

УДК 541.128

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ

Пурмаль А. П., Николаев Л. А.

Приведен исторический обзор работ по моделированию биологических катализаторов. Рассмотрены те исследования, которые носили пионерский характер, привели к формированию новых концепций, гипотез или принципов либо же к практически важным результатам. Наибольшее внимание в обзоре уделено моделированию оксидоредуктаз.

Библиография — 124 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Первые модели металлоферментов	786
II. Комплексы металлов, как модели активных групп	788
III. Модели безметалльных активных групп ферментов	789
IV. Исследование металлокомплексов — моделей каталазы и нитрогеназы	791
V. Модели оксидаз, оксигеназ и других ферментов	795
VI. Моделирование ферментов, как путь к новым катализаторам	796
VII. О роли высокомолекулярной части в модельных системах и белка в ферментах	798

Биологические катализаторы, ферменты — специфические белковые катализаторы, присутствующие во всех живых клетках. Изучение катализаторов небелковой природы, ускоряющих те же реакции, что и ферменты, сформировалось в научное направление моделирования биологических катализаторов.

Любая модель отражает ту или иную характерную особенность оригинала. Если характерной особенностью ферментов считать их высокую каталитическую активность, то в качестве первых моделей следует назвать коллоидные растворы металлов. Изучение этих систем относится к началу века; первым моделируемым объектом из числа ферментов оказалась каталаза, осуществляющая в условиях живой клетки процесс разложения пероксида водорода.

I. ПЕРВЫЕ МОДЕЛИ МЕТАЛЛОФЕРМЕНТОВ

Бредиг и его сотрудники исследовали коллоидные растворы платины и других высокодисперсных благородных металлов и убедились, что эти простые «модели» действительно напоминают ферменты [1, 2]. Изучение кинетики каталитических процессов на высокодисперсных металлах позволило обнаружить определенные сходства в кинетических характеристиках моделей и оригиналов. Подобно ферментам, модели Бредига действовали в очень малых концентрациях, причем зависимость скорости от концентрации пероксида водорода в модельных системах была весьма похожа на зависимость, характерную для ферментов. Это наблюдалось не только для коллоидных металлов, но и для золей оксидов металлов. Аналогично обстояло дело и с влиянием pH на каталитическую активность; оно оказалось сходным в модельной и моделируемой системах. Повышение pH в обоих случаях приводило к достижению некоторого максимума скорости разложения пероксида. Выдерживание растворов при повышенных температурах вело к снижению активности и каталазы и модельных систем.

Особенно убедительно сопоставление действия определенных веществ — каталитических ядов — на ферменты и модели. Выяснилось, что модели, т. е. золи металлов, инактивируются теми же веществами, что и фермент каталаза, а именно соединениями ртути, цианидами, сероводородом, иодом и т. п. После отравления золя платины цианистым во-

дородом активность золя можно восстановить длительным пропусканием воздуха через раствор; совершенно так же ведет себя и каталаза. Столь значительное сходство в зависимости от различных факторов было в какой-то мере обусловлено тем, что моделируемый фермент содержал металл (железо) в составе активной группы.

Золи металлов привлекли внимание многих исследователей [3, 4], но в целом изучение свойств зольей — сравнительно с ферментами достаточно примитивных систем — не могло существенно ускорить прогресс моделирования биокатализа.

В работах [5, 6] установлено, что платиновые металлы ускоряют разложение муравьиной кислоты, а также разлагают формальдегид (на CO и H_2). В этом можно увидеть функции, напоминающие действие оксидоредуктаз. Перенос водорода от формальдегида к метилсеновому голубому под влиянием «шардингеровского» фермента из сырого молока моделируется по Бредигу и Зоммеру [7] восстановлением красителя муравьиной кислотой в присутствии зольей платины, иридия, золота, палладия. Для этих реакций удалось доказать наличие кинетических аналогий с ферментами и установить отравляющий эффект таких ферментных ядов, как синильная кислота и соли ртути.

По активности золи значительно уступают ферментам. Так, по данным [8], препарат каталазы из печени почти в 1000 раз активнее коллоидной платины. Правда, сравнение проводить довольно трудно, так как неизвестны ни число и характер распределения активных точек на частицах золя, ни правомерность применения гомогенной кинетики к изучаемым микрогетерогенным системам.

Катализ металлами, находящимися в дисперсном состоянии, реакций разложений пероксида водорода были склонны объяснять образованием промежуточных соединений пероксидного характера. Пероксидные соединения ртути в случае катализа разложения H_2O_2 этим металлом были обнаружены [9].

Более поздние работы по изучению зольей металлов касались свойств вольфрама [10], коллоидного серебра [11], а также гидроокиси железа [12].

Золи платиновых металлов очень неустойчивы и для использования в препаративных целях необходимо было повысить их стабильность. Этого удалось достичь введением в коллоидный раствор металла так называемых защитных коллоидов, образующих на поверхности частиц золя адсорбционный слой, препятствующий их коагуляции [13, 14]. В качестве защитного коллоида в 1904 г. [13] был использован продукт щелочного гидролиза яичного альбумина — натриевые соли лизальбиновой и протальбиновой кислот. Эти кислоты осаждаются в кислой среде и поэтому ими можно пользоваться лишь в нейтральных или слабощелочных растворах. В 1912 г. [14] с использованием в качестве защитного коллоида гуммиарабика были получены активные золи, пригодные для гидрирования большого числа соединений в широком диапазоне рН.

Несмотря на серьезные сомнения в целесообразности попыток понять механизм действия ферментов, изучая золи металлов, внимательное изучение этого исторического этапа развития науки о катализе показывает, что он отнюдь не был бесплодным. Если не сами металлы, то ионы металлов имеют действительно прямое отношение к ферментам.

Прогресс биохимических исследований, приведший к раскрытию химической природы активных групп металлосодержащих ферментов, привлек внимание к каталитическим свойствам удивительной группы соединений, содержащих порфиновое ядро и различные ионы металлов, координированные системой пиррольных циклов ядра:

В 1926 г. был сделан первый шаг в исследовании активности групп, характерных для ферментов. Авторы работы [15] исследовали каталитическую активность гемина — комплексного соединения железа с протопорфириновым ядром. Соединения этого типа представляют собой активную группу большого числа ферментов, катализирующих окислительные процессы, и поэтому вопрос о свойствах гемина был важен с точки

зрения моделирования. В ферментах гемин связан с белком, и измерения активности изолированного гемина в какой-то степени проливали свет на роль белковой части молекул биологических катализаторов (см. обзор [16]).

Эти эксперименты показали особенно отчетливо, что активная группа, отделенная от своего носителя, обладает значительно меньшей активностью и весьма слабо выраженной избирательностью. Активность гемина в реакции разложения пероксида водорода удалось увеличить его адсорбцией на угле [17]. Адсорбция активирует гемин по отношению к определенным, но не всем реакциям, в которых он вообще проявляет себя как катализатор.

Ионы железа тоже активируются адсорбцией на угле [17]. Такие системы можно рассматривать как простейшие и очень грубые модели ферментов, в которых уже более определенно намечены активная группа и носитель. Вместе с тем выяснилось, что и соединения, вовсе не содержащие металлов и относительно просто построенные, способны катализировать реакции, характерные для ферментов. Так, Шилов, развивший концепцию циклического переходного комплекса в органических реакциях [18], исследовал каталитические функции аминов и аминокислот [19]; Свен и Броун [20] показали, что каталитический эффект может определяться одновременным воздействием на субстрат двух различных функциональных групп, содержащихся в молекуле катализатора. Этот эффект («бифункциональный катализ»), как выяснилось в дальнейшем, играет важную роль в механизме действия ферментов.

