

Ионы металлов как эффекторы ферментов

Э.П.Медянцева, М.Г.Вертлиб, Г.К.Будников

Казанский государственный университет
420008 Казань, ул. Ленина, 18, факс (843) 238–0994

Рассмотрено действие ионов металлов как эффекторов ферментов. Обобщены данные по ингибирующему и активирующему влиянию ионов металлов. Отмечена двойственность действия эффекторов в зависимости от их концентрации и природы фермента. Уделено внимание прикладным аспектам использования рассматриваемых эффектов.

Библиография — 66 ссылок.

Оглавление

I. Введение	252
II. Влияние ионов металлов на каталитическую активность ферментов	253
III. Изменение каталитической активности ферментов в присутствии ионов металлов: аналитический аспект	258
IV. Заключение	259

I. Введение

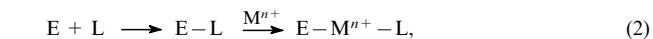
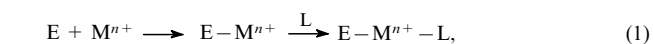
Роль ионов металлов в механизме каталитического действия ферментов многообразна.¹ Для одной группы ферментов характерно наличие одного или нескольких прочно связанных ионов металлов, принимающих участие в каталитических процессах (металлоферменты). Другая группа ферментов не содержит непосредственно связанных ионов металлов, но проявляет каталитическую активность только в их присутствии (металлозависимые или металлоактивируемые ферменты). В третьей группе ферментов металлы не являются обязательными участниками каталитической реакции, однако их присутствие в системе влияет на активность ферментов (металлонезависимые ферменты).

В общем случае при ферментативном катализе образуются три типа комплексов ферментов с металлами:

1. Комплексы с лигандом L (субстратом), который выполняет роль мостика (ион металла связан только с лигандом и участвует в катализе, не взаимодействуя непосредственно с ферментом) (рис. 1, путь I). Подобные комплексы характерны для многих ферментов, например, для креатин-киназы^{2,3} и других киназ и синтетаз.^{4–6}

2. Комплексы, в которых ион металла либо полностью (рис. 1, путь IIa), либо частично (рис. 1, путь IIb) связывает лиганд. Существование комплексов фермент–металл–лиганд доказано с помощью методов ЯМР (пируваткиназа),⁷ рентгеноструктурного анализа (карбоксипептидаза)⁸ и инфракрасной спектроскопии (карбоангидраза).⁹

Комплексы фермент–металл–лиганд с мостиковым металлом образуются по меньшей мере двумя путями:¹



L — лиганд.

Возможен и третий путь, когда не связанный с ферментом ион металла проявляет значительное сродство к лиганду.

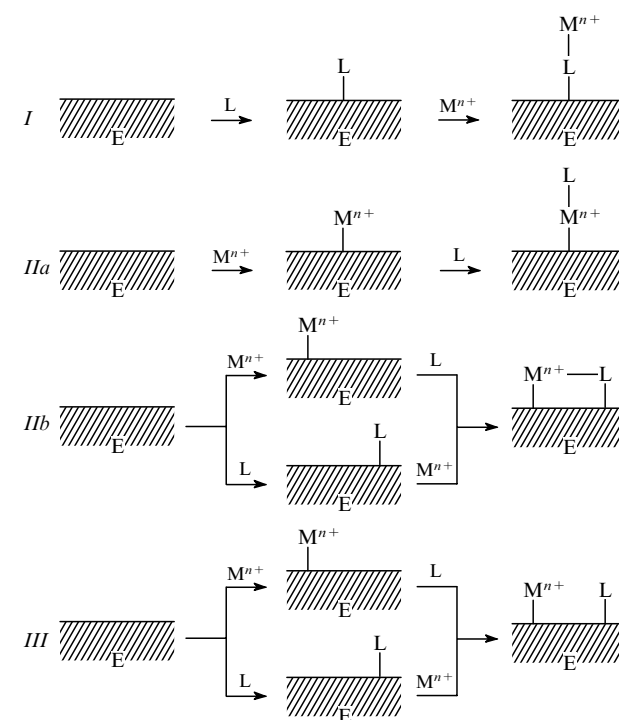
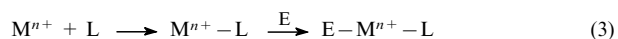


Рис. 1. Типы взаимодействия фермента (E) с ионом металла (M^{n+}) и лигандом (L). I–III — пояснения см. в тексте.

Э.П.Медянцева. Доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии КГУ. Телефон: (843) 231–8546.

