

НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ АНТИДОТА ПРОТИВ СОЕДИНЕНИЙ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ДЕЙСТВИЯ

*А.М. Антохин, Э.Т. Гайнуллина, С.Б. Рыжиков, М.А. Понсов,
В.Ф. Таранченко, Д.К. Яваева*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Физический факультет

На основе концепции стерической блокады предложена новая стратегия создания антидота против соединений антихолинэстеразного действия. Эта стратегия состоит в том, чтобы синтезировать циклические соединения-ингибиторы, связывающиеся с большим сродством с периферическим участком активного центра ацетилхолинэстеразы и блокирующие при этом доступ токсиканта антихолинэстеразного действия к каталитическому участку при сохранении поступления ацетилхолина к Ser каталитической триады участка ацилирования активного центра.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, антидот, ингибитор, периферический участок.

New strategy of creation of antidote against anticholinesterase action compounds is offered on the basis of the steric blockade conception. This strategy is to synthesize cyclic ligands that will bind specifically with big affinity to the cholinesterase peripheral site and block the passage of organophosphates, while allowing the passage of acetylcholine to the catalytic triad Ser of acylation site.

Keywords: acetylcholinesterase, antidote, inhibitor, peripheral site.

К настоящему времени разработаны принципы создания антидотов против фосфорорганических отравляющих веществ (PhOV). Основные принципы профилактики и терапии при поражениях PhOV представлены в табл. 1 [1].

Однако вопросы профилактики и терапии при поражениях PhOV требуют дальнейших исследований по целому ряду причин.

Так, с целью купирования симптомов перевозбуждения холинергических отделов нервной системы используют холинолитики – вещества, образующие комплексы с холинорецепторами (ChR), то есть являющиеся антагонистами ацетилхолина (ACh). Наиболее хорошо изученным холинолитиком, отличающимся высоким сродством к ChR и применяемым широко на практике, является атропин. На рис. 1 представлена его структурная формула.

Однако его использование имеет ряд недостатков. Эффективность действия атропина снижается в присутствии высоких концентраций ACh, а также в результате ферментативного гидролиза в тканях млекопитающих. Кроме того, атропин плохо купирует симптомы, возни-

кающие при воздействии PhOV на центральную нервную систему, поэтому, наряду с атропином, используют другие холинолитики, например, амизил, апрофен, арпенал [1].

Холинолитики не реактивируют ингибированные PhOV холинэстеразы. В этих целях используют оксимы. Реактиваторы следует вводить как можно раньше после воздействия PhOV, так как фосфорилированная ацетилхолинэстераза (AChE) подвергается дальнейшим превращениям, так называемому «старению», после которого эффективность реактиваторов падает [1].

Период «старения» зависит от структуры PhOV. Например, DFP и зарин в комплексе с AChE эритроцитов человека имеют относительно короткий полупериод «старения» $t_{1/2}$ (приблизительно 3 ч), табун и VX в комплексе с AChE эритро-

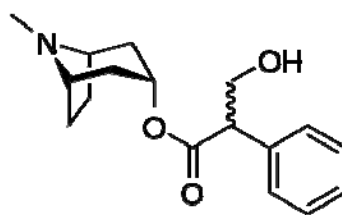


Рис. 1. Структурная формула атропина [1]

Таблица 1. Основные принципы профилактики и терапии при поражениях PhOV [1]

Принцип действия	Средства медицинской защиты и меры помощи
1. Использование холинолитиков для защиты холинорецепторов от действия высоких концентраций ацетилхолина	Атропин, бенактизин и другие холинолитики, действующие на m- и n-холинорецепторы и купирующие перевозбуждение холинергических отделов нервной системы
2. Реактивация холинэстераз, ингибированных PhOV	Дипироксим, 2-ПАМ, 2-ПАС, токсогонин, HGG-12, HGG-22, HGG-42 и др.
3. Защита активных центров холинэстераз от взаимодействия с PhOV	Галантамин, пиридостигмин и другие обратимые ингибиторы холинэстеразы
4. Снятие судорог	Диазепам и другие противосудорожные средства
5. Борьба с кислородным голоданием	Искусственное дыхание. Оксигенотерапия
6. Повышение скорости ферментативного гидролиза и процессов расхода PhOV на стадии транспорта к биомишениям	Бензонал и другие стимуляторы синтеза ферментов печени, крови и других внутренних органов
7. Ускорение выведения PhOV из крови	Гемотрансфузия, гемодиализ
8. Иммунохимическая защита	Специфические антигены, содержащие в качестве гаптенных групп остатки PhOV, вызывающие выработку антител
9. Уменьшение скорости синтеза ацетилхолина	Гемихолиний и другие соединения
10. Антисудорожные средства различного действия, их комплексное действие	Реактиваторы типа HGG и другие антисудорожные средства с различной направленностью действия. Рецептуры антисудорожных средств. Симптоматическая терапия

