

ферментативных реакций [22, 23], и с другой стороны, КИЭ могут служить мощным средством изучения ряда важнейших вопросов энзимологии [5, 11—14].

Не ставя целью подробное рассмотрение негативного аспекта КИЭ, отметим, например, что различие скоростей ферментативных превращений меченых и немеченых субстратов может являться причиной ошибок при радиометрических измерениях каталитической активности ферментов, при изотопных определениях скоростей отдельных стадий процесса, при установлении кинетических порядков превращения субстратов. Неучет КИЭ в исследованиях метаболизма и фармакокинетики с помощью меченых препаратов может также приводить к серьезным ошибкам. Эти и некоторые другие осложнения, связанные с КИЭ, становятся особенно существенными для полиферментативных процессов, а также при использовании субстратов с высокой степенью изотопного замещения (кратномеченных соединений). Всестороннее изучение КИЭ позволяет не только предвидеть возможность таких ошибок, но и избежать их, подбирая условия использования меченых соединений, при которых КИЭ будут минимальны или исключены полностью.

Если говорить о позитивной стороне КИЭ, то прежде всего нужно отметить то огромное значение, которое они имеют в исследованиях механизма энзиматических реакций и строения субстрат-ферментных комплексов. Одной из перспективных областей является также использование КИЭ для обогащения тяжелыми изотопами меченых соединений.

II. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ВЕЛИЧИНЫ КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ

Для количественной характеристики кинетических различий в реакциях меченых и немеченых соединений принято использовать отношения констант скоростей для соответствующих пар изотопных молекул. Поскольку величина этих различий определяется в первую очередь относительным различием масс изотопов, то максимальные КИЭ следует ожидать для соединений, меченых изотопами водорода, для которых, как известно, отношение масс максимально ($^1\text{H} : ^2\text{H} : ^3\text{H} = 1 : 2 : 3$).

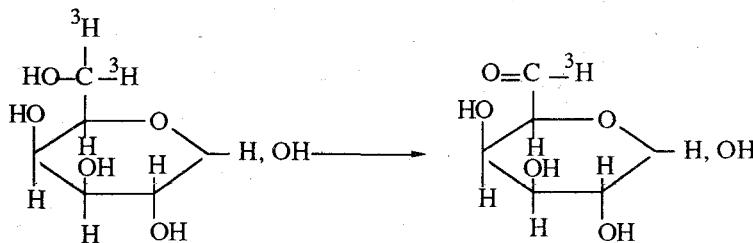
В основе теоретических расчетов КИЭ находится кинетическая теория переходного состояния или теория абсолютных скоростей процессов [24]. Не останавливаясь на деталях выводов, которые достаточно полно изложены в известной монографии Меландера и Сондерса [3], приведем основные прогнозы этих авторов применительно к величинам КИЭ для реакций с участием соединений, меченых изотопами водорода.

Наиболее простые расчеты КИЭ, в которых допускается отсутствие различий энергий нулевых колебаний связей С-Н, С-Д и С-Т в переходных комплексах, дают величины $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 6,9$ и $k_{\text{H}}/k_{\text{T}} = 16$. В расчетах, допускающих исчезновение частот деформационных колебаний в переходном состоянии, получены следующие предельные значения изотопных эффектов: для $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ от 15 до 20 и для $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ от 50 до 75. Однако имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ослабление деформационных мод если и происходит, то в очень малой степени, и значительное превышение наблюдаемых иногда на практике КИЭ над вышеуказанными величинами полуклассических расчетов (для дейтерия 6,9 и для трития 16) следует приписывать скорее квантовомеханическому туннелированию. Меландер и Сондерс считают [3], что изотопные эффекты $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ниже 12 и $k_{\text{H}}/k_{\text{T}}$ ниже 36 могут содержать определенный вклад туннелирования, а более высокие значения КИЭ вообще нельзя объяснить без привлечения туннельного эффекта.

Для многих химических и ферментативных реакций величины экспериментально измеренных протий-дейтериевых и протий-тритиевых КИЭ близки к предсказываемым полуклассическим расчетами. В литературе имеются многочисленные примеры существенного замедления (иногда в десятки раз) самых разнообразных химических (см., например, [25]) и энзиматических [26, 27, 34—42] реакций с участием дейтерированных и тритиевых субстратов.

В качестве примера таких высоких КИЭ можно привести результаты кинетических

исследований реакции окисления меченной тритием галактозы под действием галакто-зооксидазы [27]



Установлено, что галактоза, дважды меченная тритием в положении [6], окисляется со скоростью почти в 150 раз меньше скорости окисления обычной галактозы. Столь высокий КИЭ обусловлен как различием изотопного состава связи, претерпевающей химическое изменение, так и различием изотопного состава соседней связи.

Между протий-дейтериевыми и протий-тритиевыми КИЭ существует достаточно обоснованная теоретическая и экспериментально подтвержденная связь, впервые установленная Свейном и соавт. [28] в виде уравнений

$$\frac{\ln (k_H/k_T)}{\ln (k_H/k_D)} = 1,44$$

или

$$\frac{k_H}{k_T} = \left(\frac{k_H}{k_D} \right)^{1,44}$$

Эти зависимости широко применяют для прогнозирования КИЭ в реакциях субстратов, меченых одним из тяжелых изотопов водорода, если экспериментально установлен КИЭ для другого изотопа.

Эти же зависимости можно использовать для подтверждения достоверности полученных в эксперименте результатов. Так, например, в литературе опубликованы сильно различающиеся результаты спектрофотометрических измерений КИЭ в реакции ферментативного окисления D-(1-²H)глюкозы: в работе [29] протий-дейтериевый КИЭ оценивается в 10—15, а в [30] — 2,2—2,5. В радиометрических измерениях протий-тритиевого КИЭ в аналогичной реакции окисления D-(1-³H)глюкозы найдена величина $k_H/k_T = 3,0—3,1$ [31]. При использовании последней для расчета по выше-приведенным уравнениям ожидаемого протий-дейтериевого эффекта получен КИЭ-2,2, что подтверждает достоверность значения, найденного в работе [30].

III. КЛАССИФИКАЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Для КИЭ в ферментативных реакциях можно использовать классификацию, принятую для химических процессов [3]. Так же как и в химических реакциях, КИЭ можно разделить на первичные и вторичные, внутримолекулярные и межмолекулярные. Первичные изотопные эффекты обусловлены различием изотопного состава разрывающейся связи при одинаковом изотопном составе соседней связи. Вторичные изотопные эффекты обусловлены различием изотопного состава соседней связи при одинаковом изотопном составе разрывающейся связи. Совмещенный изотопный эффект обусловлен одновременным различием разрывающейся и соседней связи. Внутримолекулярный изотопный эффект (или фактор внутримолекулярной конкуренции) обусловлен различием изотопного состава двух химически эквивалентных связей в одной и той же молекуле. Межмолекулярный изотопный эффект обусловлен различным изотопным составом молекул в одной инкубационной системе.

