



Оценка риска формирования промежуточного синдрома при отравлениях фосфорорганическими соединениями с использованием молекулярного докинга

Н.И. Бурцева, М.А. Тюнин, А.С. Гоголевский, С.В. Чепур

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург

Контактная информация: Бурцева Надежда Игоревна, nadyn.baranova@gmail.com

В исследовании проведен молекулярный докинг взаимодействия фосфорорганических пестицидов с ацетилхолинэстеразой и нервно-мышечным Н-холинорецептором. Установлена корреляция между величинами скоринг-функции и физико-химическими параметрами веществ с вероятностью развития промежуточного синдрома. Показано, что сродство фосфорорганических соединений к активному центру α -субъединицы постсинаптического Н-холинорецептора нервно-мышечного синапса определяет вероятность развития промежуточного синдрома.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, молекулярный докинг, промежуточный синдром, математическое моделирование, корреляционно-регрессионный анализ.

Введение

Фосфорорганические соединения (ФОС) до настоящего времени широко применяются в сельском хозяйстве в качестве инсектицидов. В некоторых зарубежных странах ФОС продолжают оставаться одной из основных причин острых отравлений как среди работников сельского хозяйства, так и среди населения, использующего данные препараты в быту в качестве инсектицидов, а также при случайном или преднамеренном приёме внутрь [1]. В настоящее время в клиническом течении отравлений ФОС выделяют три фазы: холинэргический криз, промежуточный синдром и отдалённая полинейропа-

тия [2]. Под промежуточным синдромом (ПС) подразумевают совокупность клинических проявлений в виде слабости и параличей мышц шеи, мышц, иннервируемых черепными нервами, проксимальных мышц конечностей и дыхательных мышц, в т.ч. диафрагмы. Наиболее тяжелое течение ПС характеризуется параличом дыхательных мышц и, как следствие, прогрессированием дыхательной недостаточности [6]. Актуальность исследования механизмов ПС определяется тем, что наряду с холинэргическим кризом он остается одной из основных причин смертности при острых отравлениях ФОС. По данным различных клинических исследований,

ПС проявляется в 10-68% отравлений ФОС в зависимости от вида токсиканта [1, 2, 4, 6].

Патогенез ПС остается до конца не ясным. В качестве основного патогенетического механизма ПС рассматривается развитие деполяризующего нервно-мышечного блока с десенситизацией постсинаптических Н-холинорецепторов, предположительно вызванного воздействием избыточного количества ацетилхолина в результате блокады ацетилхолинэстеразы, или прямого Н-холиномиметического действия ФОС [3].

Цель данной работы состояла в изучении связи «структура ФОС – активность» в отношении развития ПС с использованием современных хемоинформатических инструментов, включающем определение корреляционных отношений между основными физико-химическими дескрипторами и вероятностью развития ПС.

Материалы и методы

Для достижения цели исследования был проведен молекулярный докинг взаимодействия 15-ти коммерческих пестицидов из группы ФОС, для которых известны клинические данные о развитии ПС: диметоат, фентион, метамидофос, метилпаратион, монокротофос, паратион, малатион, хлорпирифос, оксидеметон-S-метил, параксон, ометоат, фенитротрион, деметон, дисульфотон. Молекулярный докинг включал оценку взаимодействия выбранных ФОС с ацетилхолинэстеразой (АХЭ) человека (4PQE) и нервно-мышечным Н-холинорецептором *Torpedo marmorata* (2BG9), структуры которых были взяты из базы

данных rcsb.org и загружены в формате pdb. Для проведения докинга в качестве инструмента был использован электронный сервис mcule.com. Структуры исследуемых соединений загружали с помощью InChI-кода или вводили графически с помощью Marvin-апплета. На основании справочных данных перед проведением докинга были определены активные центры белков: Ser203 для АХЭ [7] и Thr119 для α -субъединицы Н-холинорецептора [5]. Выбранные активные центры АХЭ и α -субъединицы Н-холинорецептора были оптимизированы под ацетилхолин. По результатам докинга определяли значение оценочной функции для четырех наиболее энергоэффективных состояний комплекса лиганд-белок.

Значения коэффициента распределения «н-октанол-вода» ($\log P$) и среднелетальных доз у крыс при пероральном введении (LD_{50}) для исследованных ФОС были взяты из базы ChemIDplus, доступной с помощью сайта toxnet.nlm.nih.gov. Значения молярных масс пестицидов были рассчитаны с помощью программного продукта ACD Labs 10.0. Математический анализ проводили с помощью автоматического онлайн-расчетчика (<http://math.semestr.ru>).