цитов человека отличаются более длительным полупериодом «старения»: приблизительно 19 и 37 ч, соответственно [2]. Наименьшим периодом «старения» отличается AChE, фосфорилированная зоманом ($t_{1/2}$ 0,1 ч) [3–5].

Предложено два различных механизма «старения» фосфорилированной AChE, а именно: нуклеофильная атака на атом фосфора фосфорильной группы PhOV и деалкилирование алкильной группы фосфорильного остатка через формирование карбокатиона. По первому механизму «стареет» AChE, фосфорилированная заринном и VX [6], по второму механизму «стареет» ацетилхолинэстераза, фосфорилированная зоманом [3–5].

Отличаются фосфорилированные ацетилхолинэстеразы и устойчивостью к реактивации: фосфорилированные табуном и DFP устойчивы

к реактивации, в то время как фосфорилированные VX и заринном реактивируются некоторыми, но не всеми оксимами [2]. Различия в скорости «старения» и в устойчивости к реактивации зависят как от структуры фосфорилированного фермента, так и структуры реактиватора [7–10].

С целью защиты холинэстеразы от воздействия PhOV используют обратимые ингибиторы холинэстераз, например, гетероциклы галантамин, пиридостигмин и др. Эти гетероциклы обычно входят в состав профилактических средств, их защитное действие продолжается несколько часов [1].

Однако проблема создания более эффективных антисудорожных средств остается актуальной, поскольку входящие в их состав обратимые ингибиторы являются профилактическими и их длительное и в больших количествах применение

опасно для здоровья [11]. К такому заключению пришли крупные специалисты в области военной химии, токсикологии, клинической медицины и других областей науки, исследовавшие причины заболевания военнослужащих межнациональных сил под эгидой вооруженных сил США, принимавших участие в операциях «Щит в пустыне» (август–декабрь 1990 года) и «Буря в пустыне» (январь–март 1991 года) против Ирака.

Это заболевание, получившее название «синдром войны в Персидском заливе», имеет необычный комплекс симптомов: расстройство памяти, бессонница, угнетенное состояние, головокружение, мышечная слабость, боль в суставах, нарушение чувствительности, высыпания в виде красных пятен на коже, зуд кожи, нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы и др. [11]. Весь этот комплекс симптомов, по мнению специалистов, не укладывается в рамки ранее описанных заболеваний военнослужащих, принимавших участие в других операциях за пределами территории США, в том числе и «вьетнамского синдрома».

В связи с ожидаемым применением PhOV военными силами Ирака был организован прием военнослужащими профилактического антидота. На завершающем этапе операции «Буря в пустыне» авиация США нанесла ракетно-бомбовый удар по хранилищам химического оружия Ирака в районах Эль-Хамисия и Эль-Назарет. В Эль-Хамисии на хранении находились артиллерийские снаряды, снаряженные заринном, циклозаринном и ипритом. 10 марта 1991 года после нанесения ракетно-бомбовых ударов в район Эль-Хамисия прибыл 37-й инженерный батальон сухопутных войск США для завершения действий по уничтожению химического оружия. В 1996 году МО США официально признало, что в период уничтожения химического оружия в Ираке подразделения США в течение четырех суток могли подвергаться воздействию низких концентраций отравляющих веществ [11]. В этот период военнослужащие США, очевидно, также принимали профилактические антидоты.

