыбу подвергали воздействию как индивидуальными ФОИ (хлорпирифосом и глифосатом), так и их смесью. Установлено проявление потенцирующего синергизма смесью хлорпирифоса и глифосата по отношению к *G. yucatanana*. Механизм этого феномена авторами работы не предложен.

Высокую чувствительность ХЭ рыбы *G. yucatanana* предложено использовать в качестве биомаркера для диагностики наличия в воде пестицидов, обладающих антихолинэстеразным действием [6].

Потенцирующий синергизм некоторых фосфорорганических пестицидов и карбаматами установлен по отношению к АХЭ насекомых, в частности к АХЭ моли дикого яблока [7].

Известны примеры проявления синергизма ФОИ и по отношению к человеку. Так, совместное воздействие хлорпирифоса и никотина ведёт к патологии для ребёнка в утробе матери [8].

Существенное проявление синергизма фосфорорганическими соединениями антихолинэстеразного действия установлено в присутствии некоторых гетероциклических соединений [9, 10]. Так, усиление синергического влияния на скорость взаимодействия АХЭ с ФОИ достигается в присутствии обратимых ингибиторов d-тубокурарина и галламина [10].

В таблице 2 приведены результаты исследования влияния ряда гетероциклических обратимых ингибиторов на скорость взаимодействия АХЭ мыши с О,О-диэтил-О-(4-нитрофенил) фосфатом (параоксоном) [10].

Из представленных в таблице 2 данных следует, что наибольшее увеличение скорости

взаимодействия АХЭ с параоксоном более чем на порядок наблюдается в присутствии d-тубокурарина.

Механизм проявления синергизма ФОИ параоксоном в присутствии обратимых ингибиторов, приведённых в таблице 2, установлен на основе современных представлений о структуре активного центра АХЭ.

Исследованиями методом рентгеноструктурного анализа ацетилхолинэстераз из ряда природных источников показано, что активный центр (АЦ) расположен на внутренней поверхности глобулы фермента в канале глубиной примерно 20 Å. Каталитический гидролиз субстрата ацетилхолина (АХ) осуществляется с участием каталитической триады His-447, Glu-334, Ser-203 (для млекопитающих), расположенной на «дне» АЦ. Каталитическая триада окружена структурными участками полипептидной цепи АЦ, важными для каталитической активности: это участок ацилирования (А-участок), в его состав входят аминокислотные остатки Phe-295, Phe-297, Phe-338, и участок связывания триметиламиногруппы АХ (Trp-86 и Tyr-337) [11, 12]. У входа в АЦ на расстоянии 12–15 Å от каталитической триады расположен аллостерический участок. Этот участок упоминается в литературе как анионный периферический участок (Р-участок) [12]. Р-участок вносит вклад в каталитическую эффективность фермента кратковременным селективным связыванием субстрата на его пути к А-участку, в котором осуществляется биокатализ гидролиза АХ с участием каталитической триады His-447, Glu-334, Ser-203 [12].

В основе необратимого ингибирования холинэстераз фосфорорганическими токсикантами лежит реакция фосфорилирования гидроксильной группы Ser каталитической триады АЦ по механизму нуклеофильного замещения у атома фосфора фосфорильной группы молекулы ингибитора, что приводит к разрушению каталитической триады и потере ферментом каталитической активности к субстрату [11, 12].

Таблица 2

Значения отношения констант скорости первого порядка ингибирования АХЭ мыши параоксоном в присутствии (k_A) и отсутствии (k) гетероциклического обратимого ингибитора [10]

Название гетероциклического соединения	k_A/k
d-Тубокурарин	12,8
Галламин	4,0
Пропидиум	2,5
Атропин	1,0

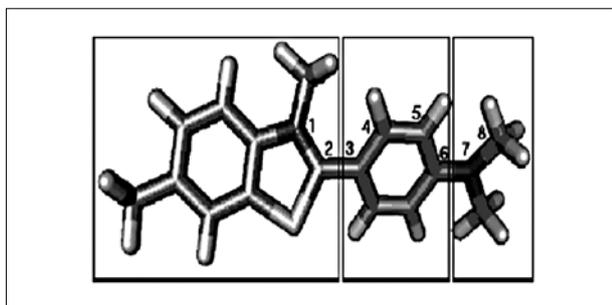


Рис. 1. Структурная формула тиюфлавина Т [14]

И конкурентные фосфорорганические ингибиторы, и обратимые ингибиторы специфично связываются на первом этапе с Р-участком с образованием соответствующих комплексов с последующим перемещением необратимых ингибиторов к А-участку. Следовательно, конкурентные фосфорорганические ингибиторы и обратимые ингибиторы, специфично связывающиеся с Р-участком, взаимодействуют с АХЭ по различным механизмам. И именно в их совместном присутствии в Р-участке следует ожидать проявление синергизма по отношению к АХЭ.