Результаты и их обсуждение

Результаты молекулярного докинга показали, что взаимодействие всех исследованных ФОС с АХЭ происходит одинаково: вещества взаимодействуют с ключевыми аминокислотами активного центра фермента, и величина оценочной функции (ОФ) связывания с АХЭ практически не отличается.

Напротив, характер взаимодействия с Н-холинорецептором для исследован-

ных органофосфатов различался. Ряд веществ – в частности, хлорпирифос, фенитротион, паратион, метилпаратион – отличало большое сродство к α -субъединице Н-холинорецептора, что проявлялось образованием устойчивого комплекса с активным центром подобно ацетилхолину. Для других веществ

– например, метамидофос, оксидеметон-S-метил, деметон – взаимодействие с рецептором было энергетически неэффективным или связывание осуществлялось вне активного центра (рис. 1-3).

Сводные данные по результатам молекулярного докинга и их анализ представлены в таблице.

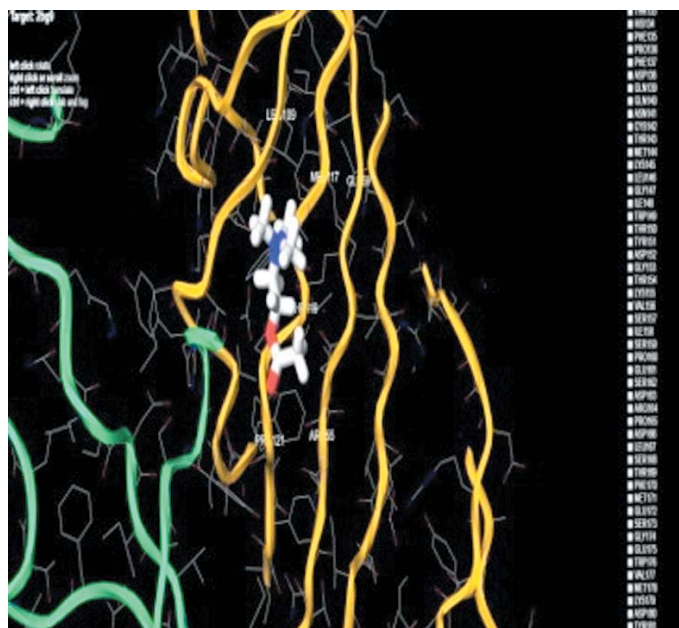


Рис. 1. Оптимизация связывания ацетилхолина с активным центром α -субъединицы Н-холинорецептора.

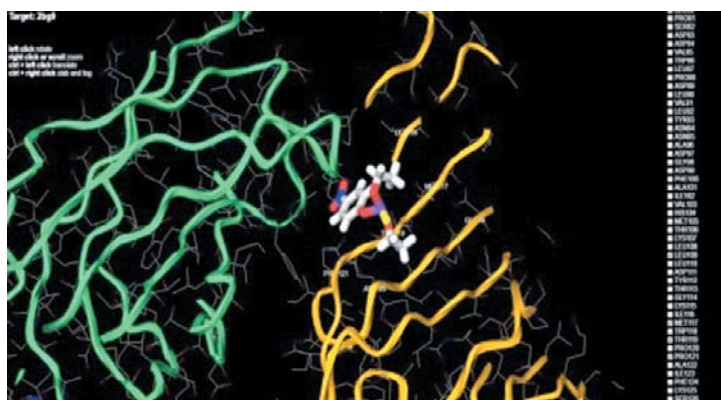


Рис. 2. Эффективное связывание паратиона с α -субъединицей Н-холинорецептора.



Рис. 3. Слабое связывание деметона с α -субъединицей Н-холинорецептора.