IV. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Наблюдаемый КИЭ по v определяют как отношение наблюдаемых скоростей превращения немеченого и меченого субстратов в идентичных условиях.

Для определения кажущихся или лимитирующих изотопных эффектов по V и V/K исследуют концентрационные зависимости наблюдаемых скоростей превращения меченых и немеченых субстратов. На рис. 2, a приведены типичные такие зависимости. При большой концентрации субстрата, когда имеет место насыщение фермента субстратом, и ферментативная реакция приближается к нулевому порядку, меченные и немеченные молекулы превращаются с максимальными скоростями V_H и V_T . Этому граничному условию соответствует КИЭ $^T V$ (рис. 2, b).

В другой граничной ситуации — при малых концентрациях субстрата — когда процесс имеет первый порядок по субстрату, согласно уравнению Михаэлиса-Ментен, тангенс угла наклона начальных участков кривых равен отношению V/K . Этому условию соответствует КИЭ $^T(V/K)$.

Из полученных таким образом значений КИЭ по V и по V/K могут быть рассчитаны изотопные эффекты в константах Михаэлиса.

Такие концентрационные зависимости КИЭ могут быть исследованы для большинства меченых субстратов и ферментов. Однако для тритийсодержащих субстратов возможны ограничения. Это относится к реакциям, для которых константы Михаэлиса имеют большую величину и когда для достижения насыщения фермента требуется вводить в инкубационную систему значительные (часто недоступные) количества меченого субстрата. С таким случаем мы столкнулись, например [31], при изучении КИЭ в реакции окисления глюкозы, меченной тритием в положении 1, в присутствии глюкозооксидазы. Для этой реакции K оценивается величиной $3,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л [33]. В этом случае для насыщения фермента субстратом необходимо использовать меченный субстрат с активностью в десятки Кюри. Кроме того, при этом возникают затруднения, связанные с радиационными процессами.

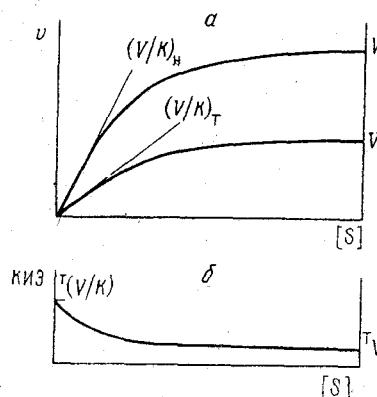
Истинные КИЭ $^T k$ или $^D k$, которые отражают влияние изотопного состава субстрата на истинное химическое превращение внутри активированного субстрат-ферментного комплекса, не могут быть измерены экспериментально, но они могут быть рассчитаны из протий-дейтериевого и протий-тритиевого изотопных эффектов по V/K [7]. Так, протий-дейтериевый истинный КИЭ $^D k$ может быть определен с помощью уравнения

$$\frac{^D(V/K) - 1}{^T(V/K) - 1} = \frac{^D k - 1}{^D k^{1.44} - 1}.$$

Аналогичный вид имеет уравнение для расчета истинного тритиевого КИЭ.

Таким образом, для определения отдельных КИЭ необходимо проводить ферментативные реакции меченых субстратов с полным изотопным замещением у реакционного

Рис. 2. Определение КИЭ из концентрационных зависимостей наблюдаемых скоростей реакции (a) и зависимость КИЭ от концентрации субстрата (b)



центра. И если для дейтерия такие соединения вполне доступны, то для трития препараты с полным изотопным замещением в данном положении молекулы начали производить сравнительно недавно. Лишь в самые последние годы стали появляться работы, в которых КИЭ в ферментативных реакциях были исследованы при использовании субстратов, содержащих исключительно атомы трития в том положении молекул, которое подвергается химическому превращению в данной реакции. Однако в литературе еще и сейчас нередки утверждения, что из-за отсутствия тритированных препаратов без носителей против-тритиевые КИЭ не могут быть определены по индивидуальным скоростям превращения меченых и немеченых субстратов и единственным способом таких исследований является метод конкурентных реакций, в котором инкубационная система одновременно содержит меченные и немеченные молекулы субстрата [3, с. 312; 14].

В таких конкурентных экспериментах из-за различия скоростей превращения меченых и немеченых молекул происходит изменение удельной радиоактивности субстрата. При определении КИЭ конкурентным методом через определенные промежутки времени останавливают реакцию, определяют степень ферментативного превращения и удельную радиоактивность непрореагировавшего субстрата или продукта. Кинетический изотопный эффект по отношению V/K рассчитывают по формуле [3, с. 105].

$$T(V/K) = \frac{\lg(1-F)}{\lg[1 - (FA_p / A_s^0)]},$$

где F — степень превращения, A_s^0 и A_p — исходная молярная радиоактивность субстрата и удельная радиоактивность продукта. Для достижения большей точности рекомендуется определять предельное значение функции при F , стремящемся к нулю

$$T(V/K) = \left| \left(\frac{A_s^0}{A_p} \right) \right|_{F \rightarrow 0}.$$

Таким образом, конкурентный метод позволяет измерять только КИЭ по отношению V/K . В этом заключается его недостаток.

Рассмотренные методы определения КИЭ требуют специально синтезированных меченых субстратов, обогащенных дейтерием или тритием. Однако в некоторых случаях представляется возможность использовать для этих целей препараты природного изотопного состава.

Как известно, все водородсодержащие соединения содержат примерно 0,015% природного дейтерия и $4 \cdot 10^{-15}\%$ природного трития. Современная экспериментальная техника, к сожалению, не позволяет использовать природный тритий для измерения КИЭ; однако в случае дейтерия высокочувствительные ЯМР-спектрометры дают возможность измерять содержание природного дейтерия в различных положениях молекул и контролировать его изменение в химических и биохимических процессах.

С помощью анализа ЯМР показано, что распределение дейтерия может довольно сильно различаться в зависимости от источника препарата. Так, например, было установлено, что образцы синтетического и природного анетола [43] и камфоры [44], различающиеся химической историей, имеют различное распределение природного дейтерия. Причиной этого различия являются КИЭ, которые приводят к обогащению дейтерием определенных положений молекул. Используя метод ЯМР природного дейтерия, Паскаль и соавт. [45] установили, что в биосинтезе β -пинена из мевалоновой кислоты происходит заметное обогащение дейтерием водорода у С(10). Рассчитанный по величине этого обогащения КИЭ оказался равным 2,1.

Следует отметить, что в основе рассмотренного метода определения КИЭ по природному дейтерию лежит принцип конкурентности, и поэтому он позволяет определять КИЭ только по отношению V/K .