М.Г.Вертлиб. Аспирантка той же кафедры.

Г.К.Будников. Доктор химических наук, заведующий той же кафедрой. Телефон: (843) 231–8409.

Область научных интересов авторов: био- и электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биохимические сенсоры.

Дата поступления 4 августа 1997 г.

3. Комплексы, где в качестве мостика выступает фермент (ион металла и лиганд взаимодействуют с ферментом по разным местам) (рис. 1, путь III). Такой тип комплексов характерен, например, для глутаминсинтетазы¹⁰ и других синтетаз.^{11,12}

Каталитическая активность ферментов, являющаяся их важнейшей характеристикой, может существенно различаться в зависимости от типа взаимодействия ионов металлов с ферментами. Поэтому изучение влияния ионов металлов на активность ферментов имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

В данном обзоре не будут рассматриваться металлоферменты и металлозависимые ферменты. Роль металлов в каталитических процессах с участием этих ферментов является предметом специальных исследований и представляет интерес прежде всего для биохимии и медицины (см., например, работы^{13–15}). В настоящем обзоре рассмотрены работы, посвященные в основном влиянию ионов металлов на каталитические свойства металлонеинзависимых ферментов.

II. Влияние ионов металлов на каталитическую активность ферментов

В последние 10–15 лет возрос интерес к биохимическим методам определения неорганических токсикантов, основанным на изучении свойств нативных и иммобилизованных ферментов в присутствии ионов металлов. Наибольший вклад в развитие этого направления внесли российские ученые. Анализ материалов 5-го Международного симпозиума "Кинетика в аналитической химии", проходившего в 1995 г в Москве, показывает, что раздел, посвященный химико-аналитическому аспекту влияния ионов металлов на каталитическую активность ферментов также представлен, в основном, работами российских исследователей.

Каталитическую активность ферментов в присутствии металлов оценивают чаще всего по изменению скорости ферментативной реакции. С этой целью определяют изменение концентрации субстрата или продуктов реакции во времени. В качестве аналитического сигнала используют какой-либо физико-химический параметр, связанный с концентрацией вещества (чаще всего оптическую плотность или потенциал ионизации).

1. Ингибирующее действие ионов металлов

Изучению ингибирования ионами металлов каталитической активности ферментов исследователи уделяли больше внимания, чем процессам активации. В основном изучалось влияние двухзарядных катионов металлов. В частности, было установлено, что такие двухзарядные ионы, как Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} и некоторые другие оказывают ингибирующее действие на бычью рибонуклеазу А,¹⁶ уреазу,^{17–19} различные холинэстеразы^{20–22} и ряд других. Обычно для количественной оценки ингибирующего действия используют величину I_{50} (концентрация ингибитора, при которой происходит 50%-ное уменьшение каталитической активности фермента) и константу ингибирования K_i .

Так, для оценки ингибирующего влияния ионов металлов (Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+}) на уреазу *St. saprophyticus* были определены значения I_{50} для каждого из ионов исследованных металлов.¹⁷ Чем меньше величина I_{50} , тем сильнее металл подавляет активность фермента. Наиболее эффективными ингибиторами уреазы *St. saprophyticus* оказались ионы Ag^+ ($I_{50} = 8 \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹). По эффективности ингибирования влияния изученные ионы располагаются в последовательности: $\text{Ag}^+ > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$. Изученные ионы металлов начинают проявлять ингибирующее действие при

концентрациях от $1 \cdot 10^{-7}$ до $2.5 \cdot 10^{-6}$ моль·л⁻¹. Максимально возможное ингибирующее действие (100%) ионы Ag^+ оказывают при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹, а ионы Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} — $1 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹. Ионы Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , присутствующие в реакционной среде при концентрациях, больших или равных 10^{-3} моль·л⁻¹, не вызывают полного подавления активности фермента (уреаза сохраняет 10–20% исходной каталитической активности). Процесс ингибирования уреазы изученными ионами не зависит от концентрации фермента и продолжительности инкубации с раствором соли металла. Ингибирующий эффект всех изученных ионов обратим и легко снимается разбавлением или обессоливанием фермента на колонке с сефадексом G-25. Однако в присутствии ионов Pb^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , если их концентрация в реакционной среде превышает 10^{-3} моль·л⁻¹, наступает необратимая денатурация фермента. Для ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} во всем исследованном интервале концентраций ($1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹) не наблюдалось такого ингибирования, после которого фермент нельзя было бы реактивировать. Можно предположить, что в данном случае имеет место обратимое неспецифическое ингибирование, хотя авторы не делают такого вывода.

