

УДК 577.15(025.3 + 087.4:543)

## **ВЫБОР УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ: ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ РАССМОТРЕНИЕ**

**Н.Л. Еремеев, И.Н. Курочкин, А.В. Еременко, С.Д. Варфоломеев, Е.И. Райнина**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
химический факультет, кафедра химической энзимологии;  
e-mail:eremeev@enzyme.chem.msu.ru)*

**Проведено теоретическое рассмотрение механизмов взаимодействия ингибиторов с ферментом с точки зрения требований ферментного ингибиторного анализа. Показано, что знание механизма ингибирования позволяет разработать правильную стратегию проведения аналитической процедуры с представлением экспериментальных данных в виде удобных прямолинейных калибровочных зависимостей. Рассчитаны пределы детекции каждого из рассмотренных вариантов анализа. Обсуждены факторы, влияющие на процедуру определения необратимых ингибиторов.**

Принцип анализа соединений, основанный на ингибировании ими ферментов, лежит в основе многих современных биосенсоров [1–9]. Наиболее часто подобные подходы применяются для оценки различных загрязнителей окружающей среды [10–14]. Обычно кон-

центрацию ингибитора определяют на основе калибровочной зависимости в координатах  $I_{\text{эф}} = (A_0 - A_I)/A_0$  от  $[I]$ , где  $I_{\text{эф}}$  – так называемый ингибирующий эффект,  $A_0$  – исходная активность фермента,  $A_I$  – активность после инкубации фермента с раствором ингибитора

$I$  определенной концентрации [3, 10, 11, 15, 16]. Время инкубации при этом обычно выбирается произвольно.

На наш взгляд, такое представление экспериментальных данных имеет ряд недостатков: 1) зависимость ингибирующего эффекта от концентрации ингибитора чисто эмпирическая и не имеет строгого физического смысла; 2) для сложных механизмов ингибирования наличия одного типа представления данных явно недостаточно; 3) реальные образцы при мониторинге, например окружающей среды, с очевидностью будут содержать смеси ингибиторов, каждый из которых может реагировать с ферментом по различным механизмам.

Подробный теоретический анализ подобной ситуации в литературе отсутствует, однако встречаются указания на то, что наличие в смеси равновесных ингибиторов мешает определению необратимых и наоборот [15, 17–19].

Цель настоящей работы состояла в проведении сравнительного теоретического анализа механизмов взаимодействия ингибиторов и их смесей с ферментом (на примере определения необратимого ингибитора), в разработке стратегии определения ингибиторов разных типов, а также методов представления экспериментальных данных. Особое внимание уделено факторам, определяющим предел детекции аналитической процедуры. В этой связи нами было введено два ограничения: 1) взаимодействие фермента с ингибитором протекает в отсутствие субстрата (наличие субстрата в процессе ингибирования неизбежно приводит к ухудшению предела детекции ввиду конкуренции субстрата и ингибитора за активный центр фермента); 2) уверенное определение ингибирующего эффекта возможно только в диапазоне остаточной ферментативной активности, равной  $0,1-0,9 A_0$ , что связано с ошибкой измерения активности фермента в реальных условиях.

### Ингибирование ферментов в однокомпонентных системах

Из ферментативной кинетики известно, что существуют два принципиально разных типа ингибиторов – обратимые и необратимые.

#### Необратимое ингибирование

Схема необратимого ингибирования фермента записывается как:



где  $I$  – ингибитор,  $EI$  – неактивный комплекс фермент–ингибитор,  $k_{ин}$  – константа скорости второго порядка, а уравнение, описывающее изменение концентрации свободного фермента от времени, выглядит следующим образом:

$$-d[E]_t/dt = k_{ин} \cdot [E]_t \cdot [I]_t, \quad (2)$$

где  $[E]_t$  и  $[I]_t$  – текущие концентрации фермента и ингибитора в момент времени  $t$  соответственно. В анали-

