

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ ИОНИЗАЦИИ ОКСИМОВ – РЕАКТИВАТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Т. В. Шефер*, А. А. Тяптин, Т. Б. Печурина

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины,
195043, Санкт-Петербург, Лесопарковая ул., 4; *e-mail: schaffer@yandex.ru

Целью работы являлось определение значений констант ионизации оксимов – реактиваторов холинэстераз в водных растворах при различной температуре. Спектротрически определены длины волн излучения в диапазоне от 190 нм до 450 нм, соответствующие максимумам поглощения протонированных и депротонированных оксимных групп, значения молярных коэффициентов светопоглощения различных форм и констант ионизации оксимов – реактиваторов холинэстераз (изонитрозин, прапидоксим, дипироксим, токсогонин, метоксим, карбоксим и азоксим) в растворах (рН 5–12) при температуре 20°C, 25°C и 37°C. Установлено, что доля нуклеофильных форм, участвующих в оксим-индуцированной реактивации фосфорилированных холинэстераз, положительно зависит от рН и температуры среды. Предложена гипотеза о влиянии температуры на реактивирующую способность оксимов в отношении фосфорилированных холинэстераз.

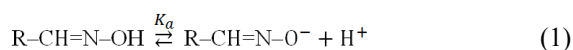
Ключевые слова: оксимы; спектры поглощения; протолитическая диссоциация; константы ионизации; влияние температуры

DOI: 10.18097/BMCRM00097

ВВЕДЕНИЕ

Применение оксимов при лечении отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) направлено главным образом на дефосфорилирование холинэстераз и восстановление их гидролитической активности в отношении ацетилхолина. Оксим-индуцированная реактивация начинается с нуклеофильной атаки оксимат-иона на фосфорилированный остаток серина активного центра холинэстеразы. Скорость этой реакции прямо пропорциональна концентрации оксимат-ионов, а коэффициент пропорциональности (константа скорости реакции) зависит от структуры оксима, природы фермента, структуры фосфорильного остатка, ковалентно связанного с остатком серина активного центра, а также температуры и состава среды (рН, ионный состав) [1].

В растворах монооксимов находятся в протолитическом равновесии две формы – протонированная и оксимат-ион:



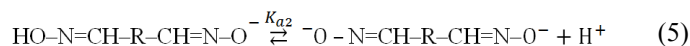
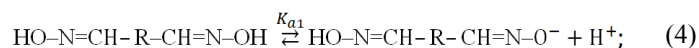
или



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{Ox}^-]}{[\text{OxH}]}, \quad (3)$$

где K_a – константа ионизации; $[\text{H}^+]$, $[\text{Ox}^-]$ и $[\text{OxH}]$ – концентрации протонов, оксимат-иона и протонированной формы оксима, соответственно.

Диоксими в растворах могут пребывать в трёх формах, находящихся в равновесии – дипротонированной, монопротонированной и депротонированной:



или



$$K_{a1} = \frac{[\text{H}^+][\text{OxH}^-]}{[\text{OxH}_2]}; \quad (8)$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{H}^+][\text{Ox}^{2-}]}{[\text{OxH}^-]}; \quad (9)$$

где K_{a1} и K_{a2} – константы ионизации; $[\text{H}^+]$, $[\text{Ox}^{2-}]$, $[\text{OxH}^-]$ и $[\text{OxH}_2]$ – концентрации протонов, депротонированной, монопротонированной и дипротонированной форм оксима, соответственно.

Известно, что константы ионизации варьируют с изменением температуры различно для разных веществ [2], а влияние температуры на величины констант ионизации оксимов остаётся неизвестным. Следует заметить, что большинство авторов исследуют кислотно-основные свойства оксимов *in vitro*, как правило, при температуре 25°C [3–5], а их реактивирующую способность в отношении фосфорилированных ферментов – при 37°C [6]. В результате сопоставление данных, полученных в таких разных условиях, представляется не совсем корректным.

Таким образом, целью работы было определение значений констант ионизации оксимов – реактиваторов холинэстераз в водных растворах при различной температуре.