В работе²³ были определены величины кажущихся констант ингибирования K_i для ионов Mg^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} , которые конкурентно угнетают активность Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран скелетных мышц. Чем меньше значение K_i , тем сильнее действие, оказываемое ингибитором. Оказалось, что по степени сродства к Ca^{2+} -АТФазе изученные ионы располагаются в следующем порядке: $\text{Mg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Ингибирующий эффект магния максимален при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹. При концентрациях магния от $1 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹ была обнаружена прямая зависимость между степенью ингибирования ферментативной активности и концентрацией магния. Дальнейшее повышение концентрации магния в меньшей мере сказывалось на величине ингибирования, т.е. приводило к нарушению линейной зависимости.

Ионы Mn^{2+} и Co^{2+} в концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹ не оказывают влияния на Ca^{2+} -АТФазу. Их ингибирующий эффект начинает проявляться лишь при концентрации $\sim 2.5 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹. В области концентрации от $2.5 \cdot 10^{-5}$ до $(2–3) \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹ наблюдается прямая зависимость между падением активности фермента и ростом концентрации этих катионов.

Из работ, посвященных изучению процессов ингибирования каталитической активности ферментов ионами металлов, особо следует выделить работу¹⁶. В ней не только дана количественная оценка наблюдаемого эффекта (определены коэффициенты ингибирования, которые автор представил как отношение начальной скорости расщепления субстрата в присутствии M^{2+} к начальной скорости расщепления субстрата в его отсутствие), но и обсуждается влияние целого ряда параметров, таких как потенциал ионизации, энергия гидратации и ионный радиус катионов, на величину ингибирующего эффекта. Рассмотрено влияние Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и Hg^{2+} на каталитическую активность бычьей РНКазы А. По усилению ингибирующего действия все изученные катионы можно расположить в ряд: $\text{Ba}^{2+} \approx \text{Sr}^{2+} \approx \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Zn}^{2+} \ll \text{Cu}^{2+} < \text{Hg}^{2+}$. Как видно, наибольшую ингибирующую активность проявляют катионы Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ; катионы подгруппы железа (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) являются слабыми ингибиторами, а катионы Ba^{2+} , Sr^{2+} и Ca^{2+} вообще не проявляют ингибирующего влияния.

Автор работы¹⁶ полагает, что использование констант ингибирования для оценки ингибирующей способности катионов металлов некорректно по нескольким причинам: а) из-за отсутствия у катионов металлов строго выраженной

избирательности, т.е. из-за возможности их взаимодействия с различными по электронному влиянию группами активных центров ферментов; б) из-за сложной зависимости характера ингибирования ферментов катионами металлов от концентрации металла; в) из-за способности катионов металлов вступать в реакции комплексообразования не только с ферментами, но и с их субстратами.

Для оценки ингибирующей силы катионов Крупняк вводит показатель W , равный сумме электростатической (Z^2/r) и приведенной ковалентной ($E - \Delta H$) характеристик:

$$W = \frac{Z^2}{r} + (E - \Delta H),$$

где Z — заряд иона, r — радиус иона, E — потенциал ионизации первого и второго электронов, ΔH — энергия гидратации катиона.

Большая ингибирующая активность катионов Zn^{2+} , Cu^{2+} и Hg^{2+} определяется главным образом приведенными ковалентными характеристиками. У катионов подгруппы железа (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+}) электростатические характеристики сопоставимы с аналогичными характеристиками катионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , однако значения приведенных ковалентных характеристик в 2–3 раза ниже. Эти катионы проявляют слабую ингибирующую способность. У катионов Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} и Sr^{2+} значения электростатических и особенно приведенных ковалентных характеристик ниже, чем у Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} . Экспериментальные данные показывают, что эти катионы в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ не ингибируют РНКазу.

Изучено влияние ионов редкоземельных элементов (РЗЭ) (Pr, Nb, Sm, Eu, Tb, Er, Tm, Yb) на каталитическую активность неорганических пирофосфатаз из пекарских дрожжей и кишечной палочки.²⁴ При исследовании зависимости скорости индикаторной реакции от концентрации РЗЭ в интервале 10^{-5} – 10^{-1} мкг $\cdot$ мл $^{-1}$ установлено, что все ионы оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность обоих ферментов. При этом ингибирующее действие различных РЗЭ проявляется в различных диапазонах концентраций. Наиболее эффективным ингибитором пирофосфатаз оказался Pr^{3+} . Ингибирующее действие РЗЭ понижается при переходе от празеодима к иттербию, т.е. с уменьшением ионного радиуса РЗЭ. Механизм ингибирования неорганической пирофосфатазы празеодимом соответствует полному конкурентному ингибированию. Константа ингибирования, характеризующая устойчивость комплекса фермент–ингибитор, свидетельствует о том, что ионы Pr^{3+} образуют с пирофосфатазой более устойчивый каталитически-неактивный комплекс, чем ионы Eu^{3+} .