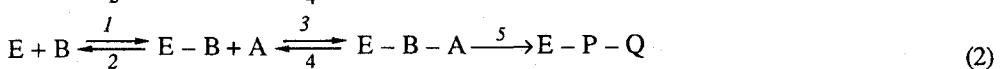
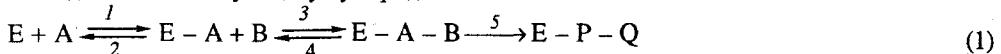
V. ПРИМЕНЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ

1. Изучение кинетического и химического механизма ферментативных реакций

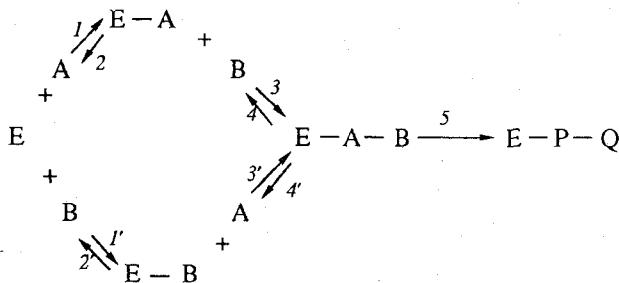
Одним из важных вопросов ферментативной кинетики является установление кинетического механизма реакций, проходящих с участием двух или более субстратов (или продуктов), т.е. описание порядка присоединения субстратов и выделения продуктов. Для оценки кинетического порядка классическими методами обычно используют технику ингибиции или равновесного обмена [46]. Однако для энзиматических систем, в которых превращение субстрата в продукт через тройной комплекс является необратимым, такие методы оказываются весьма неудобными. Дополнительные экспериментальные трудности возникают, когда одним из субстратов является кислород, а одним из продуктов — вода.

Уникальные возможности в исследовании кинетического порядка ферментативных реакций предоставляют кажущиеся и лимитирующие изотопные эффекты по отношению V/K , определяемые, как отмечалось выше, из концентрационных зависимостей скоростей процесса при фиксированной концентрации одного из субстратов.

Пусть в реакции участвует субстрат А, который содержит тритиевую (или дейтериевую) метку, и субстрат В. Порядок присоединения субстратов к ферменту может происходить по одному из двух упорядоченных механизмов



или случайным образом



Кинетический анализ схемы (1) дает следующее выражение для КИЭ [12]:

$$T(V/K) = \frac{^{H_1}k_5/T k_5 + [^{H_1}k_5 (1 + k_3 [B]/k_2)/k_4]}{1 + [^{H_1}k_5 (1 + k_3 [B]/k_2)/k_4]}$$

При бесконечно большой концентрации субстрата В члены уравнения, заключенные в квадратные скобки, становятся доминирующими, и КИЭ стремится к единице.

В тех же случаях, когда присоединение субстрата А предшествует присоединению субстрата В (схема (2)), КИЭ определяется уравнением

$$T(V/K) = \frac{^{H_k}k_5/Tk_5 + ^{H_k}k_5/k_4}{1 + ^{H_k}k_5/k_4},$$

т.е. не зависит от концентрации субстрата В. В этом случае КИЭ может иметь величину от 1 до теоретически максимального значения и зависит от отношения $\frac{V_{max}}{V_0}$, но при этом важно, что отношение будет одинаковым при всех значениях концентрации [В]. Таким образом, если установлено, что концентрация В не влияет на КИЭ, то В связывается с ферментом после А.

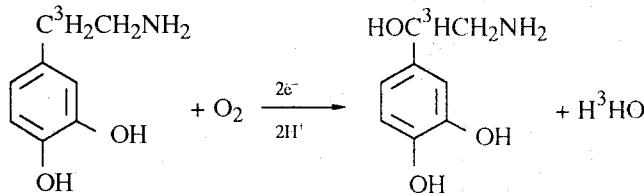
Для случайной последовательности присоединения субстратов А и В выражение для КИЭ становится более громоздким [12], но существенно упрощается, когда концентрация [В] стремится к нулю

$$T(V/K) = \frac{^{3\text{H}}k_5/\Gamma k_5 + ^{3\text{H}}k_5/(k_4 + k_4)}{1 + ^{3\text{H}}k_5/(k_4 + k_4)}$$

или к бесконечности

$$T(V/K) = \frac{^{3\text{H}}k_5/\Gamma k_5 + ^{3\text{H}}k_5/k_4}{1 + ^{3\text{H}}k_5/k_4}$$

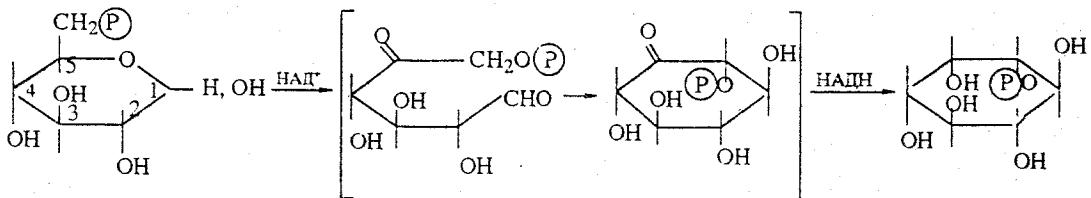
Используя КИЭ, Миллер и Клинман установили [10, 47], что реакция окисления меченного тритием допамина под действием фермента допамин-β-монооксигеназы



сопровождается значительным КИЭ (V/K), который понижается от 8,8 при концентрации кислорода 0,02 ммоль/л до 4,1 при $[O_2] = 1$ ммоль/л. Анализ экспериментальных зависимостей КИЭ от концентрации кислорода дал следующие предельные значения КИЭ: $T(V/K)_{[O_2] \rightarrow 0} \approx 15$ и $T(V/K)_{[O_2] \rightarrow \infty} \approx 3,6$. Полученные данные свидетельствуют о неупорядоченном кинетическом механизме данной реакции.

Анализ КИЭ в реакциях энзиматического окисления 2-(2- ^2H)-пропанола и [1- ^2H]-циклогексанола позволил установить кинетический механизм процессов, катализируемых алкогольдегидрогеназами, выделенными как из дрожжей, так и из печени [48—50]. При использовании алкогольдегидрогеназы из печени выделение НАД из тройного комплекса Е-НАД-циклогексанол происходит с ничтожно малой скоростью, в то время как циклогексанол выделяется значительно быстрее, чем он реагирует с образованием продуктов, т.е. этот процесс является упорядоченным. В реакции окисления 2-пропанола дрожжевой алкогольдегидрогеназой выделение 2-пропанола и НАД из комплекса Е-НАД-пропанол происходит примерно с одинаковыми скоростями, т.е. реакция является случайной. В исследовании механизма этих же реакций были использованы также вторичные КИЭ [51]. Наряду с установлением кинетического механизма энзиматических реакций, КИЭ могут дать ценную информацию и об их химическом механизме [12, 52—55].

