

УДК 632.95

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФУНГИЦИДНОЙ И БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ 3-АЛКИЛЗАМЕЩЕННЫХ 1*H*-ФОСФОЛАН ОКСИДОВ[§]

© 2024 г. Т. В. Тюмкина^{1,*}, К. А. Булатова², Д. Н. Исламов¹, А. Л. Махаматханова¹,
М. И. Маллябаева², Д. Ш. Сабиров¹

¹Институт нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра РАН
450075 Уфа, просп. Октября, 141, Россия

²Уфимский государственный нефтяной технический университет
450062 Уфа, ул. Космонавтов, 1, Россия

*E-mail: tvnmr@gmail.com

Проведено тестирование фунгицидной и бактериальной активности модельного соединения 3-гексил-1*H*-фосфолан оксида с использованием грибов рода *Septoria* sp., *Phytophthora* sp., *Puccinia* sp. и *Aspergillus* sp., а также бактерии *Escherichia coli*. Комплексный анализ полученных экспериментальных данных и докинга на выбранных мишенях ключевых белков каждого из тест-объектов позволил оценить потенциальную пестицидную активность класса фосфоланоксидов.

Ключевые слова: 1*H*-фосфолан оксиды, фунгицидная активность, бактерия *Escherichia coli*, докинг.

DOI: 10.31857/S0002188124080092, **EDN:** CDPBOV

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические соединения (ФОС) обладают широким спектром биологической активности, благодаря чему находят применение в медицине, в сельском хозяйстве в качестве пестицидов и т.п. Преимуществом фосфорсодержащих фунгицидов, по сравнению с хлорсодержащими, является профилактическое и лечащее действие, что позволяет использовать их для протравливания и опрыскивания растений во время вегетации. В настоящее время широко используют практически единственный фунгицид фосэтил алюминия (препараты Афуган, Альетт, Превикур Энерджи и др.), обладающий высокой системной активностью против мучнистой росы, снежной плесени, корневых гнилей (рис. 1), хотя он и является малоэффективным против фитофтороза, например, томата и картофеля. Считается, что вещество не влияет непосредственно на фитопатоген, а усиливает защитные реакции самого растения, ускоряя процесс образования фенольных соединений, токсичных для грибов [1].

В качестве фунгицидов для защиты зерновых и citrusовых культур рекомендованы некоторые фосфорсодержащие инсектициды как системного

(Ипробенфос, Фенитротрион, Фозалон), так и контактного (Диталимфос) действия, применение которых в качестве инсектицидов ограничено вследствие их высокой токсичности.

Таким образом, при всех преимуществах применения ФОС существует ограниченное количество известных фунгицидов на их основе. Перспективными могут являться устойчивые к окислению соединения пентавалентного фосфора, в структуре которых присутствует группа P(O)H (рис. 1), аналогично структурному фрагменту фунгицида фосэтил алюминия. К ним относятся замещенные 1*H*-фосфолан оксиды, синтез которых был недавно нами разработан в одну препаративную стадию из доступных реагентов — α -олефинов, триэтилалюминия и трихлорида фосфора, в мягких условиях, с высокими выходами, что делает этот метод перспективным для практического применения [2, 3]. На сегодняшний день известно ограниченное количество подобных соединений циклической структуры [4], и, как следствие, биологическая активность данного класса остается малоизученной. Следует также отметить, что сообщалось о противораковых свойствах некоторых представителей подобных ФОС [5].

С целью оценки фунгицидной активности новых 3-замещенных 1*H*-фосфолан оксидов провели исследование фунгицидной и бактериальной активности модельного соединения 3-гексил-1*H*-фосфолан

[§] Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (темы № FMRS-2022-0074 и № FMRS-2022-0075).

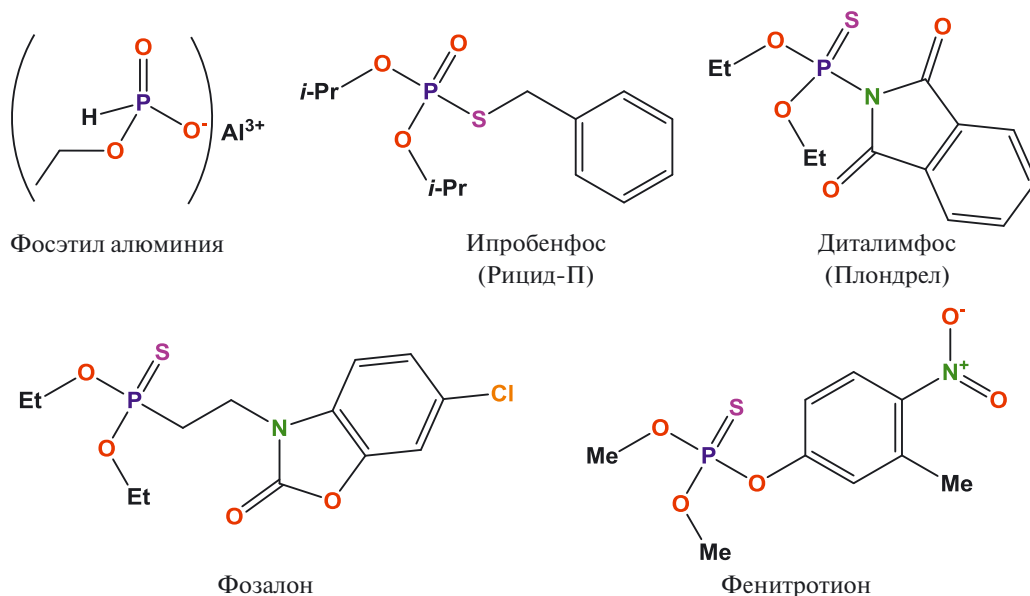


Рис. 1. Структура известных фосфорорганических фунгицидов.