Авторы других работ^{24–32} рассматривали влияние ионов металлов на каталитическую активность ферментов только качественно, отмечая лишь наличие соответствующего эффекта и область концентраций, в которой он проявляется.

Так, в работе²⁵ показано, что ионы Cu^{2+} вызывают уменьшение каталитической активности глутаматдегидрогеназы печени быка (величина I_{50} равна $2 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$). При концентрации ионов Cu^{2+} , равной $1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ и выше, остаточная активность составляет 8–10% от исходной. Уменьшение активности объясняется прямым взаимодействием катиона меди с глутаматдегидрогеназой (разностный спектр поглощения глутаматдегидрогеназы в присутствии Cu^{2+} свидетельствует об образовании комплекса фермент–металл). Ингибирование носит аллостерический характер. Ионы Zn^{2+} также являются ингибиторами данного фермента. Полученные спектральные данные свидетельствуют²⁵ об одинаковом характере конформационных изменений фермента в области связывания субстрата, вызываемых катионами Cu^{2+} и Zn^{2+} .

Катионы Zn^{2+} ингибируют и поли(АДФ-рибозо)полимеразу из головного мозга крыс. При концентрации Zn^{2+} , равной $1.25 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, ферментативная активность

полностью подавляется. Связывание сульфгидрильных групп полимеразы с ионами Zn^{2+} вызывает изменение ферментативной активности. Эффект ингибирования обратим, так как дитиотреитол нивелирует воздействие данного катиона на полимеразную активность.²⁶

Показано,^{23,27} что ионы Pb^{2+} и Cd^{2+} ингибируют щелочную фосфатазу из кишечника цыплят в реакции гидролиза *п*-нитрофенилфосфата в области концентраций 10^{-3} – 10^{-2} мкг $\cdot$ мл $^{-1}$. В этой же области концентраций каталитическая активность фермента подавляется в присутствии Cd^{2+} . При этом максимальное уменьшение активности имеет место при концентрации 1 – 10 мкг $\cdot$ мл $^{-1}$ (см.²³). Ионы Cd^{2+} в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ мкг $\cdot$ мл $^{-1}$ ингибируют также пероксидазу хрена.²⁷ На каталитическую активность пероксидазы оказывают ингибирующее действие и катионы Hg^{2+} в концентрации $5 \cdot 10^{-13}$ – $5 \cdot 10^{-8}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ (см.^{28–30}). Падение активности пероксидазы наблюдается также в присутствии Bi^{3+} в интервале концентраций $(2$ – $10) \cdot 10^{-4}$ мкг $\cdot$ мл $^{-1}$. При больших концентрациях Bi^{3+} скорость реакции практически не меняется.³¹

Протеиндисульфидредуктаза из печени быка катализирует тиол-дисульфидный обмен между глутатионом и инсулином, а также обладает способностью реактивировать произвольно окисленную рибонуклеазу. Активность данного фермента подавляется ионами Cu^{2+} и Hg^{2+} .²⁹

Изучено^{20,33} влияние Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) эритроцитов человека в широком диапазоне концентраций солей. Отмечено, что все исследованные соли являются обратимыми конкурентными ингибиторами АХЭ. Исключение составляет $MnCl_2$, который вообще не влияет на активность АХЭ. Ингибирующее действие в первом приближении прямо пропорционально концентрации соответствующего металла. На основании зависимости степени ингибирования АХЭ солями от значения рН, сделан вывод о том, что ингибиторами активности АХЭ являются гидроксокомплексы типа MOH^+ .

Ионы Cu^{2+} и Cd^{2+} угнетают каталитическую активность холинэстеразы (ХЭ), выделенной из побегов гороха.²² Ингибирующим действием обладают также ионы Co^{2+} и Al^{3+} . Согласно данным²¹, ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-3}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ ингибируют ХЭ из корней фасоли, в то время как Mg^{2+} на нее не действует.