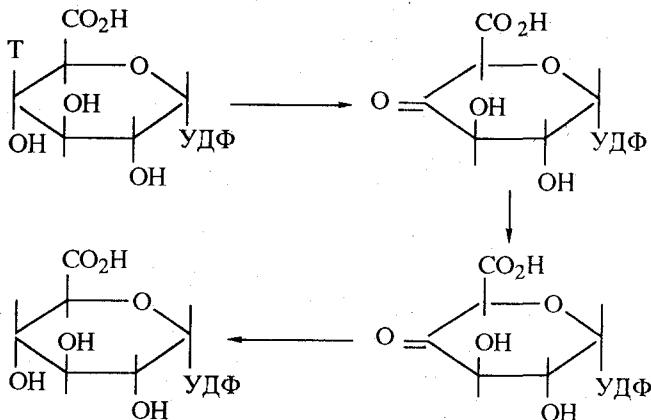
Так, например, исследование КИЭ в реакции превращения D -(5- ^3H)-, D -(3- ^3H)- и D -(4- ^3H)-глюкозо-6-фосфата [34, 56, 57], а также D -(5- ^2H)- и D -(G- ^2H)-глюкозо-6-фосфата [58, 59] в соответствующие тритированные и дейтерированные изотопные формы мио-инозитол-1-фосфата под действием мио-инозитол-1-фосфат-синтазы растительного и животного происхождения позволили установить следующий механизм процесса



Изотопные эффекты наблюдались только в тех случаях, когда тритий или дейтерий находился в исходном субстрате в положении 5, а в остальных случаях меченные субстраты превращались с той же скоростью, что и немеченный *D*-глюкозо-6-фосфат. Это свидетельствует о том, что только атомы водорода в положении 5 принимают участие в стадии окисления и последующей циклизации *D*-глюкозо-6-фосфата в миоинозитол-1-фосфат.

С помощью КИЭ было установлено различие механизмов двух параллельных реакций трансметилирования, катализируемых катехол-О-метилтрансферазой — перенос $[^3\text{H}]$ -метильных групп от меченого *S*-аденозилметионина к *m*- и *n*-гидроксильным группам допамина [42]. Оказалось, что для мета-метилирования вторичный КИЭ равен 1,1,6 а для пара-метилирования — 1,35. Последняя величина близка к значению 1,29, определенному ранее для S_N2 -передачи метильной группы в реакции метилирования 3,4-диоксицетофенона в присутствии этого же фермента [60]. На этом основании авторы работы [42] делают вывод о S_N2 механизме метилирования пара-положения допамина. Меньшее значение КИЭ для мета-метилирования указывает на влияние других ступеней на скорость процесса в целом.

В реакции декарбоксилирования уридиндифосфо-*D*-(4- ^3H)глюкуроновой кислоты в присутствии УДФ-*D*-глюкуронатдекарбоксилазы наблюдали значительный КИЭ (3,1), в то время как наличие тритиевой метки в положениях 3 и 5 исходного соединения не сказывалось на скорости процесса [61, 62]. Эти результаты свидетельствуют о том, что реакция декарбоксилирования сопровождается окислением при C(4)



Аналогичные выводы о механизме процессов сделаны из КИЭ в реакции конверсии УДФ-*D*-(4- ^3H)глюкозы в УДФ-*D*-(4- ^3H)галактозу под действием УДФ-*D*-глюкоза-4-эпимеразы [63].

Также КИЭ были использованы в исследовании механизма реакций, катализируемых фумаразой [64], протеазой [17], алкогольдегидрогеназой [62, 65—67], аминоксидазой [68, 69], хоризматсинтазой [19], дрожжевой гексокиназой [70], лактатдегидрогеназой [71], фосфорибозилтрансферазами [72], сукциноксидазой [73], аденоиндезаминазой [74], монооксигеназой из печени [75], липоксигеназой [54].

Полезную информацию о механизме энзиматических реакций предоставляют также КИЭ при использовании дейтерированных растворителей (зависимость КИЭ от растворителя) [76—78].

2. Определение стадии, лимитирующей скорость ферментативного процесса

Анализ основных типов КИЭ позволяет выявлять стадию, определяющую скорость ферментативных реакций. Примером такого использования КИЭ может служить работа [21], в которой проведено исследование кинетических различий окисления

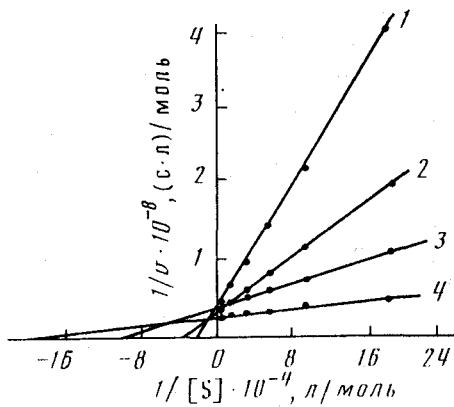
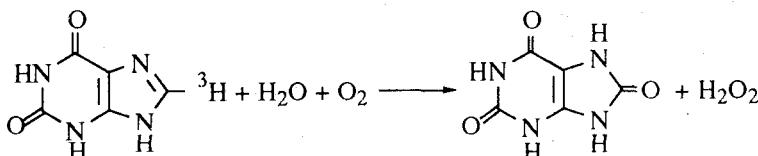


Рис. 3. Графические зависимости скорости ферментативного окисления меченого (1, 2) и немеченого (3, 4) ксантина при различном pH (pH: 1 — 10; 2 — 8,5; 3 — 10; 4 — 8,5)

противои и тритиевой форм ксантина под действием ксантинооксидазы



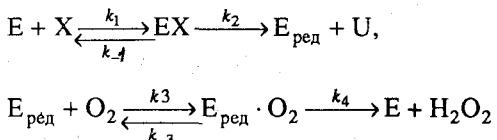
В этой работе обнаружена сильная зависимость КИЭ от концентрации ксантина в инкубационной смеси. Если представить полученные кинетические данные графически, используя метод двойных обратных величин ($1/v$ и $1/[S]$), то, как видно из рис. 3, для всех исследованных случаев наблюдаются линейные зависимости, что находится в соответствии с уравнением Лайнувера-Бэрка

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{V[S]} + \frac{1}{V}.$$

При этом является существенным тот факт, что все экспериментальные прямые имеют разные углы наклона, но пересекают ось ординат практически в одной точке при данном значении pH. Как следует из уравнения, тангенс угла наклона прямых равен отношению K/V ; отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен $-1/K$, а точка пересечения оси ординат дает значение $1/K$.

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы: максимальные скорости окисления меченого и немеченого ксантина при одинаковых значениях pH практически равны, т.е. при больших концентрациях субстрата КИЭ отсутствует или незначителен; кинетический изотопный эффект проявляется главным образом в величине констант Михаэлиса.