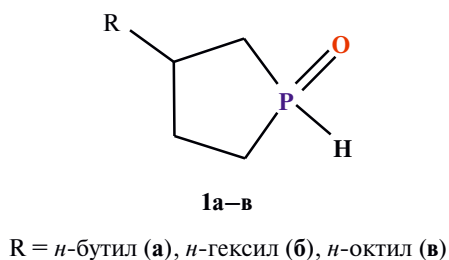


Рис. 2. Объекты исследования.

оксида с использованием грибов родов *Septoria* sp., *Phytophthora* sp., *Puccinia* sp. и бактерии *Escherichia coli*. Комплексный анализ полученных экспериментальных данных и докинга (метода молекулярного моделирования, позволяющего предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и конформацию одной молекулы (лиганда) в сайте связывания другой (рецептора)) на выбранных мишенях ключевых белков каждого из тест-объектов позволил оценить потенциальную пестицидную активность класса фосфоланоксидов (рис. 2).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Грибной мицелий в эксперименте выращивали на мясопептонном агаре (МПА) в концентрации 37 г/л (30.8 г питательного агара и 0.8 л

дистиллированной воды). После приготовления среду автоклавировали при 120°C в течение 20 мин. В качестве стандартных соединений в экспериментах с тест-штаммами грибов использовали коммерческий фунгицид “Агролекарь” (ООО “МосАгро”), содержащий 25% д.в. (пропиконазол) в рекомендованной производителем концентрации 0.07% (7 мл/10 л раствора), в экспериментах с бактерией *Escherichia coli* использовали препарат “Цефазолин” для внутривенного и внутримышечного введения (д.в. — цефазолин натрия в пересчете на цефазолин — 1.0 г) в концентрации 0.2% (1 г/4 мл воды для инъекций). Исследованное соединение 3-гексил-1*H*-фосфолан оксид **16** синтезировано согласно разработанной нами методике [2, 3].

Фитопатогенные грибы выделены из пораженных грибами листьев растений и продуктов: грибы рода *Septoria* sp. — из пораженных листьев терновника (*Prúnus spinósa*), *Phytophthora* sp. — из пораженных листьев томата (*Solánum lycopérsicum*), *Puccinia* sp. — из пораженных листьев смородины черной (*Ríbes nígrum*), *Aspergillus* sp. — с пораженной поверхности томатной пасты. Штамм бактерий *Escherichia coli* взят из коллекции ФГБОУ ВО УГНТУ (лаборатория кафедры “Прикладная экология”).

Изучение фунгицидной активности соединений проводили согласно методике [6] при использовании в качестве растворителя дистиллированной воды в разведении 200 мг/мл и 400 мг/мл. Опыты проводили “двойным слепым” методом,

Таблица 1. Протеины грибов и бактерий, выбранные в качестве мишеней для докинга

Царство	Биологический вид	Мишень	PDBID
Грибы	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Цитохром P450 (CYP51B)	4UYM
	<i>Aspergillus nidulans</i>	Хитиндеацетилаза (AnCDA)	2Y8U
	<i>Aspergillus niger</i>	Хитиндеацетилаза (AngCDA)	7BLY
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Тиоэстераза (TE)	3ILS
	<i>Phytophthora cryptogea</i>	В-Криптогейн (CRY)	1BXM
	<i>Phytophthora infestans</i>	L-треонин-3-дегидрогеназа (L-ThrDH)	6JYG
Бактерии	<i>Escherichia coli</i>	Пенициллинсвязывающий белок 5 (PBP 5)	1Z6F
		Орнитинтранскарбамилаза (OTC)	1DUV
		Цитидинтрифосфат-синтаза (CTP)	1S1M
		β -Лактамаза (AmpC)	1XGJ

с применением луночно-диффузионного метода [7]. Среду для культивирования в объеме 20–25 мл вносили в чашки Петри ($d = 90$ мм). После застывания МПА и посева биоматериала по центру чашки Петри с помощью насадок делали лунки ($d = 10$ мм) на 2/3 толщины слоя агара и засеивали соответствующие штаммы грибов и бактерий. Исследованные и стандартные вещества вносили в лунки в объеме 0.1 мл. После инкубирования грибов и бактерий в термостате при $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в течение 24 ч рассчитывали активность исследованных веществ согласно методике [6]. Зоны подавления роста грибов и бактерий измеряли в миллиметрах. Минимальную ингибирующую концентрацию (**МИК**) определяли методом серийных разведений [8]. Повторность опыта трехкратная.

В теоретической части поиск потенциальных белков-мишеней, имеющих отношение к бактерии *Escherichia coli*, проведен с использованием базы данных фармакофорных моделей PharmMapper [9]. В результате в рассмотрение были взяты протеины 1DUV, 1S1M и 1XGJ (табл. 1). Энзимы 2Y8U, 7BLY, 3ILS, 1BXM и 6JYG выбраны на основе литературных данных [10–13].

Протеины 4UYM и 1Z6F включены в исследование, поскольку цитохромы и пенициллинсвязывающие белки являются установленными мишенями для пропиконазола и цефазолина соответственно [14–16]. Для докинга использовали программный пакет AutoDock 4 [17]. Дополнительный анализ и визуализацию результатов докинга проводили с применением программного обеспечения Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 [18]. Кристаллографические структуры комплексов CYP51B/вориконазол, AnCDA/фосфат-ион, AngCDA/малонат-ион, CRY/аргостерол, L-ThrDH/NAD (никотинамидадениндинуклеотид), PBP5/BO9 (N1-[(1R)-1-(дигидроксиборил)этил]-N2-[(трет-бутоксикарбонил)-D-гамма-глутамил]-N6-[(бензилокси)карбонил-L-лизинамид), OTC/PSQ

(Ндельта-(N'-сульфодиаминофосфинил)-L-орнитин), AmpC/HTC (3-(4-карбокси-2-гидроксифенил-сульфамойл)тиофен-2-карбоновая кислота) и протеинов TE, CTP были получены из банка данных белков (идентификаторы PDB: 4UYM, 2Y8U, 7BLY, 1BXM, 6JYG, 1Z6F, 1DUV, 1XGJ, 3ILS, 1S1M) [19] и оптимизированы посредством удаления молекул воды. Рецепторная сетка, как правило, располагалась вокруг активного сайта сокристализованных лигандов. В случае белков TE и CTP активный сайт определен на основе литературных данных [11, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально экспериментальная оценка фунгицидной и бактерицидной активности 3-гексил-1H-фосфофан оксида **16** была проведена при концентрации вещества 400 мг/мл (табл. 2).