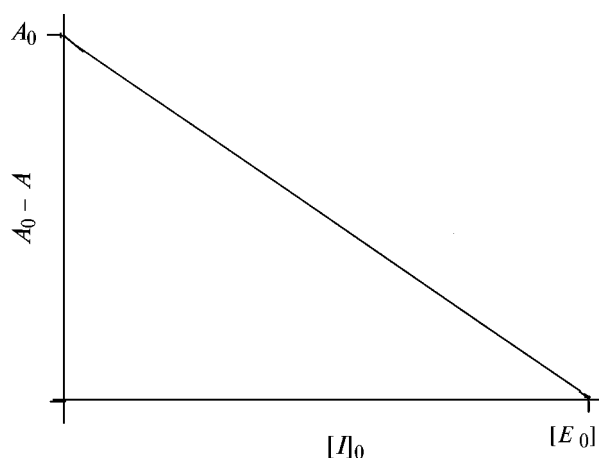


Рис. 1. Калибровочная зависимость для режима титрования активных центров фермента необратимым ингибитором (1), (3)

тическом виде решение уравнения (2) имеет сложный нелинейный вид [20], однако можно выделить два простых предельных случая – режим титрования числа активных центров фермента и режим псевдо-первого порядка.

В режиме титрования числа активных центров фермента мы имеем избыток фермента по сравнению с ингибитором. Тогда при полном протекании реакции весь ингибитор перейдет в фермент-ингибиторный комплекс. Из уравнения материального баланса следует, что в этом случае

$$[L]_0 = [EL] = [E]_0 - [E], \quad (3)$$

и зависимость в координатах  $(A_0 - A = [E]_0 - [E])/[L]_0$  (рис. 1) представляет собой прямую линию, отсекающую на оси абсцисс концентрацию активных центров фермента в эксперименте (давно известный в энзимологии метод титрования активных центров фермента необратимыми инактиваторами [21]). С учетом введенных ограничений диапазон определяемых концентраций ингибитора составляет  $(0,1-0,9)[E]_0$ , а предел детекции  $(0,1[E]_0)$  зависит от чувствительности метода определения концентрации фермента.

С точки зрения построения аналитической процедуры подобный метод, безусловно, является потенциально наиболее чувствительным. К недостаткам его следует отнести большую продолжительность анализа. Реально практическое осуществление такой методики возможно лишь для “быстрых” ингибиторов (высокая величина  $k_{ин}$ ), когда скорость протекания реакции (1) достаточно высока (она полностью протекает в приемлемый промежуток времени). Кроме того, для иммобилизованных ферментов контроль величины  $[E]_0$ , определяющей предел детекции и точность расчета концентрации ингибитора, является весьма сложной технологической задачей, так что в данном случае более предпочтительно использовать растворимые ферменты.

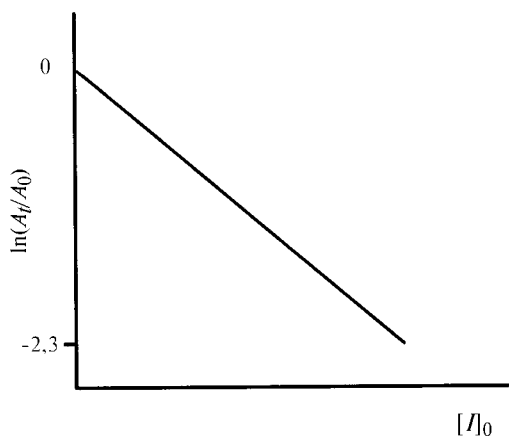


Рис. 2. Калибровочная зависимость для необратимого ингибитора в режиме псевдо-первого порядка (1), (6)

Второй предельный случай необратимого ингибирования – режим псевдо-первого порядка. При большом избытке ингибитора в реакции (1) можно пренебречь его расходом (т.е. принять  $[I]_t \approx [I]_0$ ; где  $[I]_0$  – начальная концентрация ингибитора). Тогда уравнение (2) трансформируется следующим образом:

$$-d[E]_t/dt = k_{\text{ин}}[E]_t \cdot [I]_0, \quad (4)$$

а при решении (4) получим:

$$\ln([E]_t/[E]_0) = -k_{\text{ин}} \cdot [I]_0 \cdot t. \quad (5)$$

Поскольку измеряемая ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации фермента в растворе, то уравнение (5) при фиксированном времени реакции фермента с ингибитором ( $t = \text{const}$ ) можно записать в виде:

$$\ln([E]_t/[E]_0) = \ln(A_t/A_0) = -K \cdot [I]_0, \quad (6)$$

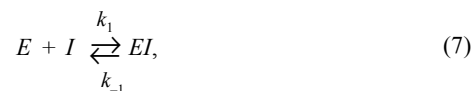
где  $A_0$  – начальная активность фермента,  $A_t$  – активность фермента, измеряемая после инкубации фермента с ингибитором в течение фиксированного времени  $t$ ,  $K = k_{\text{ин}} \cdot t$ . Таким образом, для необратимых ингибиторов ферментов экспериментальные данные возможно линеаризовать в координатах  $\ln(A_t/A_0)$  от  $[I]_0$  (рис. 2). В данном случае как диапазон определяемых концентраций ингибитора ( $(0, 1-2,3)/(k_{\text{ин}} \cdot t)$ ), так и предел детекции ( $0, 1/(k_{\text{ин}} \cdot t)$ ) обратно пропорциональны времени инкубации фермента с ингибитором.

Понятно, что режим псевдо-первого порядка гораздо менее чувствителен, чем режим титрования числа активных центров, однако такой подход имеет свои преимущества. Предел детекции при подобной процедуре не зависит от концентрации фермента. Это означает, что готовые сенсорные элементы, содержащие целевой фермент (мембраны, электроды и т.д.), не будут менять своих аналитических характеристик при хранении, даже если фермент и подвергается инактивации. Необходимо только определить исходную активность мембраны в настоящий момент времени, после чего можно пользо-

ваться полученными ранее калибровками. Однако в данном случае возникает конкретное требование к субстрату, используемому для определения остаточной ферментативной активности  $A_t$ . Определение активности фермента требует некоторого времени, в ходе которого реакция (1) продолжает идти, что может исказить получаемые результаты. Чтобы исключить это побочное явление, субстрат требуется высокоспецифичный и в большом избытке по сравнению с ингибитором – тогда в ходе определения остаточной активности фермента влияние реакции (1) на конечный результат практически будет сведено к нулю.

### Обратимое ингибирование

Схема обратимого ингибирования ферментов выглядит следующим образом:



где  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы прямой и обратной реакции соответственно. Изменение концентрации комплекса фермент–ингибитор во времени записывается следующим уравнением [22]:

$$[EI] = \frac{k_1[E]_0[I]_0}{k_1[I]_0 + k_{-1}} (1 - e^{-(k_1[I]_0 + k_{-1})t}), \quad (8)$$

а изменение активности фермента:

$$A_t/A_0 = 1 - \frac{k_1[E]_0}{k_1[I]_0 + k_{-1}} (1 - e^{-(k_1[I]_0 + k_{-1})t}). \quad (9)$$

Тогда в начальный период времени и/или при больших концентрациях обратимого медленно реагирующего ингибитора может выполняться условие  $k_1 \cdot [I]_0 \gg k_{-1}$ . В этом случае уравнение (9) после логарифмирования трансформируется в уравнение (5). Это означает, что при определенных соотношениях концентраций реагирующих веществ медленно реагирующие обратимые ингибиторы фермента с кинетической точки зрения можно рассматривать как необратимые и применять для обработки экспериментальных данных закономерности псевдо-первого порядка.

В условиях равновесия скорости прямой и обратной реакции в схеме (7) равны и концентрации веществ выражаются через константу ингибирования  $K_I$ :

$$K_I = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[E][I]}{[EI]}. \quad (10)$$

Из уравнения материального баланса для фермента ( $[E]_0 = [E] + [EI]$ ) следует:

$$[E]/[E]_0 = 1 - [EI]/[E]_0. \quad (11)$$

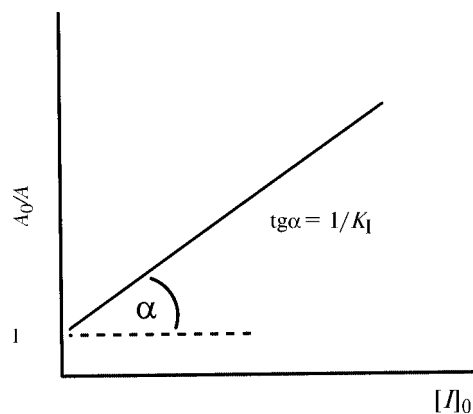


Рис. 3. Калибровочная зависимость для быстро-реагирующего обратимого ингибитора фермента (7), (10)