«Синдром войны в Персидском заливе» (в 1991–1998 годы) зарегистрирован более чем у 100 тысяч военнослужащих США, Великобритании и других стран, участвовавших в операциях «Щит в пустыне» и «Буря в пустыне».

Проведенные исследования показали, что одной из причин «синдрома войны в Персидском заливе» может быть прием в больших количествах (12 таблеток) длительное время профилактического антидота против PhOV бромида пиридопиримина и др. [11].

В последнее десятилетие ведутся интенсивные исследования по разработке более совершенных средств защиты от PhOV, что, очевидно, связано и с приведенным выше заключением комиссии, согласно которому одной из причин «синдрома войны в Персидском заливе» может быть прием в больших количествах профилактического антидота, и с проведением уничтожения химического оружия странами, подписавшими «Конвенцию о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении» [12], а также с применением зарина при теракте в Токійском метро в 1995 году. В основном, эти исследования направлены на установление зависимости скорости реактивации ингибированной PhOV ацетилхолинэстеразы оксимами от их структуры и поиску реактиваторов, отличающихся более высокой эффективностью [7–10, 13]. Обсуждению проблем и стратегии развития антидотов посвящена статья [14].

Наиболее оригинальными и перспективными среди этих работ представляются исследования, посвященные разработке новых профилактических антидотов, отличающихся принципиально новым механизмом защитного действия [15, 16].

Новая стратегия защиты ацетилхолинэстеразы (AChE) от PhOV выдвинута авторами на основе предложенной ими ранее теории блокады активного центра AChE [17, 18]. Эта стратегия состоит в том, чтобы модифицировать активный центр AChE путем селективного связывания с циклическими лигандами, которые бы блокировали проход PhOV к участку ацилиро-

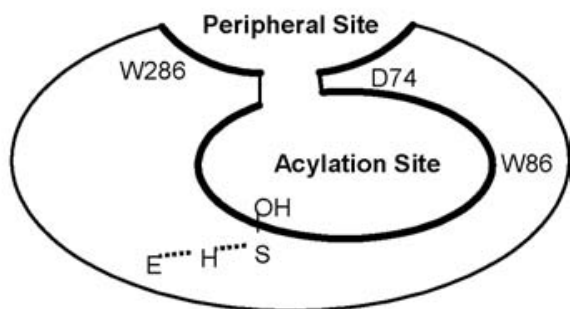


Рис. 2. Схема активного центра ацетилхолинэстеразы [26]

вания, но не влияли при этом на ферментативную активность по отношению к АСh [15, 16]. Эти работы основаны на современных представлениях о структуре активного центра АСhЕ, о механизме ферментативного гидролиза субстрата, а также механизме ее необратимого ингибирования.

Структура активного центра холинэстераз

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 [19]. Холинэстеразы, преимущественно гидролизующие ацетилхолин, по номенклатуре ферментов получили название ацетилхолин-ацетилгидролаза (КФ 3.1.1.7). Однако в научной литературе чаще используют тривиальное название этого фермента 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 (СhЕ). В данном обзоре используются тривиальные названия ацетилхолинэстераза и холинэстераза. В организме млекопитающих имеется три вида СhЕ, отличающихся функциональным назначением и субстратной специфичностью: синаптическая АСhЕ (КФ 3.1.1.7), АСhЕ эритроцитов (КФ 3.1.1.7) и сыво-

ротки крови (КФ 3.1.1.8). Синаптическая АСhЕ осуществляет прерывание передачи нервного импульса через синаптическую щель от пресинаптической мембраны к постсинаптической мембране нервных клеток (или от мембраны нервной клетки к скелетным мышцам) путем гидролиза с огромной скоростью медиатора АСh.

АСhЕ найдена в сером веществе головного мозга, скелетных мышцах, сердце, легких, кишечнике, селезенке и эритроцитах. Фермент локализован в межнейрональных синапсах, концевых двигательных пластинах скелетных мышц, ганглиях вегетативной нервной системы и мембранах эритроцитов [20, 21].