Кальций занимает особое место в ряду металлов. Для него характерно, скорее, активирующее, а не ингибирующее действие.³⁴ Однако кальций может ингибировать некоторые ферменты, например, дрожжевую гексокиназу³⁰ или щелочную фосфатазу.²⁷

Установлено, что ионы кальция при 10–100-кратном избытке по отношению к празеодиму усиливают ингибирующее действие последнего. Это связано, по-видимому, с тем, что ионный радиус Ca^{2+} близок к радиусам РЗЭ, поэтому кальций может оказывать аналогичное РЗЭ влияние на фермент.²⁴

Катионы Ca^{2+} заметно снижают активность гексокиназы.³⁵ Каталитическая активность щелочной фосфатазы из кишечника цыплят также уменьшается в присутствии ионов кальция в концентрации 10^{-3} – 1 мкг $\cdot$ мл $^{-1}$. Интересно, что ингибирующее действие кальция на данный фермент уменьшается с возрастанием концентрации катиона.²⁷

В последнее время появились работы, посвященные изучению каталитической активности и свойств иммобилизованных ферментов.^{18,19,36–38} Катионы металлов, естественно, влияют на каталитическую активность и иммобилизованных ферментов.

Уреза, иммобилизованная на твердом носителе (микропористом сополимере стирола с дивинилбензолом), ингибируется ионами токсичных металлов. Ингибирующий эффект Fe^{2+} начинает проявляться уже при концентрации 10^{-10} – 10^{-9} моль $\cdot$ л $^{-1}$. Для большинства ионов этот эффект

проявляется при концентрации $\sim 10^{-8}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. По эффективности ингибирующего действия ионы металлов могут быть расположены в следующий ряд: $\text{Ag}^+ > \text{Hg}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ (см.^{18, 19}). Выше отмечалось, что катион Ag^+ является наиболее сильным, а Pb^{2+} — наиболее слабым ингибитором нативной уреазы,¹⁷ в то же время падение ингибирующего влияния в ряду других металлов для нативной уреазы (см. выше) отличается от такового для иммобилизованной. Это связано с изменениями, происходящими с ферментом при иммобилизации.

Влиянию ионов Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Tl^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Hf^{4+} , Ti^{4+} , Zr^{4+} на каталитическую активность ХЭ, иммобилизованной включением в пленки из нитрата целлюлозы, посвящены работы^{36–38}. Все эти металлы оказывают ингибирующее действие на иммобилизованную ХЭ. Наибольший инактивирующий эффект из всех перечисленных ионов проявляет Cu^{2+} . Минимальная концентрация ($c_{\min}$), вызывающая статистически достоверное уменьшение каталитической активности иммобилизованной ХЭ, для Cu^{2+} составляет $4 \cdot 10^{-10}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. Для других ионов аналогичное изменение каталитической активности наблюдается при следующих концентрациях:^{36–38}

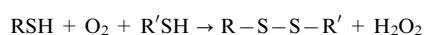
Ион	Zr (IV)	Ti (IV)	Nb (V)	Hf (V)	Ta (V)
c , моль $\cdot$ л $^{-1}$	$5 \cdot 10^{-10}$	$8 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
Ион	Cr (III)	Pb (II)	Fe (III)	Cd (II)	
c , моль $\cdot$ л $^{-1}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	

Ингибирующий эффект зависит и от каталитической активности самого фермента. Например, для ХЭ, иммобилизованной в матрицу из нитрата целлюлозы, с удельной активностью 1.12 ± 0.04 мкмоль $\cdot$ мин $^{-1} \cdot$ см $^{-2}$ величина $c_{\min}$ для Cu^{2+} составляет $4 \cdot 10^{-10}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, а для образцов с меньшей удельной активностью (0.33 ± 0.02 мкмоль $\cdot$ мин $^{-1} \cdot$ см $^{-2}$) — $1 \cdot 10^{-9}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ (см.³⁸).

Каталитическая активность иммобилизованной ХЭ, падение которой вызвано действием ионов тяжелых металлов, полностью восстанавливается растворами цистеина и ЭДТА. Однако в случае Pb^{2+} достигается только 70%-ная реактивация полностью ингибированной ХЭ. Это связано, по мнению авторов³⁶, с возможностью взаимодействия Pb^{2+} с остатком гистидина, входящим в состав активного центра ХЭ, особенно при действии больших ($\sim 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) концентраций Pb^{2+} .

Механизм ингибирующего действия ионов металлов на каталитическую активность ферментов установить достаточно трудно. Металл может конкурировать с субстратом за места связывания в активном центре. В то же время он может взаимодействовать с различными группами белковой молекулы, находящимися вне активного центра, но влияющими на каталитические функции фермента,³⁹ т.е. связываться с аллостерическим центром фермента.