Таблица

Сводные данные по антихолинэстеразным пестицидам

№ п/п	Название вещества	Характеристики ФОС					
		Оце- ночная функция связыва- ния с Н- холиноре- цептором, Дж/моль	Оценочная функция связыва- ния с АХЭ, Дж/моль	Коэф- фициент распре- деления «н-ок- танол- вода» (logP)	Мо- лярная масса, г/моль	LD50 для крыс при перо- ральном введе- нии, мг/кг	Ве- роят- ность фор- миро- вания ПС*
		x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	y
1.	Диметоат	-3,4 – -4,1	-4,2 – -4,8	0,78	229,3	60	1
2.	Фентион	-3,9 – -4,1	-3,2 – -3,8	4,09	278,3	180	1
3.	Метамидофос	-2,8 – -3,5	-3,3 – -3,5	-0,82	141,1	7,5	1
4.	Метилпаратион	-4,0 – -4,4	-3,3 – -4,6	2,86	263,2	6,01	1
5.	Монокротофос	-3,6 – -4,2	-4,7 – -5,0	-0,2	223,2	8	1
6.	Паратион	-4,1 – -4,4	-3,9 – -4,9	3,83	291,3	2	1
7.	Малатион	-3,5 – -4,1	-3,9 – -5,1	2,36	330,4	290	0
8.	Хлорпирифос	-4,0 – -4,8	-5,9 – -6,5	4,96	350,6	82	1
9.	Оксидеметон-S-метил	-3,3 – -3,6	-3,8 – -4,3	0,67**	262,4	48	0
10.	Параоксон	-4,0 – -4,4	-3,6 – -5,1	1,98	275,2	1,8	1
11.	Ометоат	-3,6 – -4,1	-4,0 – -4,8	-0,74	213,2	30	1
12.	Фенитротион	-4,1 – -5,0	-2,9 – -3,4	3,3	277,2	250	1
13.	Деметон	-2,9 – -4,0	-4,3 – -4,8	3,21	258,3	1,7	0
14.	Дисульфотон	-2,9 – -3,7	-3,7 – -4,4	4,02	274,4	2,6	0
15.	Мевинфос	-2,4 – -3,8	-4,8 – -5,3	0,13	224,1	3	0

Примечания: * – на основании опубликованных данных о клинических случаях развития ПС для конкретного пестицида, наличие фактов развития ПС принимали за «единицу», отсутствие – как «ноль»;

** – предсказанное значение (ACD Labs 10.0).

На основании характеристик пестицидов была сформирована база данных, содержащая следующие параметры: наиболее энергоэффективные (максимальные по модулю) скоринг-функции для комплексов с Н-холинорецептором (x_1) и ацетилхолинэстеразой (x_2), коэффициент распределения «н-октанол-вода» - $\log P$ (x_3), молярные массы (x_4) и ЛД₅₀ (x_5). Наличие клинических данных о развитии ПС для конкретного пестицида принимали за «единицу», отсутствие обозначали как «ноль».

Для исследования влияния факторов (x_{1-5}) на развитие ПС (y) был проведён многомерный корреляционно-регрессионный анализ при $p=0,05$. В результате было получено уравнение регрессии $y = -1,98 - 1,08x_1 - 0,013x_2 + 0,0364x_3 - 0,00759x_4 - 0,000261x_5$. Для уравнения величина множественного коэффициента корреляции R составила 0,784, что свидетельствовало о сильной связи между эффектом (y) и факторами (x_i) по шкале Чеддока. Качество уравнения множественной регрессии оценивали, рассчитывая F -критерий и сравнивая его с табличным значением распределения Фишера-Снедекора. Поскольку фактическое значение $F < F_{кр}$, то коэффициент детерминации был статистически не значим, а уравнение регрессии статистически ненадежно.

Из исследованных факторов (x_{1-5}) наибольший вклад вносила величина ОФ связывания с Н-холинорецептором (x_1) (значение частного коэффициента корреляции $r=-0,54$, средняя ошибка аппроксимации $A=14,41\%$). При анализе коллинеарности факторов было установлено, что парные коэффициенты корреляции $r_{24}=-0,569$, что свидетельствовало о наличии средней связи, и

$r_{34}=-0,809$, что свидетельствовало о сильной связи между факторами. Таким образом, полученное уравнение характеризовалось мультиколлинеарностью, что подтверждалось расчётами критерия χ^2 и F -критерия Фишера. Расчёт частных коэффициентов эластичности показал, что существенное влияние на вероятность развития ПС оказывают факторы x_1 и x_2 , тогда как по результатам расчёта t -критерия Стьюдента была выявлена существенная связь только между y и x_1 .

На основании вышеизложенного был сделан вывод о наличии связи между развитием ПС и величиной ОФ связывания ФОС с Н-холинорецептором, а остальные параметры не определяли развитие эффекта. Вследствие этого было принято решение о проведении корреляционного анализа между вероятностью наступления ПС и величиной скоринг-функции связывания ФОС с Н-холинорецептором по методу наименьших квадратов. Гомоскедатичность была доказана при помощи теста ранговой корреляции Спирмэна и теста Голдфелда-Квандта. В результате было получено уравнение регрессии $y = -0,6343x - 1,9636$ ($r=-0,54$ – связь средняя обратная; $R^2=0,29$). Расчёт критерия Стьюдента позволил сделать вывод о том, что коэффициент корреляции статистически значим. Существенное влияние x на y подтверждалось также значением коэффициента эластичности $E=3,95$. Статистическая достоверность подтверждалась t - и F -статистикой. Средняя ошибка аппроксимации $A=19,59\%$.