Многие функции СhЕ в организме выяснены в течение последних 20 лет благодаря интенсивно проводимым исследованиям. СhЕ вместе с АСhЕ участвует в прерывании нервных импульсов. Показано, что при прогрессирующей болезни Альцгеймера, когда уровень АСhЕ в организме человека снижается, ее роль может частично играть СhЕ [22]. Предполагают, что холинэстераза также может принимать участие в гидролизе АСh в нервно-мышечных соединениях и тем самым несколько защищать их от избытка ацетилхолина [23]. СhЕ сыворотки крови выполняет в организме защитные функции. В частности, она в ряде случаев предохраняет от инактивации АСhЕ, поскольку гидролизует некоторые фосфорорганические ингибиторы и карбаматы [24]. АСhЕ является основным ферментом, который метаболизирует кокаин и его производные с образованием нетоксичных продуктов распада. Поэтому препараты на основе СhЕ могут быть использованы при передозировке этого психоактивного вещества [25].

Каталитический гидролиз субстрата осуществляется в активном центре фермента (рис. 2). Исследованиями методом рентгеноструктурного анализа ацетилхолинэстераз из ряда природных источников показано, что их активный центр расположен на внутренней поверхности глобулы фермента в узкой щели глубиной 20 Å. Активный центр выстлан изнутри аминокислотными остатками с гидрофобными группами

(тирозин, фенилаланин и др.). Каталитический гидролиз субстрата происходит в участке ацилирования с участием каталитической триады Ser203-Glu334-His447 (для млекопитающих) [26].

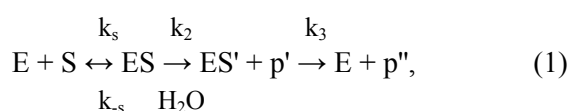
Каталитическая триада окружена структурными участками полипептидной цепи фермента, важными для каталитической активности: это участок ацилирования (А-участок) (Phe295, Phe297, Phe338) и участок связывания триметиламиногруппы холина (Trp86 и Tug337).

Конкурентные ингибиторы связываются с активным центром, в то время как другие лиганды могут влиять на активность фермента, ассоциируясь с аллостерическим участком, который расположен на поверхности фермента на расстоянии 11–12 Å от входа в активный центр. Этот участок упоминается в литературе как периферический анионный участок (Р-участок) [6].

Показано, что первым актом взаимодействия и субстрата, и ингибитора с АСhE является ассоциация с Р-участком. Ингибиторы, селективно связывающиеся с Р-участком, принято называть аллостерическими; при этом некоторые из них активируют взаимодействие необратимых ингибиторов с А-участком, другие – снижают [6].

Р-участок вносит вклад в каталитическую эффективность фермента кратковременным селективным связыванием АСh на его пути к А-участку, в котором осуществляется биокатализ гидролиза субстрата с участием каталитической триады His447, Glu334, Ser203 [6].

Биокаталитический гидролиз АСh в активном центре при его относительно низких концентрациях может быть представлен в виде ряда следующих превращений [1]:

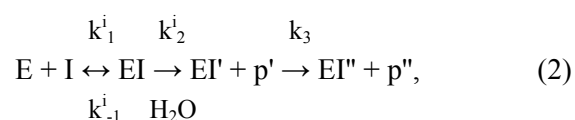


где E – холинэстераза, S – субстрат, ES – комплекс Михаэлиса, ES' – ацетилированная холинэстераза, p' – холин, p'' – уксусная кислота,

k_s, k_{-s}, k_2 и k_3 – константы скорости соответствующих стадий реакции.

Необратимое ингибирование холинэстеразы PhOV происходит в результате фосфорилирования Ser каталитической триады, что приводит к ее разрушению и потере ферментом каталитической активности к субстрату.

Взаимодействие PhOV с холинэстеразами может быть представлено в виде ряда следующих превращений [1]:



где E – холинэстераза, I – фосфорорганический ингибитор, EI – комплекс холинэстераза-ингибитор, EI' – фосфорилированная холинэстераза, p' – уходящая группа, EI'' – фосфорилированная холинэстераза после «старения», p'' – продукт реакции «старения», k_1, k_{-1} и k_2 – константы скорости промежуточных стадий ингибирования холинэстеразы, k_3 – константа скорости «старения» холинэстеразы.