Полагают, что ингибирующее действие ионов металлов на молекулу фермента может быть обусловлено образованием сульфидов как с цистеином, входящим в состав ферментов, так и с продуктами распада.⁴⁰ Если остаток цистеина входит в структуру активного центра фермента или ответствен за поддержание соответствующей конформации белковой молекулы, то модификация его тиольных групп инактивирует фермент. Кроме того, ионы тяжелых металлов могут катализировать окисление тиольных остатков до дисульфидов.⁴¹



Чаще всего ингибирующее действие ионов металлов объясняют их способностью образовывать координационные связи.⁴¹ Как известно,⁴² входящие в активные центры ферментов нуклеофильные остатки некоторых аминокислот склонны к образованию координационных связей с ионами

тяжелых металлов. Так, остаток гистидина — составная часть эстеразного участка активного центра ХЭ — может взаимодействовать с ионами металлов.³⁶ Различие в ингибирующей способности металлов некоторые авторы объясняют разницей в ионном радиусе катионов.^{16, 29, 36}

2. Активирующее влияние катионов металлов

Металлы могут не только снижать, но и увеличивать каталитическую активность ферментов. Чаще всего активирующее действие на ферменты оказывают ионы щелочноземельных металлов. Следует отметить, что изучению процессов активации ферментов ионами металлов посвящено значительно меньше работ, чем изучению их ингибирующего действия. К сожалению, как и в случаях изучения ингибирующего эффекта, большинство авторов лишь качественно описывают процесс активации,^{43–56} не приводя количественных оценок, что существенно затрудняет сравнение опубликованных данных.

Так, исследовано активирующее влияние катионов Ca^{2+} на митохондриальную глицерофосфатдегидрогеназу (ГАФД).⁴³ Катионы Ca^{2+} не являются избирательными активаторами ГАФД. Они способны взаимодействовать как с электронодонорными аминокислотными остатками, так и с атомами азота пептидных связей, не обязательно входящими в состав активного центра фермента. Из этого следует, что не все катионы Ca^{2+} , взаимодействующие с ферментом, играют одинаковую роль в поддержании его активности. Часть из них, вступая в реакцию с аминокислотными остатками, расположенными вдали от активного центра фермента, может не только не проявлять активирующего действия, но, наоборот, вызвать ингибирующий эффект.

Анализ литературы показывает, что совместное присутствие в растворе нескольких катионов металлов даже одной природы (Ca, Mg) оказывает неоднозначное действие на активность исследуемого фермента. Один из ионов может либо усиливать действие, оказываемое другим (т.е. проявлять синергизм), либо ослаблять его действие.

Чаще всего синергизм проявляют ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (см.³⁴). Например, преинкубация киназы фосфорилизы с данными ионами в течение даже короткого времени приводила к семикратному увеличению каталитической активности. Считают,³⁴ что катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} при совместном присутствии повышают степень взаимодействия этой киназы с гликогеном.

Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} оказывают активирующее действие и на креатинкиназу миофибрилл из скелетной и сердечной мышц крыс. Катионы кальция слабее активируют фермент, чем катионы магния. В присутствии ионов Mg^{2+} кальций ингибирует креатинкиназу. Полагают,⁴⁴ что креатинкиназа связывает ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} разными участками, поскольку последний не препятствует тормозящему действию кальция даже при добавлении его в 100-кратном избытке по отношению к Ca^{2+} .

Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} активируют АТФазу актомиозина миометрия. В условиях повышения концентрации Ca^{2+} до $(0.01–5) \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ в безмагниевой среде, а также при дополнительном введении Mg^{2+} в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ наблюдается заметное повышение активности АТФазы с последующим выходом ее значения на плато.³⁹

При изменении концентрации Mg^{2+} в пределах $1 \cdot 10^{-5}–5 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ в бескальциевой среде отмечается увеличение активности АТФазы в области низких концентраций ионов магния с дальнейшим выходом на плато. Значительная индукция АТФ-гидролазной реакции наблюдается при дополнительном введении Ca^{2+} в физиологической концентрации ($1 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$) в инкубационную среду. Ионы Ca^{2+} являются более эффективными активаторами реакции гидролиза АТФ.⁴⁶

Изучалось действие катионов щелочных и щелочноземельных металлов на активность нативной ХЭ^{21,46} и иммобилизованной бутирилхолинэстеразы.³⁶ Ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} стимулируют холинэстеразную активность в побегах гороха на 30–60%.^{21,22} В присутствии ионов Na^+ , Mg^{2+} и Mn^{2+} в интервале концентраций от $8 \cdot 10^{-4}$ до $2 \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$ каталитическая активность иммобилизованной ХЭ возрастает. Это вызвано, по мнению авторов³⁶, тем, что вблизи активного центра ХЭ имеется анионная группа, которая препятствует взаимодействию фермента с субстратом. Добавление солей указанных металлов приводит к связыванию этой группы ионами металлов-активаторов ХЭ, что создает наиболее благоприятные условия для образования комплекса Михаэлиса. Оказалось, что чем больше радиус и заряд иона металла-активатора, тем меньшая концентрация его необходима для блокирования анионной группы ХЭ.