В последующих работах по моделированию ферментов, определились два направления: 1) изучение моделей активных групп ферментов для раскрытия особенностей структуры и механизма их действия в составе фермента; 2) синтез высокоактивных катализаторов на основе уже имеющейся информации о структуре и специфических механизмах действия ферментов.

Первое из этих направлений, развиваясь, постепенно переросло первоначальные цели исследования и привело к формированию нового раздела химии — металлокомплексного катализа. В нашей стране исследования в этом направлении начаты одним из авторов этой статьи [21].

II. КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ, КАК МОДЕЛИ АКТИВНЫХ ГРУПП

Николаев [16, 22, 23] провел серию исследований моделей активных групп металлосодержащих ферментов, причем в качестве модельного металла сначала была выбрана медь. Ионы меди в отличие от ионов железа, с его очень малой величиной произведения растворимости для $\text{Fe}(\text{OH})_3$, образуют большее число комплексов, устойчивых в водной среде при избытке лиганда в растворе и допускают более широкое варьирование природы лигандов. Позже были изучены и другие ионы металлов как катализаторы различных реакций (разложение пероксида водорода, окисление полифенолов, окисление аскорбиновой кислоты и др.) и сформулированы первые закономерности, связывающие каталитическую активность и природу лиганда.

Полученные результаты суммированы в монографии [16] и обзорных статьях [22, 23]. Основная идея, послужившая стимулом к изучению каталитических свойств комплексов, заключалась в предположении, что свойства активного центра гетерогенных катализаторов можно интерпретировать, имея данные о влиянии окружения иона металла на его активность, причем комплекс в известной мере является аналогом активного центра, «вычлененного» из твердого тела и перенесенного в раствор. Этот путь «перебрасывания мостов» между гетерогенным и гомогенным катализом и поныне остается перспективным, но движение по нему требует больших усилий, чем казалось сначала. Тем не менее уже первые шаги показали, что вариация активности и селективности катализаторов типа комплексных соединений металлов вполне возможна и

открывает широкие и интересные направления в теории и практике катализа. Изучение влияния природы лигандов, природы иона металла, геометрических особенностей комплексов многое разъяснило в механизме действия ферментов и сделало более ясными те задачи, которые предстоит решать теоретической энзимологии.

Прежде всего выяснилось, что условием, которое обязательно должно соблюдаться, чтобы комплекс вообще обнаружил заметную каталитическую активность, является ограничение, налагаемое на координационное число — оно не должно быть более четырех. Комплексы «закрытого» типа с координационным числом шесть или более, как правило, неактивны.

Для комплексов-катализаторов редокс-процессов и, в частности, разложения пероксида водорода важно также наличие в координационной сфере аминного азота — введение в эту сферу кислорода ведет к снижению активности. Американские ученые [24] показали, что эти условия в значительной мере справедливы и для реакций катализа гидролиза органических веществ комплексными соединениями переходных металлов.

К этому же кругу работ относится исследование каталитических свойств комплекса железа с триэтилентетрамином, получившего название «неорганическая каталаза» [25, 26]. Как и в ранних работах Бредига, в этих исследованиях подчеркивается сходство в природе каталитических ядов каталазы и изучавшегося комплекса, а также близкие величины изотопных эффектов. Из всех изученных к этому времени комплексов железа эта система обладала наивысшей каталазной активностью (при тех же оговорках о сложности корректного сопоставления каталитической активности систем по величинам числа оборотов, определяемых при различных рН). Как выяснилось позднее [27], комплексы ионов железа с триэтилентетрамином моделируют важную черту каталазного процесса. Механизм катализа разложения пероксида водорода этим комплексом включает последовательность двух двухэлектронных переносов, т. е. имеет место нерадикальный механизм катализа, как и в случае каталазы.

Свойства зольей металлов, содержащих на поверхности соединения различного состава, с точки зрения катализа и позиций коллоидной химии описаны в [28]. Дальнейшим развитием этого направления надо считать мицеллярный катализ, который можно рассматривать как один из аспектов моделирования биологических катализаторов.

Обзор работ по комплексам металлов, в которых лигандами являются молекула или ион субстрата, можно найти в монографии [29].

III. МОДЕЛИ БЕЗМЕТАЛЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ГРУПП ФЕРМЕНТОВ

Параллельно с работами, посвященными металлокомплексным моделям активных групп ферментов, развивались и исследования модельных структур, не содержащих ионов металлов. Исследования по первому направлению привели к формированию нового научного раздела — металлокомплексного катализа. Работы по второму направлению заложили основы другого научного раздела — катализа органическими соединениями.

Возможность создания простых органических моделей ферментов предвидел еще Оствальд [1, с. 161]. Первые попытки демонстрации подобия стереохимической специфичности ферментов и простых органических моделей были предприняты в 1908 г. Было показано, что никотин расщепляет оптические изомеры камфаркарбоновой кислоты с различной скоростью [1, с. 161].

В 1927 г. Лангенбек исследовал изатин, как модель фермента дегидразы и установил механизм его действия, имеющий сходные черты с механизмом действия фермента [30]. А тремя годами позже Лангенбек, Хутенрейтер и Юттерман предложили принцип систематического акти-

вирования [1, с. 96]. Был сформулирован ряд правил, руководствуясь которыми можно было, последовательно модифицируя простое органическое соединение, выбранное как модель фермента, увеличивать его каталитическую активность.

Яркой демонстрацией эффективности принципа систематического активирования является исследование метиламина и его производных в качестве катализаторов декарбоксилирования фенилглиоксиловой кислоты. Путем последовательной модификации метиламина до 1-метил-3-амино-оксиндола удалось увеличить его декарбоксилазную активность в тысячу раз. Этим путем исследователи близко подошли к раскрытию структуры активной группы фермента декарбоксилазы. Большим успехом использования метода моделирования для установления механизма действия ферментов явились результаты исследований Браунштейна, Шемякина [31] и Метцлера, Икава, Снелла и др. [32—34]. В этих работах изучены модели трансаминаз и других пиридоксальных ферментов переаминирования, рацемизации и др. Модельной системой служил пиридоксаль или его фосфат, т. е. относительно простое органическое соединение, не содержащее белкового компонента.

Следует остановиться на работах, в которых выявлена активирующая роль высокомолекулярного компонента, связанного с моделью активной группы фермента. Выше уже упоминалась активация гемина и ионов железа при их адсорбции на угле. Модельные системы такого рода, не содержащие ионов металлов, были описаны в 1932 г. и названы фазер-катализаторами [2]. Фазер-катализаторы — это производные целлюлозы, в которых массивная молекула носителя-целлюлозы связана с диэтиламином, моделирующим небольшую активную группу фермента декарбоксилазы. Модельной в этих исследованиях являлась реакция отщепления углекислоты от бромкамфорных кислот. Подобные работы были проведены и при изучении декарбоксилазной активности различных аминов, связанных с находящимся в растворе в виде эмульсии лецитином [1].

Суммируем, что же собственно дал энзимологии к началу 60-х гг. метод моделирования. Было показано: 1) высокую активность и определенную специфичность действия можно воспроизвести и с помощью материалов небиологической природы; 2) активность ферментов связана с небольшой группой атомов, чрезвычайно чувствительной к любым структурным перестройкам (как правило, эти группы содержат азот, входящий в гетероцикл или в аминокислотную группу, т. е. аминный азот); 3) координация атомов в активной группе комплекса должна оставлять некоторое «реакционное пространство» [16], в которое попадает молекула субстрата; 4) «носитель» (в ферментах — это белок) изменяет и активность, и специфичность действия катализаторов.