Наблюдали значительное (в 2–3 раза) увеличение диаметра ингибирования для всех видов исследованных грибов по сравнению с препаратом сравнения, кроме *Septoria* sp., чья фунгицидная активность оказалась близка с действием препарата “Агролекар”, взятом в рекомендованной производителем концентрации пропиконазола. При уменьшении концентрации вещества до 200 мг/мл фунгицидная активность в отношении всех видов исследованных грибов сохранялась. Для грибов *Aspergillus* sp. и *Phytophthora* sp. зафиксировано двукратное уменьшение зоны ингибирования.

С целью определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) 3-гексил-1H-фосфофан оксида **16** были проведены эксперименты при концентрациях 100 мг/мл вещества и меньше, которые показали полное отсутствие ингибирования (табл. 3).

Установлено, что исследованное соединение также обладало бактерицидной активностью по отношению к бактериям *Escherichia coli*, сравнимое

Таблица 2. Фунгицидная и бактерицидная активность различных препаратов на объекты исследования

Объект исследования	Диаметр ингибирования роста тест-культур, см			
	“Агролекарь”	3-гексил-1 <i>H</i> -фосфолан оксид (200 мг/мл)	3-гексил-1 <i>H</i> -фосфолан оксид (400 мг/мл)	“Цефазолин”
<i>Aspergillus</i> sp.	1	1.3	3.5	—
<i>Septoria</i> sp.	4	3.2	3.2	—
<i>Phytophthora</i> sp.	1.3	2.5	4.0	—
<i>Puccinia</i> sp.	2.1	4	4.6	—
<i>Escherichia coli</i>	—	5	5.3	7.1

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация 3-гексил-1*H*-фосфолан оксида **16**, мг/мл

Разведение	Концентрация, мг/мл	<i>Septoria</i> sp.	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>Puccinia</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>
1 : 10	400	—	—*	—*	—*	—
1 : 100	200	—*	+	+	+	—*
1 : 10 ³	100	+	+	+	+	+
1 : 10 ⁴	50	+	+	+	+	+
1 : 10 ⁵	25	+	+	+	+	+
1 : 10 ⁶	12.5	+	+	+	+	+

Примечание. Прочерк — нет роста, + — видимый рост.

* МИК для соответствующих тест-штаммов.

с известным высокоактивным препаратом “Цефазолин”, при этом МИК составляло 200 мг/мл (табл. 2, 3). Таким образом, установлено, что исследованное вещество **16** обладало как фунгицидной, так и бактерицидной активностью.

С целью более глубокого понимания механизма действия синтезированного фосфолан оксида было проведено теоретическое моделирование взаимодействия возможных стереоизомеров соединений **1a–в** с известными для данных грибов и бактерии мишенями (табл. 1). Установлено, что для 3-бутил-1*H*-фосфолан оксида **1a** преимущественно реализуется “твист” конформация с экваториальным

расположением заместителя в 3-м положении, что согласуется с литературными данными для аналогичных алюминий содержащих систем [21]. Таким образом, для каждого из фосфолан оксидов **1a–в** были оптимизированы структуры 4-х диастереомеров (рис. 3), из которых *RR*-λ и *SS*-σ диастереомеры оказались наиболее энергетически выгодными и были выбраны в качестве лигандов для проведения докинга (табл. 4). В случае пропиконазола докинг проводили с участием наиболее термодинамически выгодного *SR*-стереоизомера.

Для некоторых протеинов существуют экспериментальные данные с сокристаллизованными

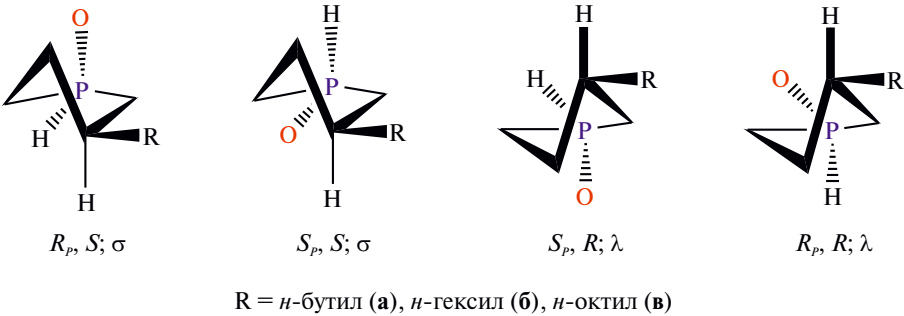


Рис. 3. Диастереомеры 3-алкил-1*H*-фосфолан оксидов.