Для реакции ферментативного окисления ксантина установлен следующий бинарный механизм [79]



где E — энзим, X — ксантин, U — мочевая кислота. Известно также, что скорость окисления восстановленного фермента $E_{\text{ред}}$ существенно больше скорости образования $E_{\text{ред}}$, а следовательно, скорость процесса в целом определяется первыми двумя стадиями. При достаточно больших концентрациях ксантина ($[X] \gg [E]$) весь фермент связан в субстрат-ферментный комплекс EX, и скорость реакции имеет максимальную

величину

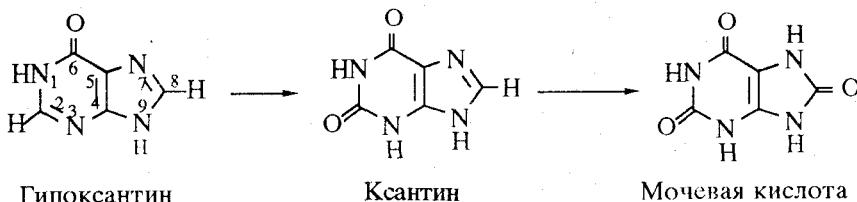
$$V = k_2 [\text{EX}] = k_2 [\text{E}]$$

Поскольку при измерении КИЭ концентрация фермента во всех экспериментах была одинаковой, установленная близость величин V для протиевого и тритиевого субстратов свидетельствует о малом различии констант скорости разрушения комплексов EX, содержащих в своем составе (^1H) - или (^3H) ксантин.

В то же время известно, что константа Михаэлиса определяется как $K = (k_1 + k_2)/k_1$. Учитывая установленное равенство констант k_2 , наблюдаемое различие констант Михаэлиса для меченого и немеченого ксантина может быть объяснено различием констант скорости образования и распада субстрат-ферментных комплексов. Таким образом, КИЭ в исследованной реакции обусловлен различной скоростью образования переходных комплексов меченого и немеченого ксантина.

Аналогичное дискриминирование меченых молекул наблюдали при образовании субстрат-ферментных комплексов в реакции окисления ксантина, содержащего в положении 8 дейтерий [79].

При исследовании КИЭ в реакции двухстадийного окисления ($2\text{-}^3\text{H}$)-, ($8\text{-}^3\text{H}$)- и ($2,8\text{-}^3\text{H}_2$)гипоксантина, катализируемой этим же ферментом



Также установлена скорость стадии, определяющей образования комплекса SE, однако в этом случае стадия разложения комплекса является частично определяющей скорость процесса [80]. При этом также наблюдали изотопные эффекты в стадии ингибиования реакции субстратом.

Об эффективном использовании КИЭ для определения стадий, лимитирующих скорость в реакции декарбоксилирования *L*-малата под действием *L*-малат-НАДН⁺-оксидоредуктазы, сообщалось в [81].

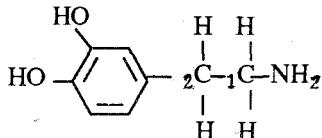
3. Исследование структуры переходного состояния

Изотопные эффекты в химических реакциях широко используются для изучения структуры переходного состояния [3]. Для энзиматических же реакций такое использование КИЭ затруднено, поскольку обычно стадия разрыва химической связи не является полностью скоростьюпределяющей; и другие реакции, как, например, выделение продукта или конформационные изменения, предшествующие или следующие за стадией разрыва химической связи, обычно являются частично скоростьюпределяющими. Поэтому для получения информации о структуре переходного состояния в ферментативных реакциях необходимо измерение истинного КИЭ, т.е. изотопного эффекта в стадии разрыва химической связи. Этот КИЭ, как отмечалось выше, может быть рассчитан по методу Нортропа. Выводы о структурных характеристиках переходного состояния по величине КИЭ основываются на теоретических рассмотрениях Меландера [3], которые применительно к энзиматическим реакциям приведены в [11].

К сожалению, при достаточно детальной проработке теоретической стороны этого вопроса примеров практического использования КИЭ в анализе структуры переходного состояния немного. Так, например, КИЭ, найденные в кинетических исследованиях биосинтеза S-аденозилметионина из $(5\text{-}^{14}\text{C})$ - и $(5\text{-}^3\text{H})\text{ATF}$ (фермент S-адено-

зилметионинсинтетаза), позволили прийти к выводу о S_N 2-подобных структурах переходного состояния, в которых связывание с C(5') является симметричным по отношению к открывающейся фосфатной группе и приходящей серы метионина [18].

В реакции окисления допаминов, хирально меченых тритием в положении 1 ($1R\text{-}^3\text{H}$)- и ($1S\text{-}^3\text{H}$)допамин)



под действием аминоксидазы из бычьей плазмы наблюдали сильные стереохимические изотопные эффекты: 5—6 для ($1R\text{-}^3\text{H}$)- и 26—34 для ($1S\text{-}^3\text{H}$)допамина, что позволило сделать вывод о стереохимии связывания допамина с ферментом [68].

4. Обогащение тяжелыми изотопами водорода меченых субстратов

В тех случаях, когда исходный субстрат состоит из двух различных видов молекул — меченых дейтерием или тритием и обычных, немеченых молекул, тогда эти две формы качественно реагируют одинаково, но в силу проявления КИЭ количественно реагируют различно. Поэтому в ходе реакции количественное соотношение между этими двумя видами молекул подвергается постепенному изменению в пользу меченых тяжелыми изотопами водорода.

Если исходное соотношение концентрации меченых и немеченых молекул субстрата $[S]^*/[S]_0$ обозначить R_0 , а соответствующее соотношение концентраций при достижении степени ферментативного превращения F обозначить $R = [S]^*/[S]$, тогда обогащение тяжелым изотопом субстрата, остающегося в инкубационной системе непреагировавшим, может быть определено по уравнению [3, с. 105]

$$\frac{R}{R_0} = (1 - F)^{(k^*/k) - 1},$$

где k^*/k есть КИЭ.

При использовании субстратов, меченых тритием, в приведенном уравнении отношение R/R_0 может быть заменено отношением молярной радиоактивности обогащенного продукта A к исходной молярной радиоактивности субстрата A_0 .

Результаты ферментативного повышения молярной активности препаратов меченой тритием *D*-галактозы

Исходная смесь изотопных форм	A_0 , Ки/ммоль	t , мин	A , Ки/ммоль	A/A_0
($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал, Гал	0,15	60	0,32	2,2
($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал, Гал	4,6	90	20,3	4,4
($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал, Гал	4,6	90	18,2	4,0
($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал, Гал	4,6	240	21,3	4,6
($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал, Гал	14,6	60	24,5	1,7
($6\text{-}^3\text{H}_2$)Гал, Гал	4,2	30	6,5	1,5
($6\text{-}^3\text{H}_2$)Гал, Гал	4,2	240	26,2	6,2
($6\text{-}^3\text{H}_2$)Гал, ($6\text{-}^3\text{H}_1$)Гал	48,0	240	53,0	1,1

Примечание: Гал — *D*-галактоза; A_0 — начальная, A — конечная монерная активности; t — время инкубации; A/A_0 — степень обогащения

Этот энзиматический способ обогащения тяжелыми изотопами меченых препаратов имеет большое практическое значение, поскольку применение соединений с максимальным содержанием метки представляет наибольший интерес. Кроме того, КИЭ могут быть применены для регенерации меченых соединений после экспериментов, в которых они разбавлялись немечеными («холодными») соединениями.

В работах [20, 27] КИЭ в реакции ферментативного окисления меченой *D*-галактозы были использованы для существенного повышения содержания трития для препаратов, содержащих различные изотопные формы галактозы. Результаты этих экспериментов представлены в таблице.