Вопрос о роли высокомолекулярной компоненты ферментов — белка — остался, однако, без ответа. Какой физико-химический фактор или факторы являются причиной такого влияния белковой части молекулы фермента на реакционную способность активной группы? Ответ на этот вопрос имеет фундаментальное значение для проблемы создания синтетических высокоактивных и селективных катализаторов. В случае, если именно белковая природа высокомолекулярной части фермента необходима для реализации каталитических свойств ферментов, перспектива создания практически важных ферментоподобных катализаторов является весьма отдаленной.

Большое внимание привлекло поэтому сообщение, что при обработке протеолитическими ферментами удается укоротить белковую часть фермента папаина почти на 90% без заметной потери каталитических свойств. Этот результат, хотя и не прояснял роль белка в ферменте, несомненно, «вдохновил» исследователей, занимавшихся моделированием ферментов. Последующие исследования показали, однако, что присущая папаину специфическая активность сохраняется при уменьшении числа аминокислотных остатков от 187 (в папаине) лишь до 75—80 в активном ферменте [35].

Проверка результатов работ по фрагментации папаина показала в последующем ошибочность и этого результата [36]. В большом числе других изученных ферментов также не удалось наблюдать сохранения активности при существенных укорочениях белковой цепи. Вопрос о возможной роли белковой части ферментов, как фактора, определяющего их каталитические свойства, рассматривается ниже.

IV. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ — МОДЕЛЕЙ КАТАЛАЗЫ И НИТРОГЕНАЗЫ

Развитие термодинамики последовательного комплексообразования и быстрое накопление количественных данных о величинах констант устойчивости различных металлокомплексов в 60-е гг. позволило провести систематическое исследование для рядов комплексных соединений ионов Cu(II) — от Cu^{2+} до медьсодержащего белка гемоцианина и ионов Fe(III) — от Fe^{3+} до каталазы. Эти исследования суммированы в [37] и получили частичное отражение в работе [38]. Уровень развития кинетических методов исследования сложных процессов позволил оперировать не только понятием эффективной каталитической активности, но и характеристиками механизма процесса, вплоть до констант скоростей отдельных стадий в наиболее изученных системах [39—44].

В этих работах было показано, что моноядерные комплексы ионов меди и железа вызывают радикально-цепной распад пероксида водорода с участием комплекса металла в стадиях инициирования, продолжения и обрыва цепи. Длина цепи в зависимости от концентрационных условий варьирует от 3 до 50.

Таким образом, при более строгих требованиях к подобию свойств фермента и модели по признаку однотипности принципиального механизма процесса, моноядерные комплексы Cu(II) и Fe(III) не могут рассматриваться как модели каталазы.

Каталитически активны оказались лишь те комплексы меди, для которых величина окислительно-восстановительного потенциала заметно положительна, что допускает переходы $\text{Cu(II)} \leftrightarrow \text{Cu(I)}$ на лимитирующих стадиях инициирования и продолжения цепи. Вхождение кислородного лиганда в координационную сферу или образование комплекса Cu(II) с четырьмя азотными лигандами приводит к неблагоприятному изменению окислительно-восстановительного потенциала и потере металлокомплексами каталитических свойств. Генерация радикалов при их взаимодействии с пероксиданионом практически не происходит.

Молекулярный механизм катализа, присущий каталазе и многим другим металлоферментам, осуществляется лишь в случае комплексов Cu^{2+} с триэтиламинном [45] и Fe^{3+} с этилендиаминтетрауксусной кислотой [46], включающих два близко расположенных иона металла, действующих как кооперативный акцептор-донор пары электронов.

Исследование каталазы [47] привело к заключению, что содержащиеся в каталазе четыре феррипорфириновые группы также участвуют в разложении H_2O_2 не автономно, а кооперативно. Молекулярный механизм катализа разложения H_2O_2 гемоцианином также определяется наличием в его структуре пар близко расположенных ионов меди [48], совместно участвующих в окислительно-восстановительных двухэлектронных переходах.

Следует указать, что впервые предположение о совместном действии пары ионов железа в каталазе было высказано в 1932 г. [49], а для заключения о вхождении в состав активного центра каталазы не менее двух ионов железа существенную роль сыграли работы, в которых была показана трансформация каталазной активности в пероксидазную при диссоциации каталазы на четыре субъединицы, содержащие по одному иону железа [50].

В 1967—68 гг. Пурмалем [51, 52] была сформулирована гипотеза об особой роли в окислительно-восстановительном катализе двух и многоядерных комплексов, способных осуществлять механизм молекулярного катализа. В этих работах было также впервые обращено внимание на

многоядерный характер большинства окислительно-восстановительных металлоферментов.

В этой гипотезе принималось, что в случае пары близко расположенных ионов металла, каждый из которых является одноэлектронным окислительно-восстановительным агентом, возможен одновременный перенос пары электронов между субстратом и катализатором, определяющий молекулярный механизм катализа. Двухэлектронное окисление — восстановление соответствует переходу от одного стабильного валентно-насыщенного состояния субстрата к другому. Для подавляющего большинства субстратов такой процесс будет поэтому энергетически более выгодным, чем переход субстрата из стабильной формы в реакционно-способную радикальную форму в результате одноэлектронного переноса. Таким образом, механизм молекулярного катализа может выигрывать конкуренцию с механизмом радикальных превращений, если последний не является цепным с достаточно большими длинами цепей. В случае ионов металлов — характерных двухэлектронных агентов типа таллия, например, для осуществления механизма двухэлектронного переноса при взаимодействии с органическим или неорганическим субстратом нет необходимости в кооперации двух ионов металла. Аналогичная картина в случае уже упоминавшегося комплекса Fe(III) с триэтилентетраминном, механизм катализа которым включает переходы $\text{Fe(II)} \leftrightarrow \text{Fe(IV)}$. По-видимому, подобным же образом, с переходами $\text{Ni(I)} \leftrightarrow \text{Ni(III)}$ осуществляется катализ разложения H_2O_2 комплексами Ni(II) с моноэтаноламином [53, 54]. В случае этого комплекса радикальная составляющая процесса практически отсутствует и не происходит окисления моноэтаноламина. (Эта система получила в дальнейшем применение в лабораторной практике для нерадикального разложения пероксида водорода в присутствии органических соединений.) Кооперация в форме образования дву- или полиядерных комплексов с близким расположением ионов металлов необходима в случае ионов, стабильные состояния окисления которых различаются на единицу. Многоядерность металлоферментов определяет возможность катализа ими окислительно-восстановительных превращений по механизмам, не включающим промежуточного образования свободных радикалов.

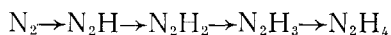
Таким образом исследование фермента и модельных систем с различными структурными и электрохимическими характеристиками привело к представлениям об особой роли двух- и многоядерных комплексов в химическом и биохимическом катализе окислительно-восстановительных превращений. Эти представления получили подтверждение и развитие в дальнейших исследованиях.

Надо отметить, что исследования каталазного процесса составили большой этап в истории развития работ по моделированию ферментов. Другим процессом, моделирование которого имеет большую перспективную практическую значимость, стал процесс фиксации молекулярного азота. И для этого процесса, хотя и на более высоком уровне, повторилась эволюция работ по моделированию каталазы, начинавшихся с изучения очень простых моделей. Долгое время казалось, что способность фиксировать инертный молекулярный азот в мягких условиях характерна лишь для биохимических систем микроорганизмов. Детальный механизм ферментативной фиксации азота до конца не выяснен и сегодня, хотя давно было известно, что в этой ферментной системе важную роль играют переходные металлы — молибден и железо. Этот факт вместе с предположением, что комплексные ионы переходных металлов могут включить молекулу N_2 в координационную сферу, послужили основой для поиска систем, активирующих молекулярный азот.