Подставляя уравнение (11) в (10) и проводя преобразование, получаем:

$$[E]_0/[E] = 1 + [I]/K_I \quad (12)$$

Поскольку при прочих равных условиях активность фермента  $A$  прямо пропорциональна концентрации активного фермента  $[E]$ , а концентрации ингибиторов обычно много больше, чем концентрация фермента (т.е.  $[I]_0 \gg [E]_0$ , и таким образом,  $[I] \sim [I]_0$ ), анализ результатов удобно проводить в координатах ( $[A]_0/[A]$  от  $[I]_0$ ). Калибровочная зависимость в данном случае будет представлять собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным  $1/K_I$  (рис. 3). Диапазон определяемых концентраций ингибитора составляет  $(0,1-9)K_I$ , предел детекции –  $0,1K_I$ . Однако по сравнению с необратимым ингибированием требования к субстрату, по которому определяется остаточная ферментативная активность, несколько иные. Действительно, наличие субстрата не должно смещать равновесие в реакции (7). Это означает, что скорость трансформации субстрата должна быть много выше скорости диссоциации комплекса фермент–ингибитор, тогда при минимальном времени определения активности равновесие (и равновесные концентрации компонентов) реакции (7) практически не изменятся. Однако для “быстрых” обратимых ингибиторов (с высокими скоростями прямой и обратной реакции (7)) остаточная активность фермента будет зависеть от соотношения концентраций субстрата и ингибитора, а следовательно, простое линейное представление результатов, согласно уравнению (12), невозможно.

#### Определение необратимого ингибитора в двухкомпонентных смесях

При переходе к многокомпонентным смесям ингибиторов (простейший случай – двухкомпонентная система) наблюдаемая картина резко усложняется. В подобных случаях возможно определение только суммарной ингибирующей активности, и выделение ингибирующей активности индивидуальных компонентов реально толь-

ко при проведении дискриминационных экспериментов в условиях аддитивности вкладов обоих ингибиторов. Пара ингибиторов может состоять из двух необратимых, двух обратимых или обратимого и необратимого ингибиторов. Ситуация усложняется тем, что ингибиторы могут взаимодействовать с одним и тем же сайтом активного центра фермента (назовем такие ингибиторы взаимозависимыми) или же с разными (взаимонезависимые). В рамках данного изложения мы ограничимся рассмотрением влияния типа и характера второго ингибитора (необратимого и обратимого, взаимозависимого и взаимонезависимого) на процедуры определения необратимого ингибитора.

#### Второй ингибитор – необратимый

Итак, взаимозависимые ингибиторы конкурируют друг с другом за активный центр фермента (13), а взаимонезависимые не влияют на протекание параллельной реакции (14).

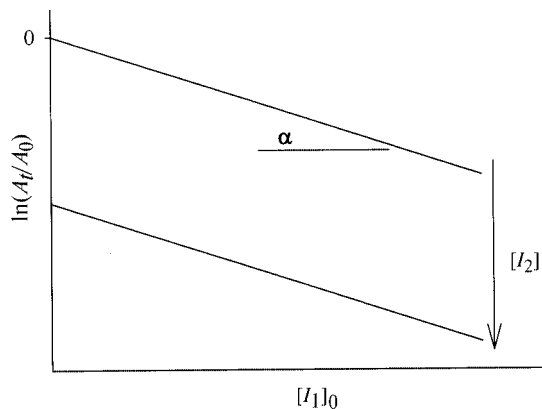
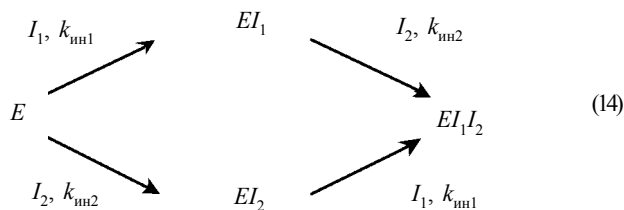


Рис. 4. Калибровочные зависимости в режиме псевдо-первого порядка для необратимого ингибитора  $I_1$  при наличии в смеси различных (но фиксированных) концентраций необратимого ингибитора  $I_2$  (13), (14)