При использовании КИЭ для обогащения субстратов тяжелыми изотопами водорода важное значение имеет выбор условий проведения инкубации и, прежде всего, концентрации субстрата. Так, например, осуществление реакции ферментативного окисления ксантина при высокой концентрации субстрата не приводит к заметному увеличению молярной радиоактивности (^{8-3}H)ксантина, так как при этом практически отсутствует КИЭ по *V* [21]. При низких же концентрациях ксантина, когда имеет место значительный КИЭ по *V/K*, удалось существенно повысить молярную радиоактивность препаратов (^{8-3}H)ксантина.

Примеры аналогичного использования КИЭ в некоторых других ферментативных реакциях можно найти в работах [31, 80, 82].

В основе наблюдавшегося биологического фракционирования изотопов также лежат КИЭ [83, 84].

5. Кинетические изотопные эффекты в фармакологии и медицине

Учитывая известное утверждение о том, что ферменты являются основой жизни, а в основе биологических процессов лежат энзиматические превращения, КИЭ в ферментативных реакциях можно рассматривать как основу биологических изотопных эффектов, т.е. определенных различий в поведении меченых и немеченых соединений в живых организмах.

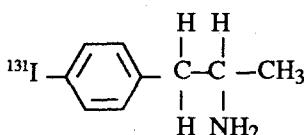
Такое различие может проявляться, например, в изменении биотрансформации меченых продуктов. Так, дейтерирование этильных радикалов в анестетиках метоксифлуране, галоктане, энфлуране приводит к заметному снижению их метаболизма [85]. Поскольку продукты биотрансформации этих препаратов в значительной степени определяют их токсичность, то снижение метаболизма дейтерированных соединений приводит к снижению токсичности.

Различие метаболического поведения дейтерированных соединений, обусловленное КИЭ в ферментативных процессах, отмечалось также для некоторых других лекарственных препаратов [86—89].

Не исключено, что при использовании дейтерированных лекарственных препаратов в определенных случаях КИЭ могут обеспечить больший терапевтический эффект или пролонгировать действие препаратов из-за большего их концентрирования в определенных органах.

Перспективными областями применения КИЭ являются радиоизотопная диагностика и позитронная эмиссионная томография. В этих случаях необходимо использовать препараты с двойной изотопной меткой: одна (дейтериевая) служит для достижения КИЭ, а другая (радионуклидная) — для изучения распределения и локализации радиофармацевтического препарата в организме. В ряде случаев за счет КИЭ от дейтерия удается изменить концентрирование и скорость выведения препарата из исследуемого органа, достигая при этом определенного диагностического эффекта. Такой эффект, например, наблюдал Венцель [90] при исследовании кинетики концентрирования в мозге мышей и крыс *N*-алкиламфетамина, меченного иодом-131 в пара-положении. Этот радиофармацевтический препарат способен концентрироваться в мозге и поэтому используется для различных исследований этого органа. Установлено, что при введении дейтерия в боковую цепь *N*-алкил-*n*-(^{131}I)иодам-

фетамина значительно увеличивается концентрирование этого препарата в мозге

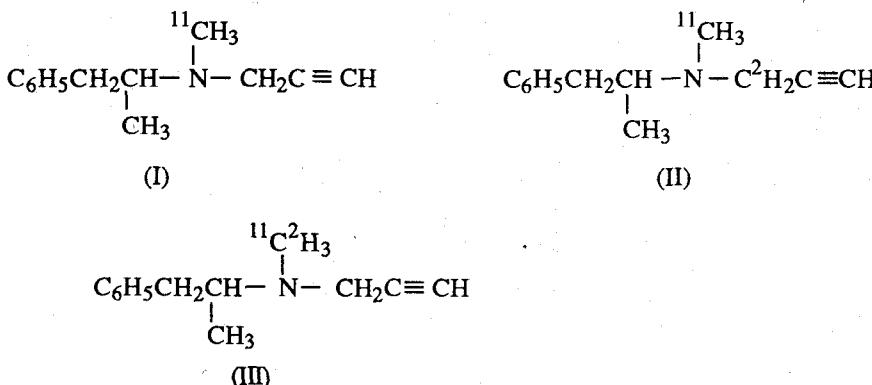


На рис. 4 представлена кинетика изменения радиоактивности в мозге противой и одной из исследованных Венцелем дейтерированных форм *n*-(¹³¹I)иодамфетамина. Как видно из этого рисунка, дейтерированный препарат создает значительно большую концентрацию в мозге. Этот результат имеет важное практическое значение, поскольку введение дейтерия позволяет уменьшать общую активность вводимого в организм иода-131, или при той же дозе получать лучшую диагностическую картину. Существенно, что при этом концентрация иода-131 в крови может быть значительно снижена. Автором высказано предположение, что наблюдаемый эффект достигается за счет замедления скорости ферментативного окислительного дезаминирования препарата.

В аналогичных исследованиях рутеноценовых производных амфетамина, меченых ¹⁰³Ru, установлено, что дейтерированные производные также концентрируются в мозге в большей степени, чем соответствующие противевые формы (почти на 180%) [91, 92].

Уменьшение скорости метаболизма в мозге наблюдали также для дейтерированного препарата *N*, *N*-диметилфенэтиламина, меченного позитронным излучателем углерод-11 [93].

В докладе, представленном на VII Международном симпозиуме по радиофармацевтической химии в 1988 г. в Нидерландах, показано, что КИЭ можно успешно использовать в решении такой важной задачи психофармакологии, как изыскание различного рода ингибиторовmonoаминоксидазы [94]. К числу таких ингибиторов относится *L*-депренил; а *L*-депренил, содержащий углерод-11, используется как радиоактивный индикатор для картирования monoаминоксидазы в мозге человека и животных. При этом предполагалось, что *L*-(¹¹C) депренил транспортируется в мозг, где подвергается окислению под действием monoаминоксидазы. Для исследования механизма этого процесса ингибиции были проведены кинетические исследования с использованием следующих трех изотопных форм *L*-депренила



Методом позитронной эмиссионной томографии получены представленные на рис. 5 данные по поглощению и удерживанию этих соединений в мозге бабуинов [94]. Для соединения (II), содержащего дейтерий в α -положении пропаргильной группы, наблюдается значительно меньшее поглощение ¹¹C в мозге. Для этого случая КИЭ оценивается в 3,8. Полученные результаты показывают, что monoаминоксидаза ката-

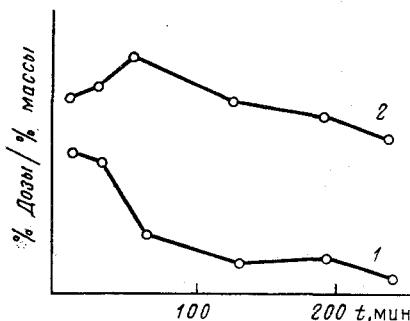


Рис. 4. Кинетика изменения радиоактивности в мозге при введении протиевой (1) и дейтериевой (2) форм $n\text{-(}^{131}\text{I)}$ иодамфетамина

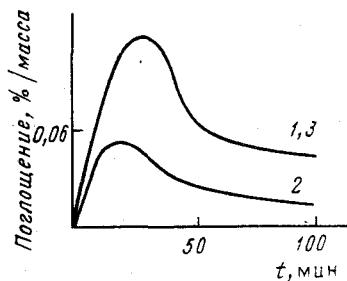


Рис. 5. Кинетика поглощения в мозге бабуинов протиевой (1), дейтерированной в пропаргильной группе (2) и дейтерированной в метильной группе (3) изотопных форм $L\text{-(}^{11}\text{C)}$ депренила [94]

лизирует разрыв связи С-Н в α -положении пропаргильной группы, и это является скоростью определяющей ступенью удерживания ^{11}C в мозге.