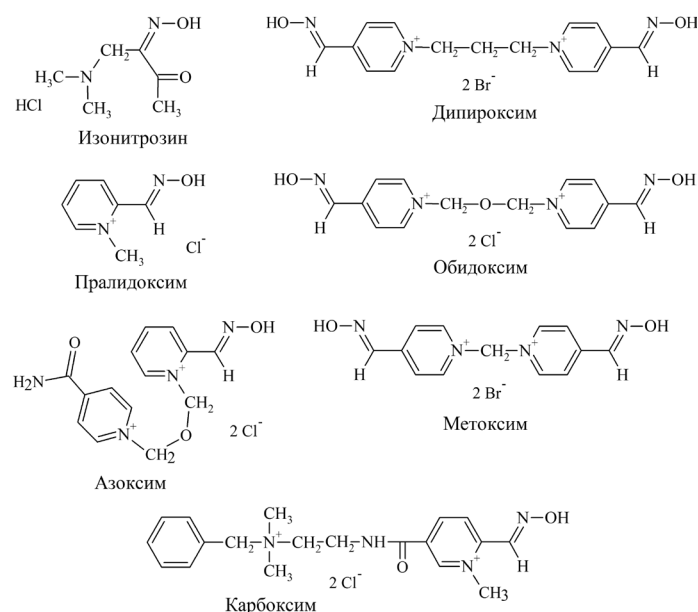
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанции оксимов (рис. 1), синтезированные в Государственном научно-



Таблица 1. Длины волн излучения, соответствующие максимумам поглощения (λ_{max}) протонированных и депротонированных оксимных групп, нм

Оксим	λ_{max}	
	протонированной формы	оксимат-иона
Изонитрозин	228	278
Пралидоксим	294	336
Дипиридоксим	282	344
Токсогонин	284	352
Метоксим	298	376
Карбоксим	306	356
Азоксим	302	354

**Рисунок 1.** Структурные формулы оксимов – реактиваторов холинэстераз.

исследовательском испытательном институте военной медицины МО РФ Л.В. Павловой и И.В. Лагодой; доля основного вещества составляла не менее 98%.

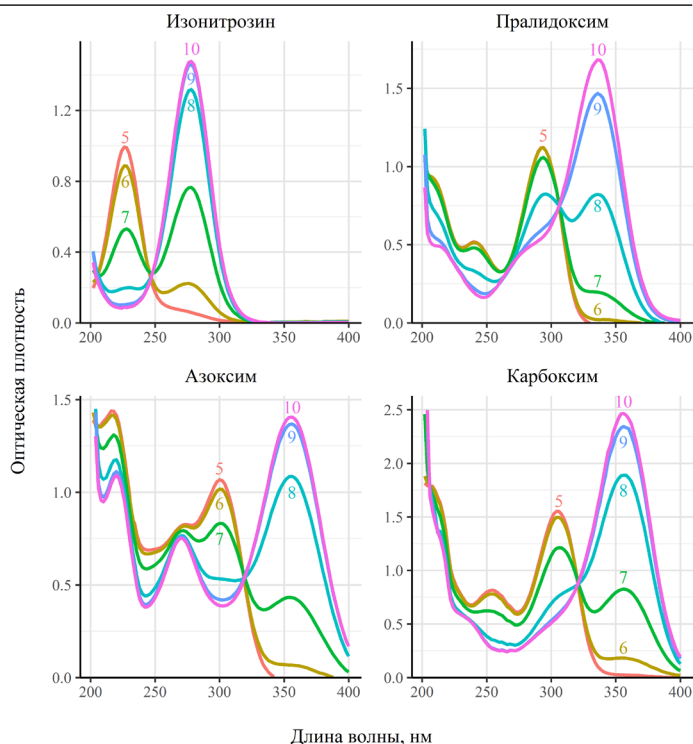
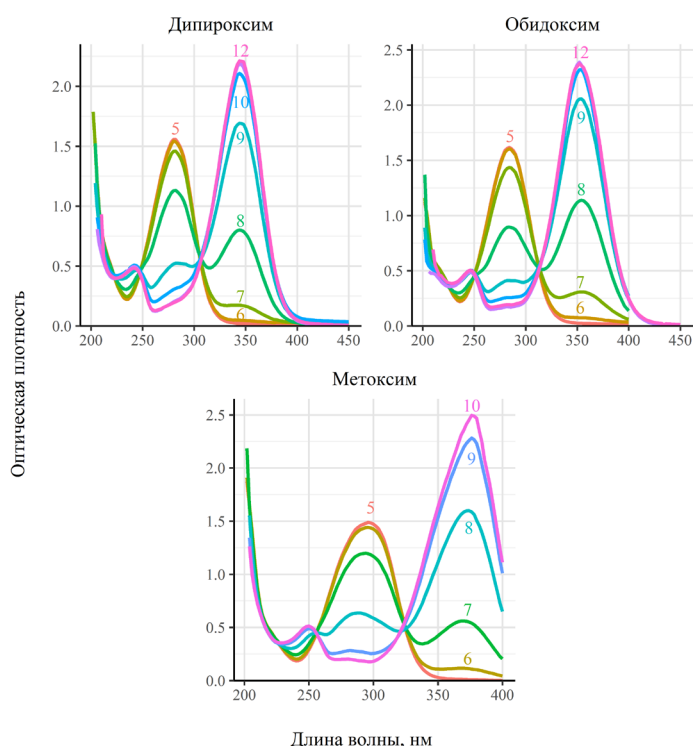
Буферные растворы с pH 5–8 готовили, смешивая 0.05 М растворы KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 . Буферные растворы с pH 9–12 получали, добавляя к фосфатному буферу (pH 8) 1 н. раствор NaOH.