Анализируя полученное уравнение, можно предположить наличие порогового значения оценочной функции связыва-

вания ФОС с Н-холинорецептором, которое может быть использовано в качестве маркера развития ПС. Так, решив уравнение для $p < 0,05$, т.е. вероятности развития эффекта более 95%, получается, что величина скоринг-функции для комплексов органофосфатов с Н-холинорецептором, при которых развивается ПС, должна составлять не менее 4,6 Дж/моль.

Выводы

В результате проведённых исследований было подтверждено прямое Н-холинотропное действие некоторых пестицидов из группы ФОС методом молекулярного докинга. Была установлена прямая зависимость между величиной рассчитанной скоринг-функции и вероятностью формирования промежуточного синдрома. Данный *in silico* анализ может быть использован для оценки риска возникновения ПС при отравлении различными по структуре ФОС.

Список литературы

1. **Прозоровский В.Б., Ченур С.В.** Новые данные о несинаптических (дистантных) эффектах фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы // Токсикологический вестник. 2001. № 4. С. 2-7.
2. **Ченур С.В.** Отдалённые органофосфатные нейропатии: патогенез, профилактика и лечение // Токсикологический вестник. 2010. № 3. С. 42-43.
3. **De Wilde V., Vogelaers D., Colardyn F., Vanderstraeten G., Van der Neucker K., De Blucker J.** Postsynaptic neuromuscular dysfunction in organophosphate induced intermediate syndrome // Klin. Wochenschr. 1991. Vol. 69. No. 4. P. 177-183.
4. **Karalliedde L., Wheeler H., Maclehorse R., Murray V.** Possible immediate and long-term health effects following exposure to chemical warfare agents // Public Health. 2000. Vol. 114. No. 4. P. 238-248.

5. **Lena C., Changeux J.P.** Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor // Trends Neurosci. 1993. Vol. 16. No. 5. P. 181-186.
6. **Senanyake N., Karalliedde L.** Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome // N. Engl. J. Med. 1987. Vol. 316. No. 13. P. 761-763.
7. **Shen T., Tai K., Henschman R.H., McCammon J.A.** Molecular dynamics of acetylcholinesterase // Acc. Chem. Res. 2003. Vol. 35. No. 6. P. 332-340.

References

1. **Prozorovskij V.B., Chepur S.V.** Novye dannye o nesinapticheskikh (distantnyh) effektah fosfororganicheskikh ingibitorov holinesterazy // Toksikologicheskij vestnik. 2001. № 4. S. 2-7.
2. **Chepur S.V.** Otdalyonnye organofosfatnye nejropatii: patogenez, profilaktika i lechenie // Toksikologicheskij vestnik. 2010. № 3. S. 42-43.
3. **De Wilde V., Vogelaers D., Colardyn F., Vanderstraeten G., Van der Neucker K., De Blucker J.** Postsynaptic neuromuscular dysfunction in organophosphate induced intermediate syndrome // Klin. Wochenschr. 1991. Vol. 69. No. 4. P. 177-183.
4. **Karalliedde L., Wheeler H., Maclehorse R., Murray V.** Possible immediate and long-term health effects following exposure to chemical warfare agents // Public Health. 2000. Vol. 114. No. 4. P. 238-248.
5. **Lena C., Changeux J.P.** Allosteric modulation of the nicotinic acetylcholine receptor // Trends Neurosci. 1993. Vol. 16. No. 5. P. 181-186.
6. **Senanyake N., Karalliedde L.** Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome // N. Engl. J. Med. 1987. Vol. 316. No. 13. P. 761-763.
7. **Shen T., Tai K., Henschman R.H., McCammon J.A.** Molecular dynamics of acetylcholinesterase // Acc. Chem. Res. 2003. Vol. 35. No. 6. P. 332-340.

Assessment of risk of formation of the intermediate syndrome in poisonings with organophosphates using molecular docking

N.I. Burtseva, M.A. Tyunin, A.S. Gogolevskiy, S.V. Chepur

The molecular docking of interaction of organophosphorus pesticides with acetylcholinesterase and neuromuscular N-cholinergic receptors was conducted. The correlation between the values of the scoring function and physicochemical parameters of substances with a probability of intermediate syndrome was set. It was shown that the affinity of organophosphates to the active center of the alpha-subunit of the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor N-neuromuscular synapse determines the probability of intermediate syndrome.

Key words: organophosphates, molecular docking, intermediate syndrome, mathematical modelling, correlation and regression analysis.