Таблица 4. Относительные величины термодинамических параметров ($[S] = \text{Дж}/(\text{моль К})$; $[H] = [G] = \text{кДж}/\text{моль}$) стереоизомеров пропиконазола, фосфолан оксидов **1a–в** в стандартных условиях

Соединение	Диастереомер	ΔH	ΔG	ΔS
Пропиконазол	<i>RR</i>	6.78	4.56	36.48
	<i>RS</i>	5.69	14.35	0.00
	<i>SR</i>	0.00	0.00	29.04
	<i>SS</i>	5.27	7.11	22.84
1a	<i>RR</i> - λ	0.00	0.00	3.39
	<i>RS</i> - σ	0.59	1.38	0.63
	<i>SR</i> - λ	0.59	1.17	1.34
	<i>SS</i> - σ	0.04	0.13	3.01
1б	<i>RR</i> - λ	0.00	0.00	1.76
	<i>RS</i> - σ	0.46	0.63	1.13
	<i>SR</i> - λ	0.63	1.13	0.00
	<i>SS</i> - σ	0.00	0.08	1.51
1в	<i>RR</i> - λ	0.00	0.00	2.72
	<i>RS</i> - σ	0.71	1.55	0.00
	<i>SR</i> - λ	0.54	0.54	2.76
	<i>SS</i> - σ	0.00	0.13	2.34

Таблица 5. Конформация с наименьшей энергией для каждого сокристаллизованного лиганда

Протеин	Лиганд	RMSD	FBE, ккал/моль	FIE, ккал/моль	Ki
CYP51B	Вориконазол	1.366	−8.29	−10.08	832.06 нМ
AnCDA	Фосфат-ион	0.937	−2.00	−2.00	34.27 мМ
AngCDA	Малонат-ион	12.239	−3.17	−3.76	4.79 мМ
CRY	Эргостерол	1.443	−11.92	−13.41	1.83 нМ
L-ThrDH	NAD	1.503	−2.54	−4.33	13.73 мМ
PBP 5	BO9	2.717	−4.98	−11.24	224.24 мкМ
OTC	PSQ	1.039	−11.49	−14.47	3.81 нМ
AmpC	HTC	6.279	−7.45	−9.24	3.48 мкМ

Примечание. FBE – свободная энергия связывания, FIE – конечная межмолекулярная энергия, Ki – константа ингибирования. То же в табл. 6.

лигандами (табл. 5), которые представлены в табл. 6 для сопоставления с теоретическими результатами докинга с участием соединений **1a–в**.

Как следует из табл. 6, фунгицидная активность пропиконазола и 3-октил-1*H*-фосфолан оксида **1в** сопоставима для каждого из потенциальных белков мишеней, поскольку их расчетные константы ингибирования Ki одного порядка, например, константы ингибирования Ki пропиконазола, вориконазола и соединения **1в** для белка мишени CYP51B (*Aspergillus fumigatus*) составляют 10^{-9} (нМ) размерность. Более того, как показал сравнительный анализ величин констант связывания и констант ингибирования, оценочная ингибирующая активность **1в** даже больше по сравнению с пропиконазолом ($132.17 \text{ нМ} < 101.18 \text{ нМ}$ (Ki) и $-9.38 < 9.54$ (FBE)). Согласно полученным результатам, гомологи **1a**

и **1б** с меньшим количеством звеньев в алкильной цепи должны проявлять меньшую активность, например, для **1a** *SS* конфигурации Ki = 22.66 мкМ. Наблюдаемое увеличение активности с увеличением длины цепи в ряду гомологов свидетельствовало о значительной роли алкильного фрагмента 1*H*-фосфолан оксида в связывании с активными сайтами данного белка. Для подтверждения полученных результатов, а также с целью детализации взаимодействий, реализующихся в системе молекула–протеин, визуализировали некоторые результаты докинга (рис. 4).

Действительно, алкильный заместитель участвует в образовании гидрофобных взаимодействий, причем если для **1a** наблюдали один такой контакт, то для **1б** соединения – уже четыре, и в случае **1в** проявлялись 5 взаимодействий (розовый цвет

Таблица 6. Конформация с наименьшей энергией для пропиконазола, цефазолина, фосфофан оксидов **1a–в**

Протеин	Лиганд	FBE, ккал/моль	FIE, ккал/моль	Ki
CYP51B	Пропиконазол SR	–9.38	–10.88	132.17 нМ
	1a <i>RR</i> -λ	–6.76	–7.65	11.15 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–6.34	–7.23	22.66 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–7.96	–8.86	1.46 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–7.84	–8.74	1.78 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–9.31	–10.20	150.62 нМ
	1в <i>SS</i> -σ	–9.54	–10.44	101.18 нМ
AnCDA	Пропиконазол	–7.01	–8.50	7.25 мкМ
	1a <i>RR</i> -λ	–5.47	–6.36	98.06 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–5.39	–6.29	111.35 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–6.20	–7.10	28.33 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–6.09	–6.99	34.09 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–7.03	–7.92	7.09 мкМ
	1в <i>SS</i> -σ	–6.88	–7.77	9.07 мкМ
AngCDA	Пропиконазол	–7.00	–8.49	7.44 мкМ
	1a <i>RR</i> -λ	–6.16	–7.05	30.61 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–5.81	–6.70	55.29 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–6.92	–7.81	8.52 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–6.83	–7.73	9.84 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–7.43	–8.32	3.60 мкМ
	1в <i>SS</i> -σ	–7.28	–8.17	4.63 мкМ
TE	Пропиконазол	–8.73	–10.22	398.20 нМ
	1a <i>RR</i> -λ	–5.82	–6.72	54.08 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–6.00	–6.89	40.24 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–6.95	–7.84	8.05 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–7.20	–8.10	5.25 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–8.42	–9.31	678.33 нМ
	1в <i>SS</i> -σ	–8.43	–9.33	657.16 нМ
CRY	Пропиконазол	–7.03	–8.52	7.03 мкМ
	1a <i>RR</i> -λ	–5.03	–5.92	206.83 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–5.11	–6.00	180.63 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–6.20	–7.09	28.64 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–6.13	–7.02	32.29 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–7.08	–7.98	6.41 мкМ
	1в <i>SS</i> -σ	–7.02	–7.91	7.18 мкМ
L-ThrDH	Пропиконазол	–8.30	–9.79	828.38 нМ
	1a <i>RR</i> -λ	–6.13	–7.03	31.90 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–5.94	–6.83	44.28 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–7.15	–8.04	5.74 мкМ
	1б <i>SS</i> -σ	–7.19	–8.09	5.35 мкМ
	1в <i>RR</i> -λ	–8.40	–9.29	700.62 нМ
	1в <i>SS</i> -σ	–8.19	–9.09	984.87 нМ
PBP 5	Цефазолин	–11.68	–14.06	2.76 нМ
	1a <i>RR</i> -λ	–5.37	–6.26	115.92 мкМ
	1a <i>SS</i> -σ	–5.81	–6.71	54.84 мкМ
	1б <i>RR</i> -λ	–6.44	–7.34	18.96 мкМ