Конечная концентрация монооксимов в растворах составляла $5.0 \cdot 10^{-5}$ М или $1.0 \cdot 10^{-4}$ М, биспиридиновых диальдоксимов – $2.5 \cdot 10^{-5}$ М или $5.0 \cdot 10^{-5}$ М.

Оптическую плотность растворов оксимов температурой 20°C, 25°C или 37°C регистрировали с помощью спектрофотометра Hitachi U2300 при длине оптического пути 1 см, длине волны (λ) от 190 нм до 450 нм против соответствующего буферного раствора той же температуры.

Значения длин волн максимумов поглощения определяли визуально, анализируя графики зависимости оптической плотности от длины волны.

Статистическую обработку и визуализацию данных выполняли в среде статистического программирования R [7,8].

**Рисунок 2.** Спектры светопоглощения монооксимов ($1.0 \cdot 10^{-4}$ М, 37°C) в растворах с различным pH (числа у графиков – значения pH).**Рисунок 3.** Спектры светопоглощения биспиридиновых диальдоксимов ($5.0 \cdot 10^{-5}$ М, 37°C) в растворах с различным pH (числа у графиков – значения pH).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электронные спектры поглощения каждого из исследованных оксимов содержали две основные полосы поглощения, величины амплитуды которых существенно зависели от pH среды (примеры спектров, полученных при температуре 37°C, представлены на рисунках 2 и 3).

Таблица 2. Молярные коэффициенты светопоглощения ϵ форм монооксидов при λ_{max} оксимат-ионов и константы их ионизации в водных растворах при различной температуре, $M \pm m$