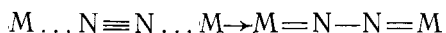
В 1964 г. появилась первая работа Вольпина и Шура [55], осуществивших химическую фиксацию N_2 . Ими было показано, что различные соединения переходных металлов (титана, хрома, молибдена, железа и др.) в присутствии восстановителей (литий-, магний- или алюминий-органических соединений, ароматических анион-радикалов, сильных неорганических восстановителей) способны в апротонных средах эффек-

тивно связывать азот при комнатной температуре. При последующем гидролизе этих промежуточных продуктов образовывался аммиак [56]. В дальнейшем удалось такого рода фиксацию осуществлять и в каталитическом режиме [57, 58]. Под действием восстановителей происходит образование соединений переходных металлов в низковалентных состояниях (Ti(II), V(II), Mo(II)), координирующих N₂. На последующих стадиях восстановления координационно-связанного N₂ образуются продукты восстановления: металлокомплексные производные гидразина и аммиака [59]. Впервые синтезировать металло-азотный комплекс удалось в 1965 г. Аллену и Зенофу из комплекса, включающего как лиганд N₂H₄ [60]. Образование комплексов, включающих N₂ при прямом взаимодействии молекулярного азота с металлокомплексами, впервые было установлено в работах Шилова с соавтор. [61, 62]. Перечисленные работы низвергли представления о невозможности химической фиксации N₂ в мягких условиях и, хотя химическое различие фермента нитрогеназы и металлокомплексных систем, обнаруженных Вольпиным и Шиловым, велико, основа для моделирования нитрогеназы была заложена.

Дальнейшие работы по моделированию фиксации азота проводились с двух сторон: Шиловым с сотр. исследовались простые неорганические и металлоорганические модели [63—65]; Лихтенштейном с сотр. [66—69] проводилось изучение структуры активного центра фермента, разработка некоторых общих подходов к поискам и построению модельных систем на основе информации, получаемой при изучении реального фермента. Повторяется ситуация, описанная выше — моделями сложного белкового соединения служат простые соединения, вплоть до гидроокисей металлов, — соединений столь же простых, как первые модели каталазы Бредига. Однако как и в случае моделирования каталазы, за внешним несходством гидроокисей титана и фермента нитрогеназы скрывается принципиальная общность. Этой общностью является возможность осуществления кооперативного акта многоэлектронного восстановления N₂. Авторами работы [70] был проведен анализ энергетики последовательных переходов в ряду превращений:



Высокая прочность первой разрываемой связи в N₂ определяет то, что в мягких условиях биологической фиксации последовательное одноэлектронное восстановление N₂ не может протекать с заметной скоростью. Энергетические трудности восстановления азота снимаются при четырехэлектронном синхронном восстановлении N₂ до производного гидразина. Разрыв двух связей в молекуле N₂ компенсируется образованием новых связей с металлоцентрами катализатора, т. е. переход



означает определенную перегруппировку электронной плотности внутри металлокомплекса. Обязательным условием возможности такого процесса является участие в нем по крайней мере двух ионов металлов.

Исследование структуры активного центра нитрогеназы привело к заключению о наличии в нем пары близко расположенных низковалентных ионов молибдена [66, 67]. В гидроокиси же, являющейся по условиям приготовления полигидроксокомплексом, имеется достаточно большое число близко расположенных ионов металла.

Таким образом, и нитрогеназа, и простые модели, обнаруженные в этих исследованиях, при всех своих различиях являются полиядерными металлокомплексами. Была найдена система, способная восстанавливать азот гомогенно в протонных водно-спиртовых средах [71]. Условия образования и проявления активности этой системой — комплексом ванадия(II) с пирокатехином, свидетельствуют, что и в этом случае функционирует полигидроксокомплекс, включающий несколько ионов ванадия. Интерпретация механизма действия нитрогеназы с учетом особен-

ностей ее структуры приведена в [66, 67]. Суть ее сводится к следующему.

Поскольку нитрогеназа сопряжена с системой одноэлектронного восстановителя, в частности ферредоксинном, структура активного центра нитрогеназы служит своеобразным приспособлением для «переключения» процесса одноэлектронного механизма восстановления на четырехэлектронный. Механизм действия включает стадии транспорта электронов с поверхностных участков вглубь макромолекулы к железосодержащему кластеру; запасание и хранение железосодержащим кластером электронов, полученных от одноэлектронного восстановителя; четырехэлектронную атаку молекулы азота в нитрогенильном комплексе с участием по крайней мере двух атомов металла (молибдена по всей вероятности).

Открытие возможности фиксации азота простыми модельными соединениями стимулировало исследования в этом направлении. Интенсивное и комплексное развитие получили эти исследования в Англии. Работы английских ученых развивались также по двум направлениям — исследование металлокомплексов (их структуры и связи структурных особенностей с реакционной способностью в отношении фиксации азота) и изучение фермента нитрогеназы в различных аспектах, включая генно-инженерный. Методом моделирования получена информация о характере связей атомов молибдена в активном центре нитрогеназы. Подобие спектров exafs (спектров тонкой структуры края рентгеновского поглощения) нитрогеназы и молибдено-серных комплексов, способных связать и активировать азот, подтверждало предположение о серных мостиках между атомами молибдена в активном центре фермента [72].

Химические исследования были направлены на изучение реакционной способности координационно-связанного азота. Установлено образование комплексов N_2 с различными металлокомплексами Mn , Fe , Co , Ni , Mo , W . Попытка протонирования координационно-связанного N_2 приводила к разрушению комплексов с выделением N_2 . Лишь для комплексов Mo и W с фосфорными лигандами наблюдалась последующая реакция координированного N_2 с образованием $\text{M}=\text{N}-\text{NH}_2$ [73, 74]. При дальнейшем протонировании наблюдалось образование двух молей NH_3 [74]. Установить промежуточные формы на пути перехода от гидразокомплекса к NH_3 не удалось [75], т. е. было получено независимое подтверждение представления о многоэлектронном процессе восстановления. Эти результаты инициировали интерес к изучению механизма электрохимического восстановления комплексов азота с ионами металлов, связанных тем или иным способом с поверхностью электрода [76].

Исключительно интересные результаты были в последнее время получены в этом направлении. Комплексы молибдена с фосфолипидами, адсорбированные на амальгаме ртути, оказались столь эффективными восстановителями азота, что удалось наблюдать процесс при комнатной температуре и атмосферном давлении азота [77]. В этой модельной системе нашли отражение приведенные выше основные характеристики механизма действия нитрогеназы.

Комплекс работ по изучению фермента нитрогеназы и модельных систем привел к формированию представлений и принципов, имеющих общий характер и существенных для теории подбора и построения моделей многоядерных металло-ферментов окислительно-восстановительного действия. Была выдвинута концепция многоэлектронных переносов, происходящих со значительными изменениями ядерных конфигураций [78]. Лихтенштейном предложен принцип «оптимального движения» [79]. Суть его в том, что протеканию синхронного процесса, сопровождающегося значительными ядерными перестройками, благоприятствует энергетический фактор, но если элементарный акт включает многие ядра, то скорость реакции может стать исчезающе малой даже для существенно экзотермических реакций. Иными словами число участвующих в реакции атомов должно быть достаточно велико, чтобы обеспечить благоприятную энергетику, но достаточно мало, чтобы сохранить

высокое значение вероятности синхронизации движения ядер по координате реакции.

Разработаны теоретические способы оценки вероятности синхронизации в процессах с участием многих ядер [80].

V. МОДЕЛИ ОКСИДАЗ, ОКСИГЕНАЗ И ДРУГИХ ФЕРМЕНТОВ

Важный комплекс ферментов, участвующих в процессах терминального окисления, составляют оксигеназы и оксидазы, катализирующие реакции молекулярного кислорода с различными органическими субстратами.