Таким образом, данные об увеличении скорости ингибирования АХЭ мыши параксоном в присутствии обратимых ингибиторов, приведённых в таблице 2, согласуются с данными о потенцирующем синергизме из ранее приведённой классификации синергизма.

Для объяснения механизма проявления синергизма ФОИ в присутствии гетероциклических ингибиторов, представленных в таблице 2, предложена гипотеза, согласно которой их связывание с Р-участком ведёт к изменению конформации каталитического участка АХЭ, что, в свою очередь, ведёт к увеличению скорости фосфорилирования Ser-203 каталитической триады [10]. Изменение конформации, в частности, проявляется через ориентацию уходящей группы ФОИ в его комплексе с АХЭ, благоприятную для её гидролиза. Данная гипотеза предусматривает конформационное взаимодействие между А-участком активного центра и Р-участком АХЭ [10].

С целью подтверждения данной гипотезы проведены исследования с применением метода флуоресцентного зондирования активного центра рекомбинантной АХЭ эритроцитов человека. В качестве флуоресцентного зонда использовали обратимый флуорогенный ингибитор тиюфлавин Т (ТНТ), интенсивность флуоресценции которого возрастает более чем в 1000 раз на длине волны 490 нм при возбуждении длиной волны 448 нм в результате свя-

зывания с Р-участком АХЭ [13]. Структурная формула ТНТ представлена на рисунке 1.

ТНТ относится к группе индикаторов «молекулярные роторы». Интенсивность флуоресценции индикаторов «молекулярные роторы» зависит от полярности растворителя: с увеличением его полярности интенсивность флуоресценции возрастает, что объясняется снижением торсионной подвижности в средах с высокой полярностью в результате сольватации молекулы [14].

Увеличение интенсивности флуоресценции ТНТ при связывании с Р-участком активного центра АХЭ можно объяснить замедлением взаимного вращения бензотиазольного и аминокбензольного колец относительно друг друга в молекуле ТНТ вокруг оси, обозначенной на рисунке 2 цифрами 2–3 и 6–7, в результате комплементарного соответствия функциональных групп ТНТ и полипептида Р-участка АХЭ. При этом достигается планарность молекулы ТНТ, фиксируется система сопряжённых связей и достигается повышение интенсивности флуоресценции [13].

При добавлении хлорида этил-(3-гидроксибензил)диметиламмония (ЭД), селективно взаимодействующего с А-участком, к раствору комплекса АХЭ с ТНТ наблюдается существенное снижение интенсивности флуоресценции. Например, при концентрации ЭД 1 мкМ интенсивность флуоресценции раствора, содержащего АХЭ (182±20 нМ) и ТНТ (1 мкМ), интенсивность флуоресценции снижается на 58%. При этом ЭД селективно связывается с А-участком с образованием тройного комплекса [13].

Снижение интенсивности флуоресценции комплекса АХЭ с ТНТ в присутствии ЭД, очевидно, обусловлено увеличением торсионной подвижности связанной молекулы ТНТ, что можно объяснить изменением локальной конформации Р-участка [13].

Предложенное объяснение механизма потенцирующего синергизма, проявляющегося в существенном увеличении скорости фосфорилирования АХЭ в присутствии гетероциклических обратимых ингибиторов d-тубокурарина и галламина [10], подтверждается результатами рентгеноструктурных исследований комплекса ТНТ с АХЭ рыбы *Torpedo californica* [15]. На рисунке 2 приведён кадр распределения электронной плотности в комплексе ТНТ-АХЭ.