Оксим	Температура, °C	$\epsilon, M^{-1} \cdot cm^{-1}$		$K_a, 10^{-8} M$	pK_a
		Ox ⁻	HOx		
Изонитрозин	20	14 680 $\pm$ 109	578 $\pm$ 127	6.10 $\pm$ 0.34	7.21 $\pm$ 0.02
	25	14 456 $\pm$ 107	584 $\pm$ 130	7.00 $\pm$ 0.40	7.16 $\pm$ 0.02
	37	14 715 $\pm$ 114	682 $\pm$ 147	9.76 $\pm$ 0.59	7.01 $\pm$ 0.03
Пралидоксим	20	17 116 $\pm$ 231	372 $\pm$ 164	0.68 $\pm$ 0.05	8.16 $\pm$ 0.03
	25	16 663 $\pm$ 192	282 $\pm$ 140	0.77 $\pm$ 0.05	8.11 $\pm$ 0.03
	37	16 813 $\pm$ 210	320 $\pm$ 159	0.94 $\pm$ 0.07	8.03 $\pm$ 0.03
Азоксим	20	14 531 $\pm$ 177	295 $\pm$ 168	2.57 $\pm$ 0.22	7.59 $\pm$ 0.04
	25	14 495 $\pm$ 156	323 $\pm$ 151	2.78 $\pm$ 0.21	7.56 $\pm$ 0.03
	37	14 104 $\pm$ 148	287 $\pm$ 158	4.08 $\pm$ 0.32	7.39 $\pm$ 0.03
Карбоксим	20	24 506 $\pm$ 384	964 $\pm$ 377	2.97 $\pm$ 0.34	7.53 $\pm$ 0.05
	25	24 057 $\pm$ 278	569 $\pm$ 280	3.39 $\pm$ 0.22	7.47 $\pm$ 0.03
	37	24 091 $\pm$ 316	615 $\pm$ 343	4.34 $\pm$ 0.42	7.36 $\pm$ 0.04

Таблица 3. Молярные коэффициенты светопоглощения ϵ форм биспиридиновых диальдоксидов при λ_{max} оксимат-ионов и константы их ионизации в водных растворах при различной температуре, $M \pm m$

Температура, °С	$\varepsilon, \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$			$K_{a1}, 10^{-8} \text{ М}$	$K_{a2}, 10^{-9} \text{ М}$	pK_{a1}	pK_{a2}
	Ox^{2-}	HOx^{-}	H_2Ox				
Дипироксим							
20	$44\,342 \pm 222$	$16\,725 \pm 712$	436 ± 174	1.38 ± 0.09	1.31 ± 0.06	7.86 ± 0.03	8.88 ± 0.02
25	$44\,163 \pm 204$	$16\,782 \pm 391$	201 ± 100	1.74 ± 0.07	1.53 ± 0.05	7.76 ± 0.02	8.82 ± 0.01
37	$44\,001 \pm 184$	$16\,772 \pm 559$	507 ± 156	2.16 ± 0.12	2.04 ± 0.09	7.67 ± 0.02	8.69 ± 0.02
Обидоксим							
20	$47\,263 \pm 161$	$19\,832 \pm 814$	271 ± 203	2.71 ± 0.19	2.49 ± 0.13	7.57 ± 0.03	8.60 ± 0.02
25	$47\,243 \pm 165$	$19\,950 \pm 776$	240 ± 183	2.88 ± 0.18	2.82 ± 0.14	7.54 ± 0.03	8.55 ± 0.02
37	$47\,170 \pm 204$	$19\,918 \pm 1050$	494 ± 241	3.69 ± 0.31	3.48 ± 0.21	7.43 ± 0.04	8.46 ± 0.03
Метоксим							
20	$50\,393 \pm 291$	$33\,734 \pm 686$	376 ± 181	3.12 ± 0.12	1.89 ± 0.15	7.51 ± 0.02	8.72 ± 0.03
25	$50\,229 \pm 277$	$33\,803 \pm 669$	442 ± 171	3.47 ± 0.13	2.05 ± 0.15	7.46 ± 0.02	8.69 ± 0.03
37	$50\,224 \pm 318$	$33\,870 \pm 912$	300 ± 238	4.44 ± 0.21	2.72 ± 0.25	7.35 ± 0.02	8.57 ± 0.04

Полоса с пиком в длинноволновом диапазоне (от $\lambda=278$ нм у изонитрозина до $\lambda=376$ нм у метоксима) была вызвана поглощением оксимат-ионов $-R-CH=N-O^-$, а полоса в более коротковолновой области (от $\lambda=228$ нм у изонитрозина и до $\lambda=306$ нм у карбоксима) – поглощением оксимных групп $-R-CH=N-OH$. Значения λ_{max} , приведенные в таблице 1, не зависели от температуры. В кислой среде преобладало поглощение оксимных групп, а в щелочной – оксимат-ионов.