На рис. 3 представлена схема взаимодействия PhOV с холинэстеразой, предусматривающая возможные пути дальнейшего превращения фосфорилированного фермента: спонтанный гидролиз и «старение» [6].

Потеря ферментативной активности может происходить и в результате связывания аллостерического ингибитора с Р-участком. Такое явление, когда специфичное связывание лиганда с Р-участком замедляет вход в активный центр и выход из него другого лиганда, ацилирующего Ser каталитической триады, предложено называть стерической блокадой [17, 18].

На основе теории стерической блокады предложена новая стратегия защиты АСhE от необратимого ингибирования путем синтеза циклических лигандов, специфично связывающихся с Р-участком и блокирующих прохождение при этом PhOV в каталитический участок, но не препятствующих прохождению субстрата [15, 16].

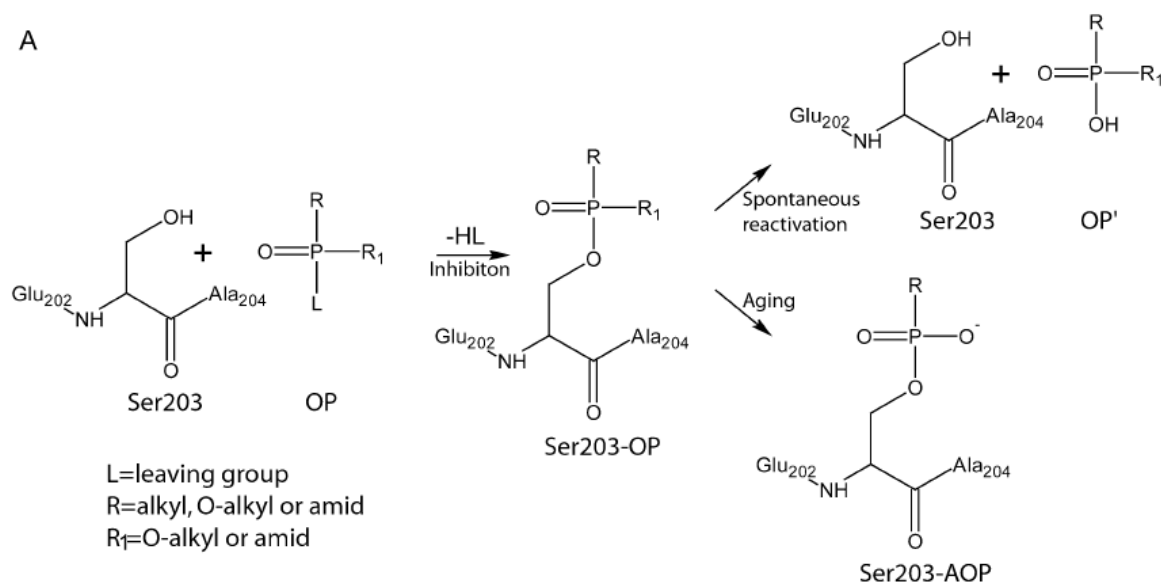


Рис. 3. Схема взаимодействия PhOV с холинэстеразой [6]

Разработка профилактического антидота против химических токсикантов с принципиально новым механизмом защитного действия

Исследования проводились в несколько этапов. На первом этапе было проведено молекулярное моделирование, раскрывшее широкие перспективы создания циклических соединений, которые могут быть использованы для реализации предлагаемой стратегии создания эффективного антидота [15].

Для установления оптимального местоположения гетероциклов относительно Р-участка АСhE было принято решение их связывать посредством производных метантиосульфониальной группы с остатками аминокислот Р-участка посредством образования дисульфидной связи.

Поскольку молекула АСhE не содержит свободных меркаптогрупп, была проведена модификация АСhE эритроцитов человека и получен мутант Н287С, Р-участок которого содержит три меркаптогруппы поблизости от входа в активный центр, для последующего связывания гетероцикла [15].

Преимущества такого связывания гетероцикла с Р-участком были подтверждены экспериментально на примере модифицированного мутанта Н287С с использованием шести раз-

личных соединений, включающих следующие катионы: триалкиламмоний, акридин и такрин с «поводком» различной длины.