Катионы Ca^{2+} активируют бутирилхолинэстеразу.^{47–49} В присутствии Ca^{2+} возрастает максимальная скорость реакции, а величина константы Михаэлиса практически не меняется. Ионы Ca^{2+} , по-видимому, не конкурируют с субстратом за центры связывания, поскольку активацию нельзя снять избытком ацетилхолина. Полагают, что действие Ca^{2+} осуществляется аллостерически при связывании на специальных участках.^{50,51} Ионы Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} не влияют на гидролиз ацетилхолина в условиях эксперимента, описанного в работе⁴⁷.

В работах^{52,53} показано, что микроколичества ионов тяжелых металлов, таких как Pb, Hg, Cd, Tl, при концентрациях в общем случае ниже 10^{-7} – 10^{-6} моль $\cdot$ л $^{-1}$ активируют иммобилизованную ХЭ. Некоторые металлы группы платины, например Pt^{2+} и Rh^{3+} , также оказывают активирующее действие на иммобилизованную ХЭ.^{54,55}

Следует отметить, что чаще всего ингибирующий эффект линейно связан с концентрацией эффектора.^{27–31,37,38} В случае же активации этот процесс имеет более сложную зависимость от концентрации ионов металлов.^{35,56} Прежде всего увеличение каталитической активности наблюдается в небольшом интервале концентраций, не превышающем обычно 10–15 раз (рис. 2). Максимальная каталитическая активность проявляется иногда лишь при определенной концентрации эффектора (рис. 2, b). В отдельных случаях имеется небольшое плато (рис. 2, a). Отклонение концентрации от оптимальной приводит к уменьшению каталитической активности фермента, вплоть до уровня контрольного опыта.

Среди исследований по активации ферментов можно выделить работу⁵⁷, в которой изучен механизм активирующего действия ионов Mg^{2+} и Co^{2+} на глюкозоизомеразу *Actinomyces olivocinereus* 154. В этой работе рассчитаны основные кинетические константы и дана количественная оценка активирующей способности изученных катионов (определены константы активирования). Установлено, что активирующее действие ионов Mg^{2+} гораздо сильнее, чем Co^{2+} . Максимальное активирующее действие ионов Mg^{2+} отмечается при концентрации $(2.0–2.5) \cdot 10^{-2}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, а ионов Co^{2+} — в области концентраций $(2.5–5) \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. Дальнейшее увеличение концентраций ионов Mg^{2+} и Co^{2+} приводит к ингибированию глюкозоизомеразы. Для ионов Co^{2+} этот эффект выражен сильнее и начинается проявляться уже при концентрациях $1.25 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$.

Изучение активирующего действия ионов Mg^{2+} и Co^{2+} при их одновременном добавлении в реакционную смесь показало сложную зависимость степени активирования фермента как от абсолютных концентраций ионов металлов, так и от соотношения этих концентраций. Максимальная активность наблюдалась при концентрации ионов Mg^{2+} $2 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$, а ионов Co^{2+} — $5 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л $^{-1}$. Следует отметить, что оптимальные концентрации ионов-активаторов в смеси менялись для ионов Mg^{2+} в сторону