Из уравнения материального баланса, закона Бугера – Ламберта–Бера, правила аддитивности оптических плотностей, уравнений (2, 3) и (6–9) получили выражения, связывающие оптическую плотность A с суммарной концентрацией всех форм оксима $[Oxim]$, молярными коэффициентами светопоглощения ϵ каждой формы оксима, константами ионизации и концентрацией протонов, для монооксидов (10) и диоксидов (11):

$$A = \frac{[Oxim](K_a \epsilon_{Ox^-} + [H^+] \epsilon_{OxH})}{K_a + [H^+]}, \quad (10)$$

$$A = \frac{[Oxim](K_{a1} K_{a2} \epsilon_{Ox^{2-}} + K_{a1} [H^+] \epsilon_{OxH^-} + [H^+]^2 \epsilon_{OxH_2})}{K_{a1} K_{a2} + K_{a1} [H^+] + [H^+]^2}. \quad (11)$$

Используя экспериментально полученные значения оптической плотности растворов оксидов различной кислотности при λ_{max} оксимат-ионов (табл. 1) и зависимости, выраженные уравнениями (10) и (11), методом нелинейной регрессии на основе алгоритма Левенберга — Марквардта [9] получили оценки величин молярных коэффициентов светопоглощения ϵ форм оксидов и констант их ионизации K_a для монооксидов или K_{a1} и K_{a2} для диальдоксидов. Рассчитывали величины pK_a – отрицательный десятичный логарифм значения константы (табл. 2 и 3).

Таблица 4. Характеристики моделей линейной зависимости pK_a , pK_{a1} , pK_{a2} оксимов от температуры

Оксим	Зависимая величина	Скорректированный коэффициент детерминации (adj. r^2)	Оценка коэффициента линейной зависимости и его стандартная ошибка, K^{-1}	p
Изонитрозин	pK_a	1.0000	-0.01203 ± 0.00003	0.001
Пралидоксим	pK_a	0.9792	-0.00796 ± 0.00082	0.065
Азоксим	pK_a	0.9668	-0.01213 ± 0.00157	0.082
Карбоксим	pK_a	0.9918	-0.00958 ± 0.00062	0.041
Дипиридоксим	pK_{a1}	0.8801	-0.01082 ± 0.00273	0.157
	pK_{a2}	0.9915	-0.01118 ± 0.00073	0.042
Обидоксим	pK_{a1}	0.9787	-0.00805 ± 0.00084	0.066
	pK_{a2}	0.9857	-0.00832 ± 0.00071	0.054
Метоксим	pK_{a1}	0.9998	-0.00904 ± 0.00008	0.006
	pK_{a2}	0.9899	-0.00951 ± 0.00068	0.045

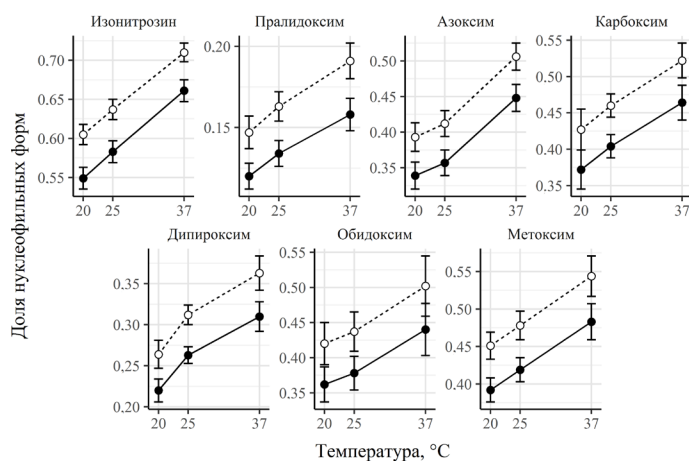


Рисунок 4. Доля оксимат-ионов монооксимов (верхняя строка) или сумма долей монопротонированной и депротонированной форм биспиридиниевых диальдоксимов (нижняя строка), $M \pm m$, в растворах с рН 7.3 (—●—) и 7.4 (---○---) при различной температуре. Расчётные данные согласно уравнениям 12–14.