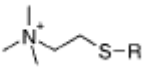
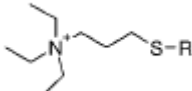
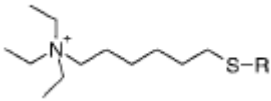
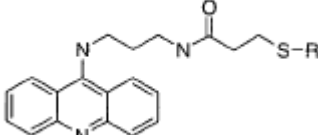
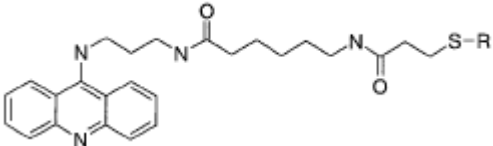
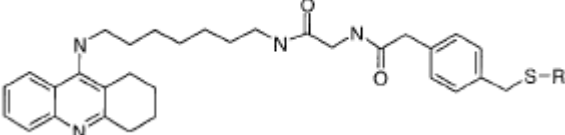
В табл. 2 представлены формулы лигандов, включенных на «поводке» в мутант Н287С MTS-реагентом, где MTS – метантиосульфониальная группа.

Модификация катионами на коротком «поводке» влияла незначительно на биокаталитические свойства модифицированного мутанта Н287С, но более длинный «поводок» приводил к снижению и скорости гидролиза субстрата, и сродства акридина к Р-участку.

Молекулярное моделирование показало, что катионоактивные лиганды с «поводками» промежуточной длины локализованы в Р-участке, тогда как с длинными – достигали А-участка. Эти оптимальные местоположения гетероциклов были подтверждены экспериментально кинетическим методом путем измерения значения константы ингибирования K_{12} комплекса мутанта Н287С пропидием и такрином, которые селективно связываются с Р- и А-участками, соответственно.

Значения константы ингибирования K_{12} пропидием и такрином мутанта Н287С, а также локализация лиганда в Н287С, модифицированного с использованием MTS-реагентов, представлены в табл. 3.

Таблица 2. Лиганды, включенные на «поводке» в мутант Н287С посредством MTS-реагента

I	
MTS-этил-2-(триметиламмоний)	
II	
MTS-пропил-3-(триэтиламмоний)	
III	
MTS-гексил-6-(триэтиламмоний)	
IV	
9-[N ^γ -(β-MTS-пропионил)-γ-аминопропиламино]-акридин	
V	
9-[N ^γ -(N ^γ -β-MTS-пропионил-ε-аминокапроил)-γ-аминопропиламино]-акридин	
VI	
9-[(4-MTS-метил-фенилацетил)-глицил-7*-амидогептил]-амино-1,2,3,4-тетрагидроакридин	

Константы ингибирования обратимыми ингибиторами, приведенные в табл. 3, определялись с использованием следующей формулы:

$$\frac{v_{I=0}}{v} \approx \frac{z_{I=0}}{z} = B \left[\frac{(1 - R_2) \left(1 + \frac{\alpha[I]}{K_1}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right)} + \frac{R_2 \left(1 + \frac{\alpha_2[I]}{K_{12}}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{12}}\right)} \right]^{-1}$$

где $V_{I=0}$ – скорость ферментативного гидролиза субстрата в отсутствии ингибитора, V – в присутствии ингибитора. При низких концентрациях субстрата скорость его гидролиза может быть определена как реакция второго порядка, константа скорости которой обозначена в формуле как z . В отсутствии ингибитора константа имеет обозначение $z_{I=0}$, в присутствии ингибитора – z . K_1 – константа диссоциации комплекса фермента с ингибитором, α – отношение констант скорости реакции в присутствии и отсутствии ингибитора; K_1 и α соответствуют немодифицированному ферменту, K_{12} и α_2 соответствуют модифицированному ферменту. R – вклад в общую активность, внесенный в отсутствие ингибитора. B – коэффициент корреляции значимости точки $V_{I=0}$ – составлял $0,99 \pm 0,06$.

Значения K_{12} для пропидия, приведенные в табл. 3, увеличились в 30 и более раз по сравнению со значением константы для немодифицированного мутанта Н287С, в зависимости от длины «поводка»: промежуточной длины или длинного, соответственно, что позволяет сделать заключение об увеличении сродства этого аллостерического ингибитора к Р-участку. Напротив, значение K_{12} для такрина увеличивалось существенно только в случае, когда лиганды имели длинные «поводки».