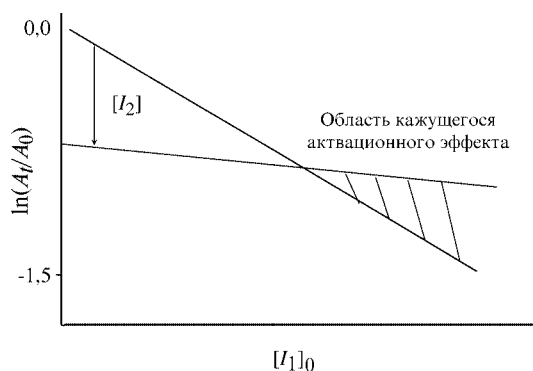


Рис. 5. Калибровочные зависимости для необратимого ингибитора в присутствии взаимозависимого обратимого ингибитора  $I_2$  (схема (19))

Режим псевдо-первого порядка применим в обоих случаях и полулогарифмическая зависимость остаточной ферментативной активности от времени реакции (5) представляет собой сумму двух членов, пропорциональных концентрации соответствующего ингибитора и его бимолекулярной константы взаимодействия:

$$\ln([E]/[E]_0) = \ln(A/A_0) = -(k_{ин1} [I_1]_0 + k_{ин2} [I_2]_0) \cdot t \quad (15)$$

Это означает, что калибровочные зависимости для  $I_1$  в присутствии разных (но фиксированных) концентраций  $I_2$  будут представлять собой набор параллельных прямых с тангенсом угла наклона, равным  $-k_{ин1} \cdot t$ , и отрезком, отсекаемым на оси ординат (сдвиг по оси  $\ln(A/A_0)$ ), равным  $-k_{ин2} \cdot [I_2]_0 \cdot t$  (рис. 4). Таким образом, в режиме псевдо-первого порядка вклады ингибирующей активности двух необратимых ингибиторов в полулогарифмических координатах  $\ln(A/A_0)/[I]$  аддитивны. При наличии возможности в независимом эксперименте определить концентрацию второго необратимого ингибитора  $[I_2]_0$  можно пользоваться калибровочными зависимостями для индивидуального ингибитора  $I_1$  для расчета его концентрации.

Однако в режиме титрования числа активных центров фермента аддитивность вкладов ингибирующей активности компонентов смеси и грамотное применение уравнения (3) возможны только в случае взаимозависимых ингибиторов (13):

$$[I_1]_0 + [I_2]_0 = [EI_1] + [EI_2] = [E]_0 - [E]. \quad (16)$$

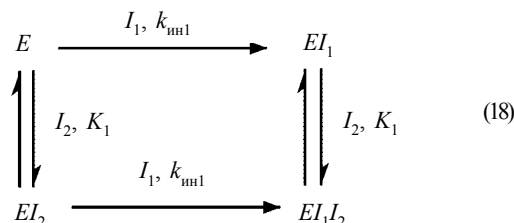
Для взаимонезависимых ингибиторов (14) последний член уравнения материального баланса (концентрация тройного комплекса) определяется как соотношением концентраций ингибиторов в смеси, так и константами их взаимодействия с ферментом:

$$[E]_0 - [E] = [EI_1] + [EI_2] + [EI_1I_2], \quad (17)$$

что не позволяет в данном случае получать достоверные результаты с использованием режима титрования активных центров фермента.

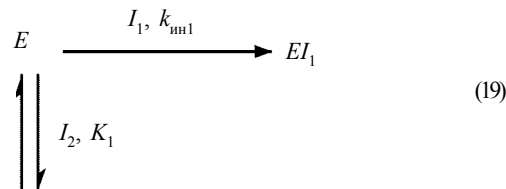
### Второй ингибитор – обратимый

С точки зрения определения необратимого ингибитора наиболее простым кинетическим случаем является наличие в смеси взаимонезависимого обратимого ингибитора (18):



В полулогарифмических координатах типа (5) калибровочные зависимости для необратимого ингибитора  $I_1$  в присутствии различных концентраций обратимого  $I_2$  будут представлять собой набор параллельных прямых (аналогично рис. 4) с тангенсом угла наклона, равным  $k_{ин1} \cdot t$ , и отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным  $\ln\{A_0/(1 + [I_2]_0/K_1)\}$ .