Молярные коэффициенты светопоглощения существенно не зависели от температуры, а константы ионизации при изменении температуры от 20 до 37°C возрастали в 1.36–1.56 раза (табл. 2 и 3); зависимость pK_a , pK_{a1} , pK_{a2} от температуры была близка к линейной (табл. 4.).

Для выяснения вопроса о количественном влиянии температуры на долю нуклеофильных форм в общей концентрации оксима в растворе выполнили следующие вычисления.

Для монооксимов из уравнения (3) и уравнения материального баланса следует, что доля оксимат-иона от общей концентрации оксима в растворе выражается уравнением (12).

$$\frac{[Ox^-]}{[Ox^-] + [OxH]} = \frac{K_a}{K_a + H^+} \quad (12)$$

В растворах диальдоксимов из уравнений (8) и (9) и уравнения материального баланса долю монопротонированной формы можно найти из уравнения (13), а долю депротонированной – из уравнения (14).

$$\frac{[HOx^-]}{[Ox^{2-}] + [OxH] + [OxH_2]} = \frac{K_{a1}[H^+]}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (13)$$

$$\frac{[Ox^{2-}]}{[Ox^{2-}] + [OxH] + [OxH_2]} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (14)$$

На основе результатов этих вычислений для растворов с рН=7.3 и рН=7.4 построен рисунок 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных данных (табл. 2 и 3) и выполненных на их основе расчётов (рис. 4) следует, что концентрация ионизированных оксимных групп, обладающих нуклеофильными свойствами, и, следовательно, реактивирующая способность оксимов в отношении фосфорилированных ферментов положительно зависит не только от рН среды, но и от температуры.

В раннем периоде тяжёлых острых отравлений ФОС отмечают ацидоз [10–12]. Кроме того, интоксикация ингибиторами холинэстераз приводит к нарушению холинэргических механизмов, лежащих в основе системы терморегуляции. Это сопровождается развитием гипотермии при тяжёлых отравлениях у мелких лабораторных животных — крыс и мышей, наиболее часто используемых в качестве экспериментальных объектов для моделирования отравлений; описаны случаи гипотермии и в ранние сроки течения отравлений ФОС людей [13–15].

В эти же сроки применяют реактиваторы холинэстераз в составе комплекса средств терапии отравлений [1]. Возможно, недостаточная эффективность оксимов при отравлениях ФОС [16, 17] в ряде случаев обусловлена смещением протолитического равновесия при ацидозе и гипотермии в сторону протонированных форм (рис. 4).