Установленные таким методом зависимости изменения сродства к Р-участку от длины «поводка» для пропидия и такрина использовались в последующих исследованиях.

Для разработки опытного профилактического антидота использовались циклические пептиды, поскольку они имеют множество преимуществ [16]. Во-первых, циклическая молекула – кольцо с отверстием, которое теоретически может связываться с высоким сродством и специфичностью с Р-участком и таким образом блокировать проход к участку ацилирования крупной молекулы PhOV при том, что сохраняется возможность проникновения через него

Таблица 3. Константы ингибирования пропидием и такрином мутанта H287C, модифицированного MTS-реагентом, а также локализация в нем лиганда

H287C, модифицированная	K ₁₂ , мкМ для пропидия	K ₁₂ , мкМ для такрина	Расстояние от Asp74, Å
I	2,1±0,3	0,16±0,07	10,4±0,6
II	1,2±0,8	0,17±0,08	8,7±0,2
III	16±7	0,11±0,02	4,9±0,1
IV	54±31	0,67±0,15	3,7±0,6
V	30±9	4,8±0,3	10,1±0,3
VI	11±4	14±8	

меньшего по размеру ацетилхолина. Анализ литературных данных на примере AChE *Drosophila* показывает, что можно несколько поступиться незначительным снижением при этом скорости гидролиза субстрата в нейромускульных переходах (до 90%), не причиняя неблагоприятных физиологических эффектов. Теоретические расчеты показали, что относительно небольшие циклические соединения, соответствующие циклическому октапептиду, имеют размер, позволяющий проникать через них ACh. Во-вторых, известны методы синтеза большого числа циклических полипептидов и их аналогов различных размеров [16].

На следующем этапе методом компьютерного моделирования проводились расчеты с целью создания модели циклического пептида с большим сродством к Р-участку с учетом опыта связывания с Р-участком AChE циклических пептидов – аналогов природных ядов, в частности, *fasciculin*.

На основе предварительного литературного анализа библиотеки циклических пептидов были отобраны четыре следующие перспективные аминокислотные последовательности: цикло(Arg-D,L-Arg-D,L-Ser-Pro-Pro-Lys-Pro-Asn) (обозначенный как 17-1) и цикло(Arg-D,L-Ser-D,L-Arg-Pro-Pro-Lys-Pro-Asn) (обозначенный как 18-1), а также циклические пептиды с аминокислотной последовательностью цикло(Arg-D,L-Pro-D,L-Tyr-Pro-Pro-Lys-Pro-Asn) (обозначенный как 15-1) и цикло(Arg-D,L-Tyr-D,L-Pro-Pro-Pro-Lys-Pro-Asn) (обозначенный как 16-1). Приведенные аминокислотные последовательности также были синтезированы в виде четы-

рех альтернативных стереоизомеров во второй и третьей позициях. Результаты с образцами 17-1 и 18-1 оказались более перспективными. Эти два образца давали схожие результаты при воздействии и пропидием, и *fasciculin*. Результаты исследова-

ний для обеих последовательностей показали снижение значения константы диссоциации К для комплекса *fasciculin* с модифицированным ферментом H287C, по сравнению с немодифицированным. Эти результаты подтверждают расположение этих пептидов в Р-участке мутанта H287C.

Для повышения эффективности молекулярного моделирования был проведен синтез циклических пептидов, в которых цепь со стороны лизина ковалентно связана с метантиосульфониальной группой.

Синтезированные производные циклопептидов были использованы для модификации мутанта H287C. Полученные таким образом модификации мутанта H287C, блокировавшие доступ PhOV к каталитической триаде, были отобраны методом аффинной хроматографии с использованием акридина для связывания и разделения фракций, которые затем были исследованы на сродство к Р- и А-участкам путем измерения констант диссоциации к комплексам H287C с пропидием и такрином.

Для независимого измерения концентрации модифицированных ацетилхолинэстераз была введена метка путем метилирования [³H]формальдегидом.

В результате проведенных исследований получены модифицированные гетероциклами мутанты, существенно блокирующие фосфорилирование Ser каталитической триады.