В 1954 г. Уденфриндом [81] была предложена гидроксилирующая система, приводящая к тем же продуктам гидроксирования, что и некоторые монооксигеназы. Модельная система Уденфринда включает ионы железа, этилендиаминтетраацетат в качестве лиганда и аскорбиновую кислоту, либо ее аналог, в качестве донора электрона. Идентификация химически реакционноспособных частиц, приводящих к продуктам реакции в этой многокомпонентной системе, долгое время была затруднена. Развитие кинетических методов исследования позволило показать, что такими частицами в системе Уденфринда являются металл-кислородные комплексы, обладающие специфической реакционной способностью [82].

Таким образом, на примере этой системы удалось выделить собственно элементарный акт каталитического действия в процессе активации кислорода, что может рассматриваться как новый этап в моделировании ферментов — установления элементарного механизма протекания химических актов в активном центре фермента и их воспроизведения в более простых системах.

Насколько общий характер имеют элементарные окислительно-восстановительные превращения металлокомплексных ионов видно из сопоставления каталитической функции ионов меди в различном лигандном окружении в процессе окисления аскорбиновой кислоты кислородом воздуха. В работах [83, 84] установлено, что реакционноспособной промежуточной частицей является кислородный комплекс CuO_2^+ , взаимодействующий с субстратом по двухэлектронному механизму; аналогичный результат получен и для окисления метанола [85]. Такой элементарный акт моделирует действие ряда так называемых бесцветных оксидаз, содержащих в активном центре ион Cu(I) . В определенных условиях наблюдается кооперация двух ионов меди в элементарном акте двухэлектронного окисления аскорбат-аниона [86], либо в элементарном акте двухэлектронного восстановления кислорода [87]. Эти реакции моделируют нерадикальные кооперативные процессы, реализующиеся в случае ферментов (так называемых голубых оксидаз), содержащих в активном центре два и более сближенных ионов меди.

Результаты кинетических исследований относительно простых каталитических систем окисления аскорбиновой кислоты кислородом [88] показали, что сущность элементарного акта для модельных и ферментативных систем однотипна.

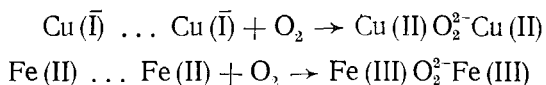
Спецификой ферментативной системы является, по-видимому, пространственная структура ближайшего окружения иона металла, ограничивающая возможности протекания побочных реакций.

Ряд исследований посвящен моделям пероксидазы. Мы не рассматриваем их, поскольку лишь детальное кинетическое исследование позволяет отличить «пероксидазоподобный» механизм образования комплекса с H_2O_2 и последующей его реакции с субстратом от механизма с участием радикалов $\dot{\text{N}}\text{O}_2$ и $\text{OH}\cdot$, характерного для большинства металлокомплексных систем.

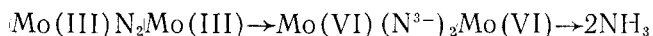
Большой цикл сравнительного исследования спектроскопических, термодинамических, электрохимических и каталитических свойств различных металлокомплексов и металлоферментов, включающих тот же ион металла, был проведен Вильямсом [89—91], который пришел к выво-

дам, существенным для поиска синтеза активных моделей, а также для понимания специфических свойств металлоферментов. Так, было показано, что карбангидразной активностью обладают комплексные соединения цинка с тетраэдрическим, но не октаэдрическим координационным окружением. Изучение модельных систем позволило предложить структуру активного центра фермента карбангидразы, где ион цинка находится в виде комплекса с деформированным тетраэдрическим строением, двумя лигандами в котором являются сульфгидрильные группы белка. Сравнение спектральных и термодинамических свойств комплексов цинка с фенантролином и комплекса, образующегося в результате присоединения фенантролина к атому Zn активного центра алкогольдегидрогеназы, позволило установить наличие двух или трех вакантных для замещения субстратом мест в координационной сфере цинка. Автором [89] впервые была высказана нашедшая в дальнейшем подтверждение гипотеза, что специфичность реакций любых металлоферментов с малыми молекулами (O_2 , CO_2 , H_2O , H_2O_2 , N_2) определяется почти полностью замещенной координационной сферой металла-комплексобразователя.

Анализируя спектроскопические и магнитные свойства металлокомплексов и металлосодержащих переносчиков кислорода гемоглобина и гемэритрина, автор [91] предложил общую схему их действия:



Вильямс подчеркнул труднореализуемую в случае модельных систем особенность функционирования этих переносчиков кислорода: в отсутствие кислорода восстановленные ионы металлов расположены в структуре белка достаточно далеко друг от друга, чтобы не влиять на их магнитные, оптические и реакционные свойства. Связывание кислорода происходит в результате сближения пары ионов металла, сопровождающегося изменением конформации, «напряжением» белковой части переносчика. Подобные же представления были им предложены для механизма фиксации азота. Вхождение молибдена во все азотфиксирующие системы автор объяснил тем, что лишь для двух ионов молибдена(III) можно представить протекание процесса:



Трудность моделирования такой системы связана с тем, что два сближенных атома Mo(III) не должны образовывать друг с другом прочной связи Mo—Mo, сохраняя при этом в координационной сфере вакантное место для образования комплекса с N_2 .

Следует кратко отметить, что параллельно с развитием работ по моделированию металлоферментов довольно интенсивно развивались исследования органических катализаторов, моделирующих действие тех или иных не содержащих ионов металлов ферментов. Обширная информация по этим вопросам приведена в [92, 93].

VI. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ, КАК ПУТЬ К НОВЫМ КАТАЛИЗАТОРАМ

Второе из названных выше направлений (синтез катализаторов на основе уже имеющейся информации о структуре и свойствах ферментов и принципах ферментативного катализа) в начале 60-х гг. успешно и последовательно начал развиваться в СССР Хидекель [94—102].

Исходная общая посылка не вызвала сомнений — особенности действия коферментов и ферментов можно, в принципе, объяснить, исходя из основных представлений органической, координационной и полимерной химии. Однако «белые пятна» в информации относительно систем биологического происхождения предъявляли высокие требования к интуиции исследователей, выбравших этот путь.

В качестве аналогов медьсодержащих фенолоксидаз на начальном

этапе этих работ изучены простейшие системы — комплексы ионов меди с различными аминами [94, 95]. С помощью этих катализаторов удалось широко изменять направление реакций в результате образования комплексов промежуточных соединений или исходных веществ с катализатором и изменений состава катализатора. Эти результаты оказались полезными для проведения процессов окисления различных фенолов. Удалось разработать удобные методы синтеза ряда хиноидных соединений, нафтолов и спироциклических тримеров [96, 97].

Существенным для развития работ этого направления явился ретроспективный анализ эволюционной картины биогенеза ферментов для выбора пути синтеза их аналогов различной степени сложности и организации [98, 99].

Были проведены исследования ряда соединений дигидропиридина — аналогов коферментов никотинамидадениндинуклеотида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата. На основе этих исследований были получены новые высокоактивные системы восстановления и катализаторы гидрирования олефинов, существенно превосходящие известные катализаторы жидкофазного гидрирования.

Удалось создать новые типы гомогенных и «гетерогенизированных» комплексных катализаторов гидрирования — аналогов фермента гидрогеназы. Были получены катализаторы на основе систем: 1,4-дигидроникотинамид — производное переходного металла, низковалентные комплексы переходных металлов с хинонами и ароматическими соединениями, ароматическими карбоновыми кислотами, аминокислотами и пептидами, красителями различных типов, оксихинонами, ароматическими оксиазосоединениями. Некоторые из этих катализаторов оказались пригодными для проведения ряда процессов тонкого и основного органического синтеза [100]. Цикл работ посвящен переносу активированного водорода методами, предположительно сходными с ферментативными [101]. Используя эти методы, оказалось возможным с высокой скоростью гидрировать кетоны, альдегиды и ароматические соединения, осуществить ряд процессов селективного гидрирования (в частности восстановление карбонильной группы в присутствии двойной связи $C=C$) [102]. Были созданы также системы, включающие катализатор, активирующий молекулярный водород, и катализатор переноса активированного водорода [101].