Гипотезы о влиянии температуры на скорость реактивации оксимами холинэстераз, ингибированных ФОС, и о снижении положительного эффекта терапии оксимами – реактиваторами ХЭ на фоне ацидоза и гипотермии требуют проверки в опытах *in vitro* и в экспериментах на лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Golikov, S. N. & Zaugolnikov S. D. (1970). Reactivators of cholinesterases. Leningrad, Medicina. [in Russian].
2. Albert, A. & Serjeant, E. P. (1971). The determination of ionization constants: A laboratory manual. London, Chapman and Hall.
3. Ćakar, M.M., Vasić, V.M., Petkovska, Lj.T., Stojić, D.Lj., Avramov-Ivić, M., Milovanović, G.A. (1999). Spectrophotometric and electrochemical study of protolytic equilibria of some oximes-acetylcholinesterase reactivators. J. Pharm. Biomed. Anal., **20**, 655–662. DOI: 10.1016/S0731-7085(99)00056-4
4. Foretić, B., Burger, N. (2004). The dissociation constants of 1,1'-bis (pyridinium-4-aldoxime)trimethylene dibromide. Monatshefte für Chemie, **135**, 261–267. DOI: 10.1007/s00706-003-0116-z
5. Šinko, G., Čalić, M., Kovarik, Z. (2006). para- and ortho-Pyridinium aldoximes in reaction with acetylthiocholine. FEBS Lett, **580**, 3167–3172. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.070
6. Worek, F., Reiter, G., Eyer, P. & Szinicz L. (2002). Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. Arch. Toxicol., **76**, 523–529. DOI: 10.1007/s00204-002-0375-1
7. R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing. from <https://www.R-project.org/>.
8. Wickham, H. (2009). ggplot2: Elegant graphics for data analysis. N. Y. Springer-Verlag.
9. Elzhov, T. V., Mullen, K. M., Spiess, A.-N., Bolker, B. (2016). minpack.lm: R interface to the Levenberg-Marquardt nonlinear least-squares algorithm found in MINPACK, plus support for bounds. from <https://CRAN.R-project.org/package=minpack.lm>
10. Liu, J.-H., Chou, C.-Y., Liu, Y.-L., Liao, P.-Y., Lin, P.-W., Lin, H.-H., Yang, Y.-F. (2008). Acid-base interpretation can be the predictor of outcome among patients with acute organophosphate poisoning before hospitalization. Am. J. Emerg. Med., **26**, 24–30. DOI: 10.1016/j.ajem.2007.03.017
11. Setlur, R., Sharma, R. M. (2005). Severe metabolic acidosis secondary to organophosphate poisoning. Anesth. Analg., **101**, 1894–1898. DOI: 10.1213/01.ANE.0000180376.67266.20
12. Stefanović, D., Antonijević, B., Bokanjic, D., Stojiljković, M. P., Milovanović, Z. A., Nedeljković, M. (2006). Effect of sodium bicarbonate in rats acutely poisoned with dichlorvos. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., **98**, 173–180. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_68.x
13. Clement, J. G. (1993). Recovery from soman-induced hypothermia is due to an increase in acetylcholinesterase activity but not new protein synthesis. Neurotoxicology, **14**, 411–416.
14. Gordon, C. J. (1996). Thermoregulatory aspects of environmental exposure to anticholinesterase agents. Rev. Environ. Health, **11**, 101–117.
15. Kamijo, Y., Soma, K., Uchimiya, H., Asari, Y., Ohwada, T. (1999). A case of serious organophosphate poisoning treated by percutaneous cardiopulmonary support. Vet. Hum. Toxicol., **41**, 326–328.
16. Buckley, N. A., Eddleston, M., Li, Y., Bevan, M., Robertson, J. (2011). Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. Cochrane Database Syst. Rev., **16**, CD005085. DOI: 10.1002/14651858.CD005085.pub2
17. Eyer, P. (2003). The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. Toxicol. Rev., **22**, 165–190.

Поступила: 26.04.2019
 После доработки: 01.07.2019
 Принята к публикации: 11.07.2019

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF THE IONIZATION CONSTANTS FOR THE OXIMES – CHOLINESTERASES REACTIVATORS AT DIFFERENT TEMPERATURES

T. V. Schäfer*, A. A. Tyaptin, T. B. Pechurina

State Scientific Research and Test Institute of the Military Medicine,
 4 Lesoparkovaya str., Saint-Petersburg, 195043 Russia; *e-mail: schafer@yandex.ru

The goal of study was the determination of the ionization constants for the oximes – cholinesterases reactivators in aqueous solutions at different temperatures. The wavelengths of absorption maxima of the protonated and deprotonated oxime groups, the molar extinction coefficients of the various oximes species, and the ionization constants for the oxime cholinesterases reactivators (isonitrosin, pralidoxime, dipyroxime, toxogonin, methoxime, carboxime and asoxime) were obtained using spectrophotometric data (wavelength 190 to 450 nm) in solutions (pH 5–12) at 20°C, 25°C and 37°C. The proportion of nucleophilic forms involved in the oxime-induced reactivation of phosphorylated cholinesterases was shown to be positively dependent on the incubation medium pH value and temperature. A hypothesis that the temperature affects the oximes ability to reactivate phosphorylated cholinesterases has been proposed.

Key words: oximes; absorption spectra; protolytic dissociation; ionization constants; temperature effect

Received: 26.04.2019, revised: 01.07.2019, accepted: 11.07.2019