Таблица 6. Окончание

Протеин	Лиганд	FBE, ккал/моль	FIE, ккал/моль	Ki
PBP 5	1b SS-σ	−6.92	−7.81	8.51 мкМ
	1b RR-λ	−7.57	−8.47	2.81 мкМ
	1b SS-σ	−8.06	−8.96	1.23 мкМ
	Цефазолин	−11.13	−13.52	6.89 нМ
	1a RR-λ	−5.85	−6.75	51.11 мкМ
OTC	1a SS-σ	−5.93	−6.83	44.99 мкМ
	1b RR-λ	−7.16	−8.06	5.61 мкМ
	1b SS-σ	−7.11	−8.01	6.11 мкМ
	1b RR-λ	−8.09	−8.99	1.17 мкМ
	1b SS-σ	−8.14	−9.04	1.07 мкМ
СТР	Цефазолин	−9.66	−12.04	83.66 нМ
	1a RR-λ	−5.05	−5.95	197.60 мкМ
	1a SS-σ	−5.62	−6.52	75.66 мкМ
	1b RR-λ	−6.11	−7.01	33.14 мкМ
	1b SS-σ	−6.64	−7.54	13.47 мкМ
AmpC	1b RR-λ	−6.43	−7.32	19.46 мкМ
	1b SS-σ	−6.50	−7.40	17.08 мкМ
	Цефазолин	−11.94	−14.33	1.77 нМ
	1a RR-λ	−4.80	−5.70	301.97 мкМ
	1a SS-σ	−4.96	−5.85	232.17 мкМ
AmpC	1b RR-λ	−5.48	−6.38	95.80 мкМ
	1b SS-σ	−5.77	−6.66	59.45 мкМ
	1b RR-λ	−6.45	−7.34	18.78 мкМ
	1b SS-σ	−6.71	−7.61	12.00 мкМ

пунктира). Концевая метильная группа в составе алкильного фрагмента ряда соединений **1a–в** участвует также в π-σ взаимодействиях (фиолетовый цвет пунктира). Данные 2 типа взаимодействий преобладают в комплексе “пропиноказол–белок CYP51B”. В этом модельном комплексе реализуется также одна водородная связь, в то время как в 1*H*-фосфофан оксидах образуются 2 (**1a**) и 3 (**1b**, **1в**) водородные связи, в которые вовлекаются атомы кислорода и водорода P(O)H функциональной группы. Атом фосфора 1*H*-фосфофан оксидов обеспечивает взаимодействия, обусловленные либо притяжением между противоположно заряженными центрами (см. синий пунктир в **1a**), либо отталкиванием положительно заряженных центров, например, имеет место неблагоприятное взаимное отталкивание зарядов, локализованных на атоме фосфора и протонированном атоме азота боковой цепи аминокислотного остатка His374 (красный цвет пунктирных линий во всех 3-х соединениях (рис. 4). Таким образом, в случае введения **1b** в сайт связывания протеина CYP51B образуется относительно меньше гидрофобных, но больше водородных связей с гемом протеина по сравнению с пропиноказолом. Очевидно, это обусловлено присутствием оксидной функции

при атоме фосфора, что и определяет значительные параметры связывания, и, как следствие, потенциальную фунгицидную активность тестируемых соединений. Анализ расчетных данных, полученных с участием тиюэстеразы (TE) вида *Aspergillus parasiticus* (табл. 1), также показал высокую ингибирующую активность 3-октил-1*H*-фосфофан оксида **1в** (Ki = 673.33 нМ) по сравнению с пропиноказолом (Ki = 398.20 нМ) и, тем более, относительно гомолога 3-гексил-1*H*-фосфофан оксида **1b** (Ki = 8.05 мкМ). Кроме того, фосфофан оксиды показали большую прочность связывания по отношению к данной мишени по сравнению с соединениями, которые тестировали в работе [11]. Тенденция уменьшения величин Ki с уменьшением длины цепи, а также близкие параметры связывания между модельным и исследованными веществами сохранялись также для комплексов с белками AnCDA и AngCDA.

Теоретические расчеты показали заметное влияние стереохимии на параметры Ki, FBE, например, ΔKi(SS-RR) = 49.44 нМ для **1в** (рис. 4), что свидетельствовало об относительно большей