Каталитические системы указанного типа позволяют с высокой скоростью и специфичностью восстанавливать большое число органических и комплексных соединений.

Особую ценность имели результаты по каталитическому гидрированию ароматических и нитроароматических соединений. Некоторые из разработанных новых каталитических систем внедрены в промышленную практику [103—106].

Обширная информация по системам гомогенного гидрирования комплексами металлов всех групп Периодической системы элементов Д. И. Менделеева приводится в [107]. Среди описанных и тех катализаторы, при создании которых различные природные гидрогеназы послужили мобилизующим объектом.

Новый интересный тип моделирования различных ферментов начался с развитием синтетической химии полимеров, содержащих различные функциональные группы — карбокси-, amino- и др., обладающих растворимостью в полярных растворителях.

Исследования каталитических свойств таких полимеров и их комплексов с ионами металлов в СССР получило развитие в работах Кабанова, Пежежского, Кирша [108—113]. Активность систем на основе полиакриловой кислоты, полиэтиленimina, поливинилпиридина и др. в отношении каталазной, пероксидазной, аскорбиноксидазной, пирокатахазной, протеолитической функций в 10^3 — 10^4 раз превышала активность низкомолекулярных аналогов, уступая в 10^2 — 10^3 раз активности моделируемых ферментов.

VII. О РОЛИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ЧАСТИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ И БЕЛКА В ФЕРМЕНТАХ

Изучение простейших модельных систем показало, что их каталитические свойства «улучшаются» при соединении низкомолекулярной активной группы с высокомолекулярной. Стабильность систем типа «активная группа — носитель» возрастает, а каталитическая активность, как правило, увеличивается.

Моделирование ферментов независимым путем привело к заключению, что их высокая каталитическая активность связана с белковой, высокомолекулярной природой этих систем. В меньшей мере изучение модельных систем выявило роль белка, как фактора, определяющего селективность действия ферментов. Тем не менее эта функция белковой части молекулы фермента сначала умозрительно, в модели «ключ — замок», а затем и экспериментально была установлена. Широкое признание получил принцип индуцированного соответствия Кошланда [114, 115]. Стало понятным, что селективность действия ферментов связана с высоким стерическим соответствием субстрата и активного центра в структуре фермента. Фактором, определяющим такое соответствие, является высокая структурная организация фермента — вплоть до четвертичной. Отсутствие подобной организации у модельных систем достаточно для понимания того, что создание простой модели с высокой специфичностью действия в отношении многоатомных субстратов — задача малоперспективная.

Выбор активности, как главного свойства моделей, послужил психологически понятной причиной проведения расчетов, авторы которых старались показать, что активность их моделей сопоставима или даже превышает активность ферментов. В таких расчетах активность относят, например, к весовой единице катализатора; проводят экстраполяцию рН-зависимой активности модели на область рН-функционирования фермента и т. п. Если же отвлечься от расчетных результатов, можно констатировать, что не удалось создать модель, равную по активности ферменту, при равных их молярных концентрациях и близких рН, температуре и концентрации субстратов.

Впервые идея о возможной роли белка, как фактора, определяющего высокую активность ферментов, была высказана Бауэром в 1935 г. [116]. Он предположил, что белок может находиться в равновесном и в неравновесном состояниях; во время ферментативной реакции белок переходит из неравновесного в равновесное состояние, а энергия этого перехода используется на преодоление активационного барьера превращения субстрата. Энергия, выделяющаяся в результате ферментативной реакции, возвращает молекулу белка в исходное неравновесное состояние. В гипотезе Бауэра нашел отражение общий принцип возможности использования энергии химической реакции для ускорения реакции, появившейся в период создания Семеновым теории разветвленных цепных реакций.

Проблему связи между каталитической активностью низкомолекулярного соединения и свойствами присоединенного к нему высокомолекулярного вещества с тех же позиций рассмотрел Кобозев [117, 118]. Его идея заключалась в предположении, что термодинамически неравновесная масса должна повышать каталитическую активность связанных с ней частиц в отношении различных реакций. Им было показано, что в ряде случаев наблюдается логарифмическая зависимость между активностью и величиной присоединенной неравновесной массы. Рассмотрен и конкретный вопрос о повышении каталитической активности частицы в результате присоединения ее к белку [119, 120]. Роль макромолекулы белка в том, что с ее участием происходит рекуперация энергии: энергия, выделяющаяся в ходе реакции, не рассеивается в форме тепловой, а используется для активации каталитического центра.

Конкретизации вопроса о возможных формах аккумуляции энергии белковой молекулой посвящены работы [121, 122]. Анализ различных

подходов к выяснению роли белка в ферментах проведен Блюменфельдом [123]. К этому обзору можно добавить лишь гипотезу энтактического (растянутого, напряженного) состояния активного центра фермента, высказанную на основе анализа ряда модельных и ферментных систем [91]. Согласно этой гипотезе, малый активационный барьер ферментативной реакции определяется тем, что еще до соединения фермента с субстратом в активном центре фермента имелась функциональная группа с высокой потенциальной энергией. Повышенная энергия в области активного центра возникает за счет конформационной энергии всей белковой молекулы. Так, атом цинка в составе карбоксипептидазы или карбангидразы намного более реакционноспособен, чем в обычной ионной форме или в комплексе со свободными низкомолекулярными лигандами. Находясь в составе активного центра, атом цинка лишь частично связан с лигандами белка, образующими напряженную конфигурацию деформированного тетраэдра. Возможность таких образований — специфическая особенность макромолекулярного полилиганда — белка, характеризующегося наличием вторичной и третичной структуры.

Конформационные превращения белка, согласно Блюменфельду, неразрывно связаны с элементарным актом ферментативного превращения: элементарный акт ферментативной реакции заключается в конформационном изменении макромолекулы (фермент-субстратного комплекса) и скорость превращения субстрат — продукт определяется скоростью этого конформационного изменения [123, с. 155]. В отличие от приведенных выше воззрений в концепции Блюменфельда белковая молекула, включающая активный центр, до начала взаимодействия с субстратом находится в конформационно-равновесном состоянии. Конформационно-неравновесной в зоне активного центра белковая молекула становится лишь для соединения фермент — субстрат. Переход из конформационно-неравновесного состояния в равновесное связан с большими или меньшими изменениями структурной организации белка — динамикой конформационных изменений. Одной из наиболее разработанных динамических моделей является модель функционирования фермента аспаратаминотрансферазы [124].

Не углубляясь в актуальные вопросы современной теоретической энзимологии, можно, видимо, говорить о связи высокой каталитической активности ферментов со структурно-динамическими характеристиками белка. Таким образом, не только селективность действия, но и каталитическая активность ферментов связана с тем, что белок — макромолекула со структурной организацией, изменения которой такая же часть ферментативного акта, как и перераспределение химических связей в субстратных частицах.

* *
*

Каковы же перспективы создания модельных катализаторов, близких по активности и селективности к ферментативным? Решение этой задачи — построения, по сути дела, не моделей, а синтетических аналогов ферментов, связано с созданием и использованием полимеров, обладающих подобно белку гибкой структурной организацией. Конечно, этот путь не единственный. Возможно, успех ожидает на пути комбинации такого рода полимеров, связанных с активными группами, с системами молекулярных сит типа цеолитов. Возможно, будет найдено и не прогнозируемое решение. Это не означает, что изучение низкомолекулярных моделей ферментов теряет перспективность. Их исследование послужит формированию новых гипотез и концепций, полезных для решения практических задач.