Инкубирование митохондриальных мембран печени крыс в присутствии немеченого и дейтерированного серотонина показало, что активность моноаминооксидазы повышается в присутствии $(\beta, \beta'\text{-}^2\text{H}_2)$ серотонина, но снижается при введении $(\alpha, \alpha', \beta, \beta'\text{-}^2\text{H}_4)$ серотонина [85]. Подобное явление наблюдалось и для дофамина. Подавление активности моноаминооксидазы в большей степени осуществляется в присутствии (^2H) фенилэтилгидразина по сравнению с протиевой формой этого соединения. Вследствие этого введение крысам дейтерированного фенилэтилгидразина существенно увеличивает содержание в головном мозге дофамина, серотонина, *m*- и *n*-тироцина [95].

С помощью полностью дейтерированной глюкозы, содержащей одновременно углерод-14, установлено существенное различие в распределении и метаболизме этой изотопной формы по сравнению с препаратом обычного изотопного состава [96]. Это различие, заключающееся прежде всего в замедленном транспорте дейтерированной глюкозы в мозг, обусловлено, как считают авторы работы [96], изотопными эффектами в реакции с участием глюкозооксидазы. Введение в глюкозу вместо дейтерия трития также изменяет метаболизм этого соединения [97, 98]. Сообщалось и о КИЭ от углерода-14 в реакции окисления меченой *D*-глюкозы глюкозооксидазой [99].

Безусловно, рассмотренные примеры использования КИЭ не исчерпывают все потенциальные возможности, и в будущем кинетические различия в ферментативных реакциях с участием меченых соединений найдут новые области применения.

ЛИТЕРАТУРА

- Хевеши. Радиоактивные индикаторы. М.: Изд-во иностр. лит., 1950.
- Isotopes in Organic Chemistry / Eds E.-Buncel, C.C. Lee. Amsterdam; Oxford; New York; Tokyo; Elsevier, 1984. V. 6. P. 266.
- Меландер Л., Сондерс У. Скорости реакций изотопных молекул / Пер. с англ. М.: Мир, 1983. 344 с.
- Richards J.H. // The Enzymes / Ed. P.D. Boyer. New York: Acad. Press, 1970. V. 2. P. 321.
- Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions / Eds. W.W. Cleland, M.H. O'Leary, D.B. Northrop. Baltimore: Univ. Park Press, 1977.
- Klinman J.P. // Advances Enzymol. 1978. V. 46. P. 415.
- Northrop D.B. // Methods Enzymol. 1982. V. 87. P. 607.
- Northrop D.B. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 2644.
- Northrop D.B. // Ann. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 103.
- Miller S.M., Klinman J.P. // Methods Enzymol. 1982. V. 87. P. 711.
- Cleland W.W. // Ibid. 1982. V. 87. P. 625.
- Cleland W.W. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1982. V. 13. P. 385.

13. Simon H., Kraus A. // *Isotopes in Organic Chemistry* / Eds E. Buncel, C.C. Lee. Amsterdam: Elsevier, 1976. V. 2. Ch. 5.
14. Cleland W.W. // *Isotopes in Organic Chemistry* / Eds E. Buncel, C.C. Lee. Amsterdam: Elsevier, 1987. V. 7. P. 61.
15. Cleland W.W. // *Bioorg. Chem.* 1987. V. 15. P. 283.
16. Акулов Г.П. // III Всесоюз. совещ. по проблеме «Физиологически активные соединения, меченные радиоактивными и стабильными изотопами». М.: ИАЭ, 1991. С. 5.
17. Adams K.A.H., Chung S.-H., Klibanov A.M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 9418.
18. Markham J.D., Parkin D.W., Mentch F., Schramm V.L. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 5609.
19. Balasubramanian S., Abell C., Coggins J.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 8581.
20. Akulov G.P., Korsakova N.A., Kudelin B.K. // *J. Labelled Compounds. Radiopharm.* 1989. V. 27. P. 803.
21. Акулов Г.П., Патокина Н.А. // *Радиохимия*. 1990. Т. 32. С. 75.
22. Мееров Г.И. Радиометрические методы определения активности ферментов. М.: Атомиздат, 1974. 60 с.
23. Никольская Е.В. *Радиохимия*. 1983. Т. 25. С. 98.
24. Глесстон С., Лейдер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М.: Изд-во иностр. лит., 1948.
25. Rosenberg E. // *Polyhedron*. 1989. V. 8. P. 383.
26. Oldham K.G. // *J. Labelled Compounds*. 1968. V. 4. P. 127.
27. Акулов Г.П., Корсакова Н.А., Куделин Б.К. *Радиохимия*. 1989. Т. 31. С. 92.
28. Swain C.G., Stivers E.C., Reuwer J.F., Schaad L.J. // *Amer. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 5885.
29. Bright H.J., Gibson Q.H. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 994.
30. Hauge J.G., Foulds G., Bentley R. // *Biochim. and Biophys. acta*. 1968. V. 159. P. 398.
31. Акулов Г.П., Снеткова Е.В. // *Радиохимия*. 1990. Т. 32. С. 93.
32. Диксон М., Уэбб Э. *Ферменты*. М.: Мир, 1982.
33. Swoboda B.E.P., Massey V. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 2209.
34. Loewus M.W. // *Ibid.* 1977. V. 252. P. 7221.
35. Damgaard S.E. // *Biochem. J.* 1980. V. 191. P. 613.
36. Damgaard S.E. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 5662.
37. Grimshaw C.E., Cook P.F., Cleland W.W. // *Ibid.* 1981. V. 20. P. 5655.
38. Kurihara N., Ikamoto Y., Okutani S., Clark A.G. // *J. Labelled Compounds. Radiopharm.* 1989. V. 27. P. 945.
39. Tomaszewski J.E., Jerina D.M., Daly J.W. // *Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 2024.
40. Belleau B. // *Isotopes in Experimental Pharmacology* / Ed. L.J. Roth. Chicago: Univ. Press, 1965. P. 469.
41. Pascal R.A., Baum M.W., Wagner C.K. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 6477.
42. Wu S.E., Hyskey W.P., Borchardt R.T., Schowen R.L. // *Ibid.* 1984. V. 106. P. 5762.
43. Martin G.J., Martin M.L., Mahon F., Brieout J. // *Ibid.* 1982. V. 104. P. 2658.
44. Grant D.M., Curtis J., Croasmun W.R. et al. // *Ibid.* 1982. V. 104. P. 4492.
45. Rascal R.A., Baum M.W., Wagner C.K., et al. // *Ibid.* 1986. V. 108. P. 6477.
46. Cleland W.W. // *The Enzymes* / Ed. P.D. Boyer. New York: Acad. Press, 1970. V. 2. P. 1.
47. Klinman J.P., Humphries H., Voet J.G. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 11648.
48. Cook P.F., Cleland W.W. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 1790.
49. Klinman J.P. // *Ibid.* 1976. V. 15. P. 2018.
50. Cook P.F., Cleland W.W. // *Ibid.* 1981. V. 20. P. 1805.
51. Cook P.F., Oppenheimer N.J., Cleland W.W. // *Ibid.* 1981. V. 20. P. 1817.
52. Cook P.F. Enzyme Mechanism from Isotope Effects. Boca Raton (FL): CRC Press, 1990.
53. Rotenberg S.L., Sprinson D.B. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 2210.
54. Brash A.R., Ingram G.D., Maas R.L. // *Biochim. and Biophys. acta*. 1986. V. 875. P. 256.
55. Oldham K.G. // *Radiotracer Techniques and Applications* // Eds Evans E.A., Muramatsu M. New York; Basel: Marcel Dekker. Inc., 1977. V. 2. P. 823.
56. Hauska G., Hoffmann-Ostenhof O. // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1967. B. 348. S. 1558.
57. Barnett J.E.G., Corina D.L. // *Biochem. J.* 1968. V. 108. P. 125.
58. Eisenberg F., Bolden A.H. // *Fed. Proc.* 1968. V. 27. P. 595.
59. Sherman W.R., Steward M.A., Zinko M. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 5703.
60. Higazi M.F., Borchardt R.T., Schowen R.L. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1979. V. 101. P. 4359.
61. Shutzbach J.S., Feingold D.S. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. P. 2476.
62. Barnett J.E.G., Corina D.L. // *Advances Carbohydr. Chem. and Biochem.* 1972. V. 27. P. 127.
63. Nelsestuen G.L., Kirkwood S. // *Biochim. and Biophys. acta*. 1970. V. 220. P. 633.
64. Blanchard J.S., Cleland W.W. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 4506.
65. Cook P.F., Cleland W.W. // *Ibid.* 1981. V. 20. P. 1797.
66. Loewis F.A., Westheimer F.H., Vennesland B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1953. V. 75. P. 5018.
67. Bone D.H. // *Biochim. and Biophys. acta*. 1963. V. 67. P. 589.
68. Summers M.C., Markovic R., Klinman J.P. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. P. 1969.
69. Farnum M., Palcic M., Klinman J.P. // *Ibid.* 1986. V. 26. P. 1898.
70. Taylor K.B., Cleland W.W. // *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 1980. V. 39. P. 2213.
71. Grimshaw C.E., Cleland W.W. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. P. 3153.
72. Goitein R.K., Chelsky D., Parsons S.M. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 2963.
73. Thorn M.B. // *Biochem. J.* 1951. V. 49. P. 602.