На основе проведенного компьютерного моделирования авторы считают возможным в последующих исследованиях отказаться от «по-

водка» при условии высокого сродства циклического пептида к Р-участку.

Авторы приведенных выше данных планируют продолжить исследования по созданию более эффективных профилактических антидотов на основе предложенной ими стратегии, отличающейся принципиально новым механизмом защитного действия.

Список литературы

1. Лошадкин, Н.А., Курляндский, Б.А., Беженарь, Г.В., Дарьина, Л.В. Отравляющие вещества нервно-паралитического действия // В кн.: Военная токсикология. Под ред. Б.А. Курляндского. – М.: Медицина, 2006 – С. 69–91.
2. Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P. *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 68. – P. 2237.
3. Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., Velan, B. *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 318. – P. 833–840.
4. Barak, D., Ordentlich, A., Segall, Y., Velan, B., Benschop, H.P., De Jong, L.P., Shafferman, A. *J. Amer. Chem. Soc.* – 1997. – Vol. 119. – P. 3157–3158.
5. Viragh, C., Kovach, I.M., Pannell, L. *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 9557–9561.
6. Hornberg, A., Tunemalm, A., Ekstrom, F. *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46. – P. 4815.
7. Kovarik, Z., Radic, Z., Berman, H.A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P. *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 373. – P. 33–40.
8. Ordentlich, A., Barak, D., Sod-Moriah, G., Kaplan, D., Mizrahi, D., Segall, Y., Kronman, C., Karton, Y., Lazar, A., Marcus, D., Velan, B., Shafferman, A. *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43. – P. 11255–11265.
9. Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Benschop, H.P., De Jong, L.P., Ariel, N., Barak, R., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A. *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 3055–3066.
10. Wong, L., Radic, Z., Bruggemann, R.J., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P. *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 5750–5757.
11. Лошадкин, Н.А., Голденков, В.А., Дикий, В.В., Пушкин, И.А., Дружинин, А.А., Рембовский, В.Р., Дарьина, Л.В., Хохоев, Т.Х. *Рос. хим. ж.* – 2002. – Т. XLVI. – С. 46.
12. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. – Типография Технического секретариата Организации по запрещению химического оружия, Гаага, Нидерланды, 8.08.1994.
13. Luo, C., Leader, H., Radic, Z., Maxwell, D.M., Taylor, P., Doctor, B.P., Saxena, A. *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66. – P. 387–392.
14. Szinicz, L., Worek, F., Thiermann, H., Kehe, K., Eckert, S., Eger, P. *Toxicology.* – 2007. – Vol. 233. – P. 23–30.
15. Johnson, J.L., Cusack, B., Hughes, T.F., McCullough, E.H., Faug, A., Rosenberry, T.L. *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 38948.
16. Cusack, B., Romanovskis, P., Johnson, J.L., Etienne, G., Rosenberry, T.L. *Chem.-Biol. Interact.* – 2005. – Vol. 157–158. – P. 370.
17. Mallender, W.D., Szegletes, T., Rosenberry, T.L. *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 7753–7763.
18. Szegletes, T., Mallender, W.D., Rosenberry, T.L. *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37. – P. 4206–4216.
19. Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the Commission on Biochemical Nomenclature of the Nomenclature and Classification of Enzymes. – Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1973.
20. Silver, A. *The Biology of Cholinesterases.* – Amsterdam, 1974. – P. 576.
21. Chatonnet, A., Lockrige, O. *Biochem. J.* – 1989. – Vol. 260. – P. 625–634.
22. Giacobini, E. *Neurochem. Res.* – 2003. – Vol. 28. – P. 515–522.
23. Girard, E., Bernard, V., Minic, J. *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80. – P. 2380–2385.
24. US Patent No. 5807671. Publication date 09.15.1998.
25. Gorelick, D.A. *Drug and Alcohol Depend.* – 1997. – Vol. 48. – P. 159–165.
26. Rosenberry, T.L., Johnson, J.L., Cusack, B., Thomas, J.L., Emani, S., Venkatasubban, K.S. *Chem.-Biol. Interact.* – 2005. – Vol. 157–158. – P. 181–189.