Не следует, однако, и преувеличивать роль работ по моделированию ферментов, как способа исследования последних. В этом плане метод моделирования является просто одним из направлений общего фронта исследований, включающего изучение последовательности аминокислотных остатков в ферментах, рентгеноструктурный анализ белков, установление природы коферментов, изучение кинетики и механизма фер-

ментативных превращений, идентификации промежуточных соединений, исследование конформационных состояний белка-фермента и динамики изменения этих состояний и т. д.

Выделяет же это направление исследований уже имеющиеся и перспективные практические результаты, связанные с синтезом высокоактивных катализаторов небелковой природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лангенбек В. Органические катализаторы и их отношение к ферментам. М.: Изд-во иностр. лит., 1961.
2. Frankenburger W. Katalytische Umsetzungen. Leipzig: Akad. Verl. M. B. H., 1937.
3. Шааб Г. М. Катализ с точки зрения химической кинетики. Л.: ОНТИ-Госхимтехиздат, 1934.
4. Mittasch A., Theis F. Ver. Chem., 1932, S. 278.
5. Müller E. Ztschr. Electrochem. und angew. phys. Chem., 1923, B. 29, S. 345.
6. Müller E. Ztschr. phys. Chem., 1923, B. 107, S. 347.
7. Bredig G., Sommer F. Ibid., 1909, B. 70, S. 34.
8. Hennichs S. Chem. Ber., 1926, B. 59, S. 218.
9. Antropoff A. Ztschr. phys. Chem., 1908, B. 62, S. 513.
10. Lettermoser A., Eichler W. Z. Elektrochem. und angew. phys. Chem., 1929, B. 35, S. 610.
11. Wiegel E. Ztschr. phys. Chem., 1929, B. 143, S. 81.
12. Hückel W. Katalyse mit kolloiden Metallen. Leipzig: Akad. Verlag. M. B. H., 1927, 86 S.
13. Paal C., Amberger C. Chem. Ber., 1904, B. 37, S. 124.
14. Skita A., Meger W. Ibid., 1912, B. 45, S. 3579.
15. Kuhn R., Brann L. Ibid., 1926, B. 59, S. 2370.
16. Николаев Л. А. Биокатализаторы и их модели. М.: Высш. школа, 1968. 196 с.
17. Warburg O. Biochem. Ztschr., 1920, B. 119, S. 134.
18. Шилов Е. А. Докл. АН СССР, 1938, т. 18, с. 643.
19. Шилов Е. А., Ясников А. А. Укр. хим. ж., 1961, т. 27, с. 639.
20. Swain C., Brown I. J. Amer. Chem. Soc., 1952, v. 74, p. 2538.
21. Кобозев Н. И., Николаев Л. А. Ж. физ. химии, 1945, т. 19, с. 323.
22. Николаев Л. А. В кн.: Возникновение жизни на Земле. М.: Изд-во АН СССР, 1957, с. 156.
23. Николаев Л. А. Успехи химии, 1961, т. 30, с. 3.
24. Мартелл А., Густавсон Р., Чеберик С. В кн.: Катализ. Тр. I Международ. конгресса. М.: Изд-во иностр. лит., 1960, с. 364.
25. Wang J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1955, v. 66, p. 4715.
26. Wang J. H., Jarnagin R. C. Ibid., 1958, v. 80, p. 786.
27. Воробьева Т. П., Исак В. Г., Пурмаль А. П., Сычев А. Я. Ж. физ. химии, 1974, т. 48, с. 1439.
28. Лунина М. А., Шарай Т. А. Там же, 1962, т. 36, с. 1570.
29. Martel A. E., Calvin M. Chemistry of the Metal Chelate Compounds. N. Y.: Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959.
30. Langenbeck W. Chem. Ber., 1927, B. 60, S. 930.
31. Браунштейн А. Е., Шемякин М. М. Биохимия, 1953, т. 18, с. 393.
32. Metzler D. E., Snell E. E. J. Biol. Chem., 1952, v. 198, p. 353.
33. Metzler D. E., Longenecker J., Snell E. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 7, p. 639.
34. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E. Ibid., 1954, v. 76, p. 648.
35. Смит Э. Л., Киммель Д. Р., Лайт А. В кн.: Молекулярные основы действия и торможения ферментов. V Международн. биохим. конгресс. М.: Изд-во АН СССР, 1961, с. 9.
36. Frater R., Light A., Smith E. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, p. 253.
37. Пурмаль А. П. Дис. на соискание уч. ст. доктора хим. наук. М.: Ин-т хим. физики АН СССР, 1971.
38. Сычев А. Я. Окислительно-восстановительный катализ комплексами металлов. 1976, Кишинев: Изд-во Штиинца, с. 191.
39. Бердников В. М., Козлов Ю. Н., Пурмаль А. П. Химия высоких энергий, 1969, т. 3, с. 321.
40. Шабарчина Л. И., Бердников В. М., Пурмаль А. П. Ж. физ. химии, 1970, т. 44, с. 265.
41. Бердников В. М., Козлов Ю. Н., Пурмаль А. П. Химия высоких энергий, 1969, т. 3, с. 370.
42. Воробьева Т. П., Бердников В. М., Пурмаль А. П. Кинетика и катализ, 1970, т. 11, с. 100.
43. Козлов Ю. Н., Надеждин А. Д., Пурмаль А. П. Там же, 1973, т. 14, с. 141.
44. Воробьева Т. П., Козлов Ю. Н., Пурмаль А. П. Ж. физ. химии, 1974, т. 48, с. 1444.
45. Воробьева Т. П., Пурмаль А. П. Там же, 1982, т. 56, с. 1148.
46. Качанова Ж. П., Кудрявцева Е. Л., Пурмаль А. П. Там же, 1974, т. 48, с. 1449.
47. Азизов Ю. М., Лихтенштейн Г. И., Пурмаль А. П. Биохимия, 1972, т. 37, с. 620.
48. Felsenfeld Y., Printz M. P. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, p. 6259.
49. Stern K. S. Ztschr. Physiol. Chem., 1932, B. 209, S. 176.