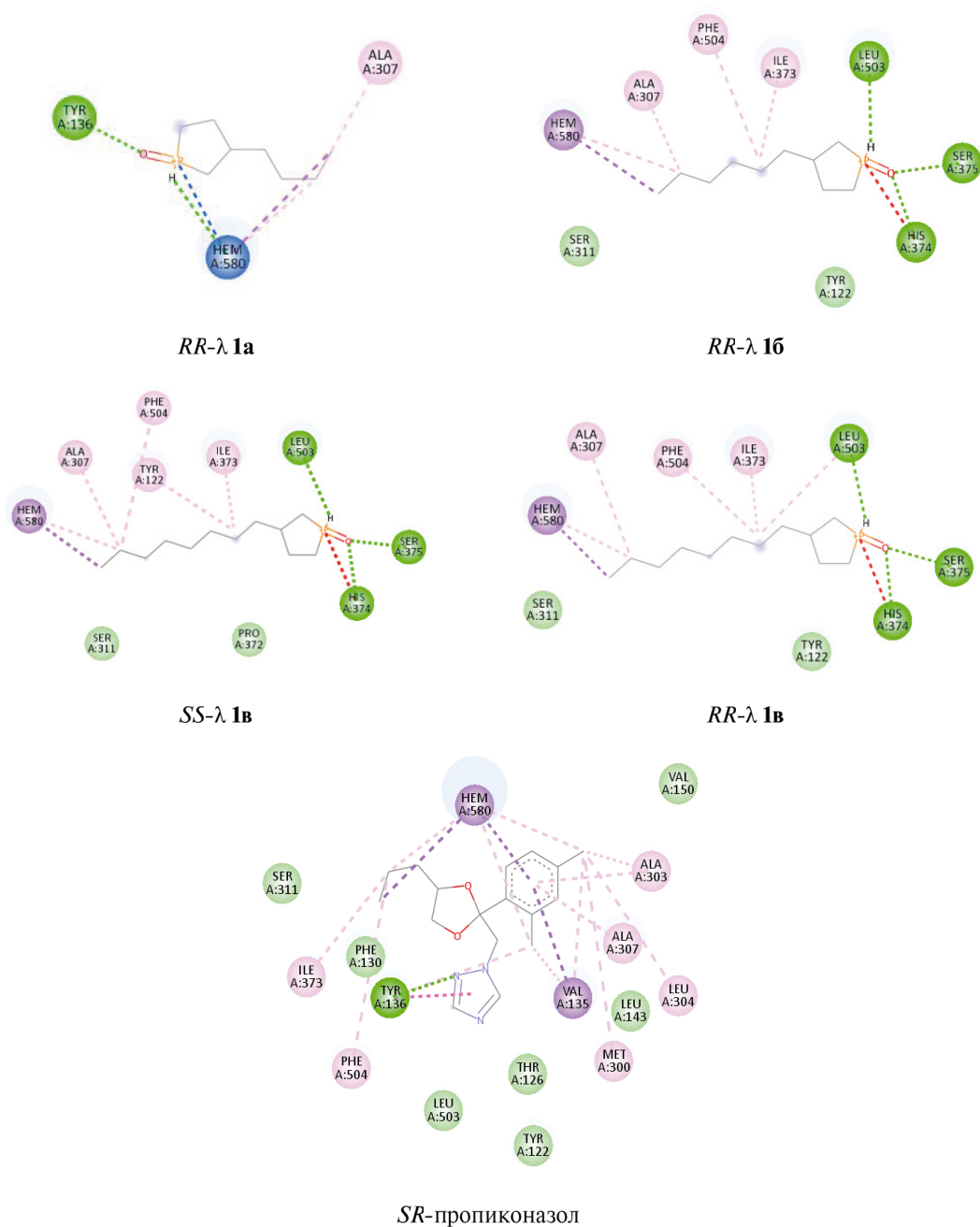
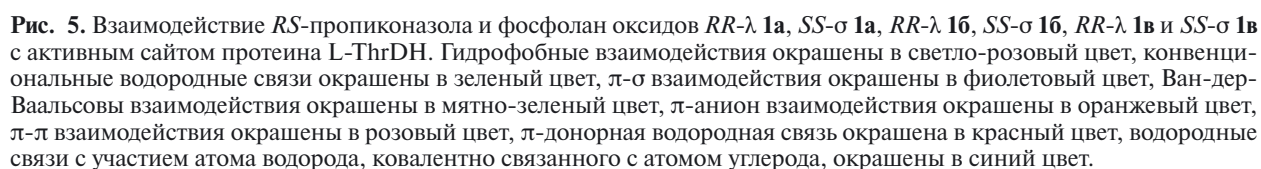


Рис. 4. Взаимодействие *SR*-пропиконазола и фосфолан оксидов *RR*-λ **1a**, *RR*-λ **16** и *RR*-λ **1b** с активным сайтом протеина CYP51B. Гидрофобные взаимодействия окрашены в светло-розовый цвет, водородные связи окрашены в зеленый цвет, π-σ взаимодействия окрашены в фиолетовый цвет, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия окрашены в мятно-зеленый цвет, неблагоприятные взаимодействия положительно заряженных центров окрашены в красный цвет, π-π взаимодействия окрашены в розовый цвет. Синим цветом отражено притяжение между противоположно заряженными центрами.