Гораздо более сложная ситуация реализуется в случае наличия в смеси обратимого взаимозависимого ингибитора (19):



Скорость инактивации фермента необратимым ингибитором зависит от свободной концентрации фермента. В свою очередь, свободная концентрация фермента определяется его взаимодействием с обратимым ингибитором.

Таким образом, не только отрезок, отсекаемый на оси ординат ( $-\ln\{A_0/(1 + [I_2]_0/K_1)\}$ ), но и тангенс угла наклона калибровочной зависимости для необратимого ингибитора  $I_1$  ( $-k_{ин1}/(1 + [I_2]_0/K_1)$ ) становится зависимым от концентрации обратимого ингибитора  $I_2$ . Равновесный комплекс  $EI_2$  (19) служит в данном случае в качестве своеобразного “депо” для фермента, высвобождая свободный фермент в раствор по мере его инактивации необратимым ингибитором. Это приводит к тому, что при высоких концентрациях обратимого ингибитора мы можем наблюдать кажущийся “активационный” эффект обратимого ингибитора по отношению к действию необратимого (рис. 5).

На основании вышесказанного можно сделать следующий вывод: знание механизмов взаимодействия ингибиторов с ферментом позволяет выбирать правильную стратегию создания аналитической процедуры, основанной на ингибиторном анализе, с представлением экспериментальных данных в виде удобных прямолинейных зависимостей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gindilis A.L., Morzunova T.G., Barmin A.V., Kurochkin I.N.* // Biosens. Bioelectron. 1996. **11**. P. 873.
2. *Гиндилис А.Л., Курочкин И.Н.* // Прикл. Биохимия Микробиология. 1998. **34**. С. 326.
3. *Liang J.F., Li Y.T., Yang V.C.* // J. Pharm. Sci. 2000. **89**. P. 979.
4. *Alexander P.W., Rechnitz G.A.* // Electroanalysis. 2000. **12**. P. 343.
5. *Ivanov A.N., Lukachova L.V., Evtugin G.F., Karyakina E.E. et al.* // Bioelectrochemistry. 2002. **55**. P. 75.
6. *Kok F.N., Bozoglu F., Hasirci V.* // Biosens. Bioelectron. 2002. **17**. P. 531.
7. *Gustavsson E., Bjurling P., Sternesjo A.* // Anal. Chim. Acta. 2002. **468**. P. 153.
8. *Vilatte F., Schulze H., Schmid R.D., Bachmann T.T.* // Anal. Bioanal. Chem. 2002. **372**. P. 322.
9. *White B.J., Harmon H.J.* // Biosens. Bioelectron. 2002. **17**. P. 463.
10. *Palcetti I., Cagniani A., Del Gabrio M., Coppi C. et al.* // Anal. Chim. Acta. 1997. **337**. P. 315.
11. Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field (D.P. Nikolelis et al., Eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1998.
12. *Saveliev A.A., Evtugin G.A., Semanov D.A.* // Environ. Radioecol. Appl. Ecol. 2001. **7**. P. 47.
13. *Collier W.A., Clear M., Hart A.L.* // Biosens. Bioelectron. 2002. **17**. P. 815.
14. *Turgeon G., Popesku I.C., Oniciu L.* // Can. J. Chem. 2002. **80**. P. 315.
15. *Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А.* // ЖАХ. 1992. **47**. С. 1358.
16. *Zhang S., Zhao H., John R.* // Biosens. Bioelectron. 2001. **16**. P. 1119.
17. *Simonian A.L., Rainina E.I., Wild J.R.* // Anal. Lett. 1997. **30**. P. 2453.
18. *Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A.* // Envir. Sci. Technol. 2001. **35**. P. 2562.
19. *Bachmann T.T., Leca B., Vilatte F., Marty J.L. et al.* // Biosens. Bioelectron. 2002. **15**. P. 193.
20. *Cornish-Bowden A.* Fundamentals of Enzyme Kinetics. London, Portland Press, 1999. P. 94.
21. *Bender M.L., Begue-Canton M.L., Blakeley R.L., Brubacher L.J. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 1966. **88**. P. 5890.
22. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика. М., 1999. С. 202.

Поступила в редакцию 25.10.02