50. Samejima T., Shibata K. Arch. Biochem. and Biophys., 1961, v. 93, p. 407.
51. Пурмаль А. П. В кн.: Механизм дыхания, фотосинтеза и фиксации азота. М.: Наука, 1967, с. 179.
52. Качанова Ж. П., Азизов Ю. М., Пурмаль А. П. В кн.: Проблемы кинетики и катализа, VIII. Комплексообразование в катализе. М.: Наука, 1968, с. 121.
53. Арзамаскова Л. Н., Пурмаль А. П. Ж. физ. химии, 1964, т. 38, с. 1321.
54. Арзамаскова Л. Н., Пурмаль А. П. Там же, 1970, т. 44, с. 1829.
55. Вольпин М. Е., Шур В. Б. Докл. АН СССР, 1964, т. 156, с. 1102.
56. Вольпин М. Е., Шур В. Б. ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 1967, т. 12, с. 31.
57. Вольпин М. Е., Платовская М. А., Косякова Л. В., Шур В. Б. Докл. АН СССР, 1968, т. 180, с. 103.
58. Volpin M. E., Shur V. B. Organometallic Reactions. N. Y.: Wiley, 1970, v. 1, p. 55.
59. Вольпин М. Е. ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 1972, т. 17, с. 396.
60. Allen A. D., Zenoff C. V. Chem. Commun., 1965, v. 2, p. 121.
61. Бородько Ю. Г., Шилова А. К., Шилов А. Е. Докл. АН СССР, 1967, т. 176, с. 1297.
62. Бородько Ю. Г., Шилова А. К., Шилов А. Е. Ж. физ. химии, 1970, т. 44, с. 627.
63. Шилов А. Е., Шилова А. К. Там же, 1970, т. 44, с. 288.
64. Хрущ А. П., Шилов А. Е. Кинетика и катализ, 1970, т. 11, с. 86.
65. Денисов Н. Т., Рудштейн Э. И., Шувалова Н. И. Докл. АН СССР, 1972, т. 202, с. 623.
66. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.
67. Лихтенштейн Г. И., Гвоздев Р. И., Левченко Л. А., Сырцова Л. А. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1978, т. 2, с. 165.
68. Куликов А. В., Лихтенштейн Г. И. Биофизика, 1974, т. 19, с. 420.
69. Лихтенштейн Г. И. Успехи биол. химии, 1971, т. 12, с. 3.
70. Лихтенштейн Г. И., Шилов А. Е. Ж. физ. химии, 1970, т. 44, с. 849.
71. Никонова Л. А., Овчаренко А. Г., Ефимов О. Н., Авиллов В. А., Шилов А. Е. Кинетика и катализ, 1972, т. 13, с. 1602.
72. Kramer S. P., Hodgson K. O., Gillum W. O., Mortenson L. E. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 3398.
73. Leigh G. J., Pickett C. J. J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1977, v. 18, p. 1797.
74. Chatt J., Pearson A. J., Richards R. L. Ibid., 1977, v. 19, p. 1852.
75. Bishop M. W., Chatt J., Dilworth J. R. J. Less Common Metals, 1977, v. 54, p. 487.
76. Leigh G. J., Pickett C. J. J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1977, v. 18, p. 1797.
77. Диденко Л. И., Шилова А. К., Шилов А. Е. Докл. АН СССР, 1980, т. 254, с. 643.
78. Семенов Н. Н., Шилов А. Е., Лихтенштейн Г. И. Там же, 1975, т. 226, с. 1374.
79. Лихтенштейн Г. И. Кинетика и катализ, 1977, т. 18, с. 878.
80. Александров И. В. Теорет. и эксперим. химия, 1976, т. 12, с. 299.
81. Udenfriend S., Clark C. T., Axelrod S., Brodie B. B. J. Biol. Chem., 1954, v. 208, p. 731.
82. Пурмаль А. П., Скурлатов Ю. И., Травин С. О. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1980, с. 492.
83. Штамм Е. В., Пурмаль А. П., Скурлатов Ю. И. Ж. физ. химии, 1974, т. 48, с. 2229.
84. Shtamm E. V., Pural A. P., Scurlatov Y. I. Intern. J. Chem. Kinet., 1979, v. 11, p. 461.
85. Травин С. О., Скурлатов Ю. И., Горбунова Н. В., Пурмаль А. П. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1979, с. 1480.
86. Штамм Е. В., Пурмаль А. П., Скурлатов Ю. И. Ж. физ. химии, 1974, т. 4, с. 2229.
87. Gorbulova N. V., Pural A. P., Scurlatov Yu. I., Kabanov V. A. Intern. J. Chem. Kinet., 1977, v. 9, p. 983.
88. Scurlatov Yu. I., Kopper V. Y., Travin S. O. Europ. Polymer J., 1979, v. 15, p. 811.
89. Вильямс Р. Дж. П. В кн.: Молекулярные основы действия и торможения ферментов. М.: Изд-во АН СССР, 1962, с. 160.
90. Williams R. J. P. Les Metaux de la vie «La Recherche», 1973, p. 529.
91. Williams R. J. P. Inorganica Chimica Acta (Rev.), 1971, v. 5, p. 137.
92. Вестгеймер Ф. Г. В кн.: Молекулярные основы действия и торможения ферментов. М.: Изд-во АН СССР, 1962, с. 9.
93. Ясников А. А. Органические катализаторы, коферменты и ферменты. Киев: Наукова думка, 1982. 272 с.
94. Горбунова Л. В., Хидекель М. Л., Разуваев Г. А. Докл. АН СССР, 1962, т. 147, с. 368.
95. Горбунова Л. В., Ефимов О. Н., Карпов В. В., Хидекель М. Л. В кн.: Механизм и кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1964, с. 227.
96. Карпов В. В., Хидекель М. Л. Ж. орган. химии, 1968, т. 4, с. 861.
97. Карпов В. В., Хидекель М. Л. Там же, 1967, т. 3, с. 1669.
98. Хидекель М. Л. В кн.: Научные основы подбора катализаторов. М.: Наука, 1966, с. 207.
99. Хидекель М. Л. В кн.: Комплексообразование в катализе. Проблемы кинетики и катализа, вып. 13, М.: Наука, 1968, с. 126.
100. Cheraikin E. G., Knidekel N. L. J. Mol. Catal., 1978, v. 4, p. 103.
101. Иванова Р. Б., Хидекель М. Л. Ж. орган. химии, 1969, т. 39, с. 2393.
102. Абалеева В. В., Астахова А. С., Бахансва Э. И., Хидекель М. Л. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1969, с. 89.
103. Пат. Великобритании 1453966 (1973).
104. Авт. свид. Болгарии 29186 (1980); Бюл. изобр. Болгарии, 1980, № 10.

105. Пат. Швейцарии 586651 (1973).
106. Куш С. Д., Ключев М. В., Изакович Э. Н., Хидекель М. Л., Дюмаев К. М., Роговин В. М., Алексеев В. Н. Авт. свид. СССР 767089 (1980); Бюл. 1980, № 36, с. 116.
107. Джеймс Б. Гомогенное гидрирование. М.: Мир, 1976. 570 с.
108. *Psthezetskii V. S., Lukjanova A. P., Kabanov V. A.* J. Molec. Catalysis, 1977, v. 2, p. 49.
109. Пшежецкий В. С., Ярославов А. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 1117.
110. Пшежецкий В. С., Кузнецова Т. А., Кабанов В. А. Там же, 1975, т. 1, с. 1215.
111. *Psthezetskii V. S., Murtazaeva G. A., Kabanov V. A.* Europ. Polym. J., 1974, v. 10, p. 571.
112. Венгерева Н. А., Кириш Ю. Э., Кабанов В. А. Высокомолек. соед., 1971, т. 13А, с. 2509.
113. Рахнянская А. А., Кириш Ю. Э., Кабанов В. А. Там же, 1977, т. 19А, с. 1770.
114. Koshland D. E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1958, v. 44, p. 98.
115. Koshland D. E. J. Theor. Biol., 1962, v. 2, p. 75.
116. Бауэр С. Теоретическая биология. М.: Изд-во ВИЭМ, 1935. 180 с.
117. Кобозев Н. И. Ж. физ. химии, 1945, т. 19, с. 1413.
118. Кобозев Н. И., Николаев Л. А., Зубович И. А., Гольдфельд Ю. М. Ж. физ. химии, 1945, т. 19, с. 48.
119. Кобозев Н. И. Уч. зап. Моск. гос. ун-та, 1955, т. 174, с. 125.
120. Кобозев Н. И. Ж. физ. химии, 1960, т. 34, с. 1443.
121. Хургин Ю. И., Чернавский Д. С., Шноль С. Э. Молек. биол., 1967, т. 1, с. 419.
122. Шноль С. Э. В сб.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М.: Наука, 1967, с. 22.
123. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики (физика жизненных процессов). М.: Наука, 1974. 335 с.
124. *Ivanov V. I., Karpeisky M. J.* Adv. Enzymol., 1969, v. 32, p. 21.

Институт химической физики АН СССР,
Москва