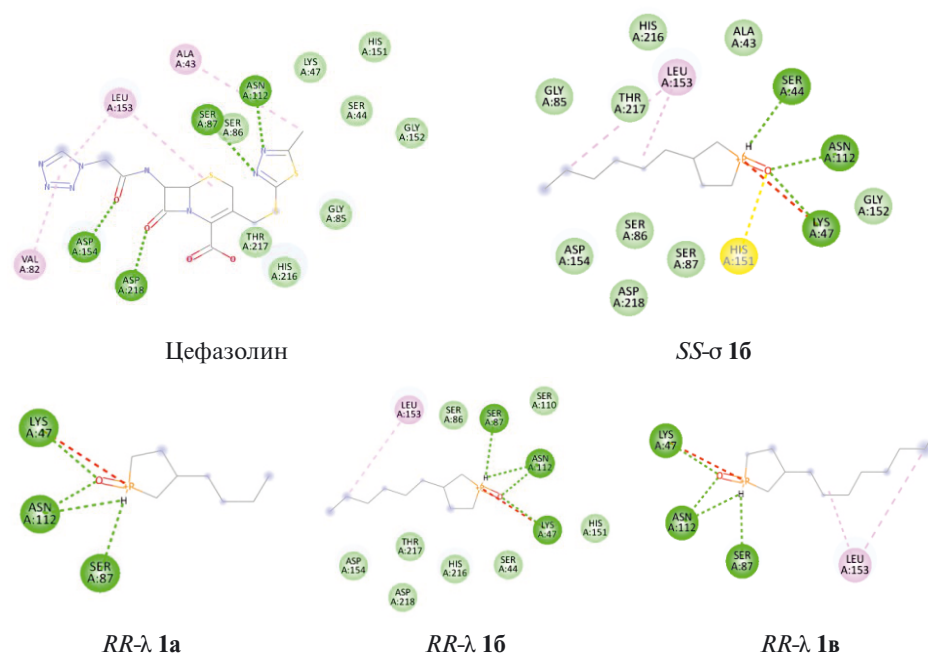


Рис. 6. Взаимодействие *SR*-пропиконазола, фосфолан оксидов *RR*-λ **1a**, *RR*-λ **16**, *SS*-σ **16** и *RR*-λ **1b** с активным сайтом протеина PBP 5. Гидрофобные взаимодействия окрашены в светло-розовый цвет, водородные связи окрашены в зеленый цвет, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия окрашены в мятно-зеленый цвет, благоприятные взаимодействия противоположно заряженных центров окрашены в оранжевый цвет, неблагоприятные взаимодействия положительно заряженных центров окрашены в красный цвет, неблагоприятные взаимодействия акцепторных центров окрашены в желтый цвет.

активности стереоизомера с *RR* конфигурацией хиральных центров.

Интересные результаты получены в результате докинга с участием белков, относящихся к семейству *Phytophthora* (CRY, L-ThrDH), именно фосфолан оксид **1b** должен проявлять фунгицидную активность по отношению к фитофторе, сравнимую с модельным фунгицидом. Белок L-ThrDH, например, должен активно связываться со всеми **1a–в** гомологами циклических ФОС, т.к. K_i (**1a–в**, табл. 6) < K_i (комплекса с NAD, табл. 5), однако в случае **1b** соединения константа ингибирования отличалась на порядки (табл. 6). Визуализация полученных данных объясняет результаты расчетов (рис. 5).

На рис. 5 однозначно прослежена тенденция к увеличению количества связей (гидрофобных и водородных) при переходе от 3-бутил-1*H*-фосфолан оксида **1a** к 3-октил-1*H*-фосфолан оксиду **1b**. Обращает на себя внимание также тот факт, что характер взаимодействий значительно отличается для стереомеров с *SS*- и *RR*-конфигурациями хиральных центров не только за счет стереохимии циклического каркаса, но и за счет изменения конформации алкильного заместителя, например, “скрученная” конформация в стереоизомерах **1b** дает преимущества в связывании с активными сайтами

протеина. Из рис. 5 следует, что атомы кислорода, водорода и фосфора в составе функциональной группы в серии 3-алкил-1*H*-фосфолан оксидов образуют разнообразные связи (конвенциональные водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, π-анионные взаимодействия, водородные связи с участием атома водорода, ковалентно связанного с атомом углерода) с аминокислотными остатками белка. Очевидно, что активное участие фосфорсодержащей группы в связывании должно определять высокую фунгицидную активность. Действительно, количественные параметры связывания в системе соединения **1a–в** – CRY, в которой группа P(O)H практически инертна (рисунок не приведен), значительно уступают комплексу, описанному выше (рис. 5).

Оценку теоретической бактерицидной активности проводили по результатам докинга (табл. 5, 6) 1*H*-фосфолан оксидов **1a–в** в активные сайты протеинов PBP 5, ОТС и AmpC. На рис. 6 представлены некоторые результаты.

Показано, что с участием оксидной группы при гетероатоме реализуются 4 водородные связи, что по количеству сопоставимо с цефазолиновым комплексом, в котором 4 связи формируются за счет структурного разнообразия

молекулы — 2-х карбонильных групп и 2-х атомов азота триазинового кольца. Атом фосфора, как следует из рис. 6, за счет положительного заряда вовлекается во взаимодействие с другими заряженными центрами в полости белка. Следует отметить, что множественные гидрофобные связи присутствуют только для **1в** соединения, что ожидаемо по сравнению с предыдущими выводами. При сравнении прочности связывания с активным сайтом белка РВР 5 фосфолан оксиды уступили цефазолину, но превзошли ингибитор ВО9. Таким образом, можно прогнозировать бактерицидную активность 3-алкилзамещенных 1*H*-фосфолан оксидов, что согласуется с экспериментальными данными.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена фунгицидная активность 3-гексил-1*H*-фосфолан оксида в отношении грибов рода *Septoria* sp., *Phytophthora* sp., *Puccinia* sp. и *Aspergillus* sp. Установлено, что минимальная ингибирующая концентрация для *Phytophthora* sp., *Puccinia* sp. и *Aspergillus* sp. составляет 400 мг/мл, для *Septoria* sp. — 200 мг/мл.

2. Установлено, что 3-гексил-1*H*-фосфолан оксид проявляет антибактериальную активность в отношении бактерии *Escherichia coli* с минимальной ингибирующей концентрацией 200 мг/мл.

3. Проведен молекулярный докинг *RR*- и *SS*-3-*R*-1*H*-фосфолан оксидов (*R* = бутил, гексил, октил) на мишенях CYP51B (цитохром P450), AnCDA (хитиндеацетилаза), TE (тиоэстераза), CRY (В-криптогейн), L-ThrDH (L-треонин-3-дегидрогеназа), РВР 5 (пенициллинсвязывающий белок), ОТС (орнитинтранскарбамилаза), СТР (цитидинтрифосфат-синтаза), AmpC (β-лактамаза) с учетом наиболее энергетически выгодной конформации. В результате молекулярного докинга с участием протеинов показано, что функциональная группа P(O)H 3-алкил-1*H*-фосфолан оксидов взаимодействует (кроме CRY) с активными сайтами исследованных белков.

4. Анализ параметров связывания и карта взаимодействий вещество—протеин показали значительное влияние стереохимии 3-алкил-1*H*-фосфолан оксидов на фунгицидную активность. Для каждого соединения из ряда изученных фосфолан оксидов предложен наиболее биологически активный стереоизомер.