Из приведённого кадра видно, что молекула ТНТ планарна и расположена в пределах Р-участка, осуществляя несвязывающее взаимодействие с ароматическими участками

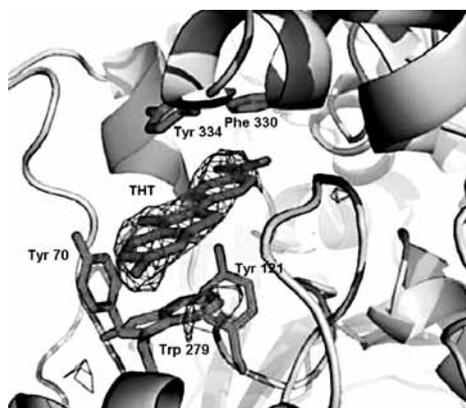


Рис. 2. Кадр распределения электронной плотности в двойном комплексе ТНТ-АХЭ [15]

полипептидной цепи активного центра АХЭ. Все участки полипептидной цепи комплекса ТНТ-АХЭ соответствуют их конфигурации активного центра в природном ферменте в отсутствие ТНТ, и молекула последнего занимает пространство в пределах АЦ, которое ранее было занято четырьмя молекулами воды [15]. При этом бензтиазольное кольцо ТНТ расположено напротив Trp-279, а диметиламинофенильное кольцо практически планарно фенильной группе Phe-330 и расположено от него на расстоянии 3,5 Å. Также имеют место взаимодействия диметиламинофенильного кольца ТНТ с Tyr-121 на расстоянии 3,2 Å и взаимодействие бензтиазольного кольца ТНТ с Tyr-70 и Tyr-334 на расстоянии 3,4 и 3,7 Å соответственно. Именно достижение такой устойчивой планарности и обеспечивает столь высокую интенсивность флуоресценции комплекса ТНТ-АХЭ.

На рисунке 3 представлен кадр распределения электронной плотности в тройном комплексе ТНТ-АХЭ-ЭД [15].

Если участок полипептидной цепи фермента, в который включён Phe-330, в комплексе ТНТ-АХЭ аналогичен конформации в природной АХЭ и планарен с диметиламинофенильной группой ТНТ, то Phe-330 в структуре тройного комплекса ТНТ-АХЭ-ЭД повернут примерно на 115° от позиции в природном ферменте. Как видно из рисунка 3, такая позиция Phe-330 создавала бы его столкновение с ближайшим кольцом ТНТ, если бы последний занимал ту же позицию, что и в комплексе ТНТ-АХЭ. Следовательно, фенильное кольцо Phe-330 не может занять ту же позицию в предполагаемом тройном комплексе ТНТ-АХЭ-ЭД и должно вращаться. Это вращение может разрешить некоторую релаксацию строгой планарности ароматических

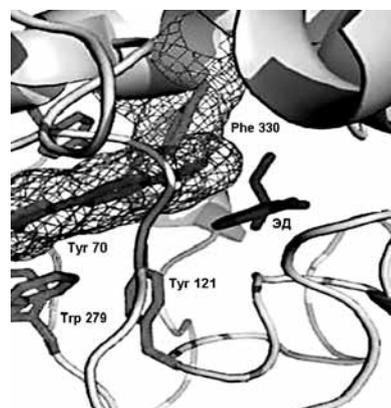


Рис. 3. Кадр распределения электронной плотности в тройном комплексе ТНТ-АХЭ-ЭД [15]

колец связанного ТНТ, что и приводит к частичному тушению флуоресценции ТНТ в составе комплекса ТНТ-АХЭ-ЭД. Следовательно, ключевую роль в тушении флуоресценции комплекса ТНТ-АХЭ в присутствии лиганда, связывающегося с А-участком, играет остаток Phe-330, вовлечённый во взаимодействие ТНТ с АХЭ [15].

Таким образом, приведённые рентгеноструктурные исследования подтверждают механизм синергического действия приведённых выше гетероциклических обратимых ингибиторов на скорость ацилирования Ser 203 активного центра АХЭ, предусматривающий взаимное конформационное взаимодействие А-участка активного центра и Р-участка фермента.

Результаты анализа литературных данных синергизма ксенобиотиков использованы для разработки и предложения экспресс-способа определения активности АХЭ эритроцитов крови человека на основе увеличения интенсивности флуоресценции ТНТ в присутствии этого фермента [16], а также высокочувствительного способа определения фосфорорганических токсикантов на основе синергического эффекта влияния галламина на скорость фосфорилирования ацетилхолинэстеразы [16].