74. Weiss P.M., Cook P.F., Hermes J.D., Cleland W.W. // Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 1987. V. 46. P. 1932.
75. Tomaszewski J.E., Jerina D.M., Daby J.W. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 2024.
76. Schowen K.B., Schowen R.L. // Methods Enzymol. 1982. V. 87. P. 551.
77. Polgar L. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 98. P. 369.
78. Ken F., Masafumi Y., Akihiro M. et al. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. P. 1179.
79. Edmondson D., Ballon D., Heuvelen A. et al. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. P. 6135.
80. Акулов Г.П., Патокина Н.А., Куделин Б.К. // III Всесоюз. совещ. по проблеме «Физиологически активные соединения, меченные радиоактивными и стабильными изотопами». М.: ИАЭ, 1991. С. 44.
81. Schimerlik M.I., Grinshaw C.E., Cleland W.W. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 571.
82. Акулов Г.П., Корсакова Н.А. // Радиохимия. В печати.
83. Bowen H.J.M. // Intern. J. Appl. Rad. Isot. 1960. V. 7. P. 261.
84. Kim M.A., Baumgartner F. // Radiochim. acta. 1991. V. 54. P. 121.
85. Фатеев В.А., Тимов Н.С. // Хим.-фарм. журн. 1986. Т. 20. С. 137.
86. Foster A.R. // Trends Pharmacol. Sci. 1984. V. 5. P. 524.
87. Foster A.R. // Advances Drug Res. 1985. V. 14. P. 1.
88. Laugenhouve A. // J. Clin. Pharmacol. 1986. № 6. P. 383.
89. Trager W.F. // III Intern. Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds (July 17—21. 1988. Innsbruck, Austria). Innsbruck, Venue. 1988. p. 87.
90. Wenzel M. // J. Labelled Compounds. Radiopharm. 1989. V. 27. P. 1143.
91. Wenzel M., Langstaedler M., Preiss D. // Appl. Radiat. Isot. 1988. V. 39. P. 1023.
92. Wenzel M., Preiss D., Gunther G. // J. Labelled Compounds. Radiopharm. 1988. V. 25. P. 121.
93. Hashimoto K., Kojima M., Inone O. et al. // Nucl. Med. Biol. 1986. V. 13. P. 79.
94. Fowler J.S., Wolf A.P., MacGregor R.R. et al. // J. Labelled Compounds. Radiopharm. 1989. V. 26. P. 236.
95. Dyck L.E., Dueuden D.A., Yu P. et al. // Biochem. Pharmacol. 1983. V. 32. P. 1519.
96. Gately S.J., Wess M.M., Govoni P.L. et al. // J. Nucl. Med. 1985. V. 26. P. 127.
97. Bell P.M., Firth R.G., Rizza R.A. // J. Clin. Invest. 1986. № 6. P. 1479.
98. Katz J.J. // Amer. Sci. 1960. V. 48. P. 544.
99. Marschall L.M., Appian A. // J. Chromat. 1972. V. 73. P. 257.

НПО Радиевый институт
им. В.Г. Хлопина,
Санкт-Петербург

Дата поступления
16.03.1992 г.

KINETIC ISOTOPE EFFECTS IN TRITIUM AND DEUTERO-CONTAINING SUBSTRATES

Akulov G.P.

Kinetic differences in the enzymatic reactions with the participation of tritium and deuterium labelled substrates have been reported. Theoretical values and numerous experimental examples of kinetic isotope effects (KIE) in various enzymatic reactions have been discussed. KIE are known to be widely used in the studies on the mechanism of enzymatic reactions and structure of the enzyme-substrate complexes, for the enrichment of labelled compounds by heavy hydrogen isotopes as well as in some medical and biochemical fields.

The bibliography includes 99 references.