5. Установлено, что алкильный заместитель в 1*H*-фосфолан оксидах играет значительную роль в связывании с рецепторами белков за счет гидрофобных взаимодействий, поэтому в качестве потенциального соединения, фунгицидная активность которого может быть сопоставима с пропиконазолом, предложен 3-октил-1*H*-фосфолан оксид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Химическая защита растений / Под ред. Г.С. Груздева. М.: Агропромиздат, 1987. 415 с.
2. Дьяконов В.А., Махаматханова А.Л., Тюмкина Т.В., Джемилев У.М. Синтез и превращения металлациклов. Сообщ. 41. Реакция каталитического циклоалюминирования в синтезе 3-замещенных фосфоланов // Изв. АН. Сер. хим. 2012. № 8. С. 1540–1543.
3. D'yakonov V.A., Makhamatkhanova A.L., Agliullina R.A., Dilmukhametova L.K., Tyumkina T.V., Dzhemilev U.M. Aluminacyclopentanes in the synthesis of 3-substituted- and α, ω-bisphospholanes // Beilstein J. Org. Chem. 2016. V. 12. P. 406–412.
4. Nemoto T. Hamada Y. Pd-catalyzed asymmetric allylic substitution reactions using P-chirogenic diaminophosphine oxides: DIAPHOXs // Chem. Rec. 2007. V. 7. P. 150–158.
5. Finkbeiner P., Hehn J.P., Gnam C. Phosphine oxides from a medicinal chemist's perspective: Physicochemical and *in vitro* parameters relevant for drug discovery // J. Med. Chem. 2020. V. 63. P. 7081–7107.
6. Чекмарев В.В. Способ определения фунгицидной активности химических веществ препаратов: Пат. 2546285, РФ // Офиц. Бюл. «Изобретения. Полезные модели». 2015. № 10.
7. МУК 4.2.1890-04. 4.3. Диско-диффузионный метод (ДДМ). Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Роспотребнадзор, 2004. С. 18–21.
8. МУК 4.2.1890-04. 4.2. Методы серийных разведений. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Роспотребнадзор, 2004. С. 10–18.
9. Wang X., Shen Y., Wang S., Li S., Zhang W., Liu X., Lai L., Pei J., Li H. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. № W1. P. W356–W360.
10. Antypenko L., Meyer F., Sadyk Z., Shabelnyk K., Kovalenko S., Steffens K.G., Garbe L.-A. Combined application of tacrolimus with cyproconazole, hymexazol and novel {2-(3-*R*-1*H*-1,2,4-triazol-5-yl)phenyl} amines as antifungals: *In Vitro* growth inhibition and *In Silico* molecular docking analysis to fungal chitin deacetylase // J. Fungi. 2023. V. 9. № 1. P. 79.
11. Labib Mai M., Amin M.K., Alzohairy A.M., Elashtokhy M.M.A., Samir O., Hassanein S.E. Inhibition analysis of aflatoxin by *in silico* targeting the thioesterase domain of polyketide synthase enzyme in *Aspergillus* ssp. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. V. 40. № 10. P. 4328–4340.

12. Boissy G., O'Donohue M., Gaudemer O., Perez V., Pernollet J.-C., Brunie S. The 2.1 Å structure of an elicitor-ergosterol complex: A recent addition to the Sterol Carrier Protein family // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 6. P. 1191–1199.
13. Yoneda K., Nagano R., Mikami T., Sakuraba H., Fukui K., Araki T., Ohshima T. Catalytic properties and crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase-like l-threonine 3-dehydrogenase from *Phytophthora infestans* // *Enzyme Microb. Technol.* 2020. V. 140. P. 109627.
14. Crowley P.J. Use as agrochemicals // *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Oxford: Pergamon, 1984. P. 185–199.
15. Yotsuji A., Mitsuyama J., Hori R., Yasuda T., Saikawa I., Inoue M., Mitsuhashi S. Mechanism of action of cephalosporins and resistance caused by decreased affinity for penicillin-binding proteins in *Bacteroides fragilis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988. V. 32. № 12. P. 1848–1853.
16. Truesdell S.E., Zurenko G.E., Laborde A.L. Interaction of cephalosporins with penicillin-binding proteins of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *J. Antimicrob. Chemother.* 1989. V. 23. № suppl_D. P. 13–19.
17. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. № 16. P. 2785–2791.
18. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, v21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes. 2020.
19. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 235–242.
20. Braun O., Knipp M., Chesnov S., Vašák M. Specific reactions of S-nitrosothiols with cysteine hydrolases: A comparative study between dimethylargininase-1 and CTP synthetase // *Protein Sci.* 2007. V. 16. № 8. P. 1522–1534.
21. Tyumkina T.V., Islamov D.N., Parfenova L.V., Khalilov L.M., Dzhemilev U.M. Structure and conformations of 2-substituted and 3-substituted alumolanes in polar solvents: a direct NMR observation // *Magn. Reson. Chem.* 2016. V. 54. № 1. P. 62–74.

Experimental and Theoretical Evaluation of Fungicidal and Bactericidal Activity of 3-Alkyl substituted 1*H*-phospholane Oxides

T. V. Tyumkina^{a, #}, K. A. Bulatova^b, D. N. Islamov^a, A. L. Makhamatkhanova^a,
M. I. Mallyabaeva^b, D. Sh. Sabirov^a

^a*Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, prosp. Oktyabrya 141, Ufa 450075, Russia*

^b*Ufa State Petroleum Technical University, ul. Kosmonavtov 1, Ufa 450062, Russia*

[#]*E-mail: ttvnmr@gmail.com*

The fungicidal and bacterial activity of the model compound 3-hexyl-1*H*-phospholane oxide was tested using fungi of the genus *Septoria* sp., *Phytophthora* sp., *Puccinia* sp., and *Aspergillus* sp., as well as *Escherichia coli* bacteria. A comprehensive analysis of the experimental data obtained and docking on selected targets of key proteins of each test object made it possible to evaluate the potential pesticidal activity of the phospholane oxide class.

Keywords: 1*H*-phospholane oxides, fungicidal activity, *Escherichia coli* bacterium, docking.