Заключение

На производстве, в быту или в природных условиях на человека, как правило, одновременно действует большое количество химических веществ. Поскольку существует явление синергизма, практически никогда эффект такого действия не является простой суммой эффектов, наблюдаемых при изолированном воздействии каждого из токсикантов в отдельности. Это существенно затрудняет нормирование химических воздействий (определение

ПДК и т.д.) и вообще снижает ценность токсиметрических данных, полученных применительно к одному токсиканту, для принятия экспертных решений. Явление синергизма – одна из основных причин значительной неопределённости суждений при оценке риска, связанного с действием вредных факторов на организм, популяцию, экосистему [3].

Таким образом, анализ литературных данных о проявлении синергизма многими биологически активными соединениями позволяет сделать заключение о том, что потенцирующий синергизм ксенобиотиков является негативным фактором в системе обеспечения безопасности окружающей среды.

Литература

1. Советский энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия, 1990. 1632 с.
2. Химический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия, 1983. 791 с.
3. Куценко С.А. Основы токсикологии. Санкт-Петербург. 2002. 119 с.
4. Okello E.J., Savelev S.U., Perry E.K. In vitro anti-beta-secretase and dual anti – cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia // *Phytother Res.* 2004. V. 18. C. 624–627.
5. Moser V.C., Casey M., Hamm A., Carter W.H.Jr., Simmons J.E., Gennings C. Neurotoxicological and statistical analyses of a mixture of five organophosphorus pesticides using a ray design // *Toxicol. Sci.* 2005. V. 86. C. 101–115.
6. Rend n-von Osten J., Ort z-Arana A., Guilhermino L., Soares A.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatanana*) exposed to pesticides // *Chemosphere.* 2005. V. 58. C. 627–636.
7. Cohen H. and E. Evaluation of mechanisms of azinphos-methyl resistance in the codling moth *Cydia pomonella* (L.) // *Arch. Insect Biochem.* 2004. V. 57. C. 92–100.
8. Abdel-Rahman A., Dechkovskaia A.M., Mehta-Simmons H., Sutton J.M., Guan X., Khan W.A., Abou-Donia M.B. Maternal exposure to nicotine and chlorpyrifos, alone and in combination, leads to persistently elevated expression of glial fibrillary acidic protein in the cerebellum of the offspring in late puberty // *Arch. Toxicol.* 2004. V. 78. C. 467–476.
9. Mallender W.D., Szegletes T., Rosenberry T. L. Organophosphorylation of Acetylcholinesterase in the Presence of Peripheral Site Ligands // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. C. 8491–8499.
10. Radic Z. Taylor P. The influence of peripheral site ligands on the reaction of symmetric and chiral organophosphates with wildtype and mutant acetylcholinesterases // *Chemico-biological interac.* 1999. V. 119–120. C. 111–117.
11. Hornberg A., Tunemalm A., Ekstrom F. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with organophosphorus compounds suggest that the acyl pocket modulates the aging reaction by precluding the formation of the trigonal bipyramidal transition state // *Biochem.* 2007. V. 46. C. 4815–4825.
12. Rosenberry T.L., Johnson J.L., Cusack B., Thomas J.L., Emani S., Venkatasubban K.S. Interaction between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase // *Chem. Biol. Interact.* 2005. V. 157–158. C. 181–189.
13. De Ferrari G.V., Mallender W.D., Inestrosa N.C., Rosenberry T.L. Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. C. 23282–23287.
14. Maskevich A.A., Stsiapura V.I., Kuzmitsky V.A., Kuznetsova I.V., Uversky V.N., Turoverov K.K. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form // *J. of proteome research.* 2007. V. 6. C. 1392–1401.
15. Harel M., Sonoda L.K., Silman I., Sussman J.L., Rosenberry T.L. Crystal structure of thioflavin T bound to the peripheral site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase reveals how thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. C.7856–7861.
16. Антохин А.М., Гайнуллина Э.Т., Таранченко В.Ф., Яваева Д.К. Перспективы разработки экспресс-метода определения фосфорорганических отравляющих веществ // Научно-технические аспекты обеспечения безопасности при уничтожении, хранении и транспортировке химического оружия: Материалы четвёртой научно-практической конференции. 2008. С. 207–213.