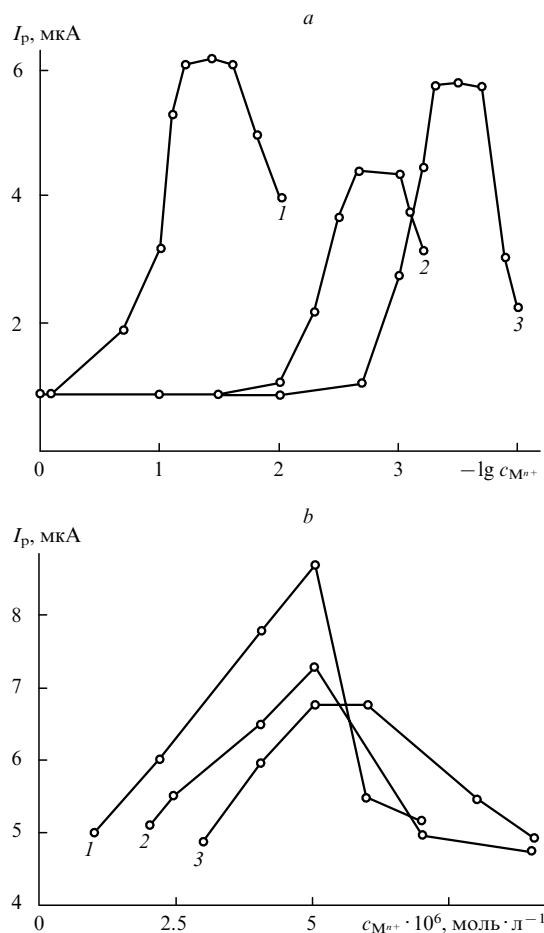


Рис. 2. Зависимость аналитического сигнала (тока при потенциале -0.55 В) от концентрации ионов металлов (рН 9.05; концентрация бутирилтиохолиниодида — 0.6 мг $\cdot$ мл $^{-1}$)

Иммобилизованная ХЭ с удельной активностью 0.35 мкмоль $\cdot$ мин $^{-1} \cdot$ см $^{-2}$ (a) и 1.17 мкмоль $\cdot$ мин $^{-1} \cdot$ см $^{-2}$ (b).

a: 1 — Mn (II), 2 — Mg, 3 — Na; b: 1 — Ca, 2 — Sr, 3 — Ba.

небольшого уменьшения, а для ионов Co^{2+} увеличивались в 10 раз по сравнению с их раздельным добавлением.

Ионы Mg^{2+} и Co^{2+} связываются различными участками глюкозоизомеразы и по-разному влияют на ее активность.⁵⁷ Поэтому механизм активирования изомеризации глюкозы этими ионами различен. Активирование ионами Mg^{2+} носит неконкурентный характер, а ионами Co^{2+} — синергический. При совместном же применении ионов Mg^{2+} и Co^{2+} характер активации смешанный. При неконкурентном активировании глюкоза и ионы Mg^{2+} связываются с ферментом независимо друг от друга, образуя активный мостиковый тройной комплекс (рис. 1, путь II). Константа активирования очень мала (0.002). Это указывает на высокую стабильность активного тройного комплекса ($\text{Mg}^{2+} - \text{E} - \text{S}$) и активированного фермента ($\text{Mg}^{2+} - \text{E}$) и незначительную величину константы скорости их распада на исходный фермент и фермент-субстратный комплекс (ES). Таким образом, основное количество глюкозоизомеразы при активировании ее ионами Mg^{2+} связано в тройной комплекс $\text{Mg}^{2+} - \text{E} - \text{S}$. Активирование ионами Co^{2+} , как отмечалось выше, имеет синергический характер. Ионы Co^{2+} , связываясь с молекулой глюкозоизомеразы, увеличивают сродство фермента к глюкозе. Кроме того, комплекс ES гораздо быстрее реагирует с ионами Co^{2+} , чем свободный фермент. Авторы предполагают, что основная роль ионов Co^{2+} заключается не столько в активировании фермента, сколько

в придании его четвертичной структуре устойчивой к термодинамической инактивации конформации. Кроме того, возникающая конформация облегчает присоединение глюкозы даже в отсутствие Mg^{2+} , а в его присутствии ускоряет и образование мостикового тройного комплекса. В результате этого скорость изомеризации возрастает. Это подтверждается опытами с одновременным введением в реакционную смесь ионов Mg^{2+} и Co^{2+} (см.⁵⁷).

Были сделаны попытки оценить количественные характеристики процессов активации иммобилизованной ХЭ в присутствии ионов щелочноземельных металлов с помощью вольтамперометрических измерений.^{56, 58} Согласно полученным данным, процесс активации зависит от многих факторов: концентрации субстрата, pH среды, активности иммобилизованного фермента (т.е. способа иммобилизации), концентрации активатора, времени инкубации, порядка действия субстрата и активатора на иммобилизованную ХЭ. Максимальный активирующий эффект наблюдается в области pH 8.95–9.05. Чем меньше каталитическая активность иммобилизованной ХЭ, тем большая концентрация ионов металлов необходима для создания активирующего эффекта. Так, в работе³³ описан способ иммобилизации, отличительной особенностью которого является наряду с включением фермента в матрицу из нитрата целлюлозы одновременное воздействие бифункционального реагента — глутарового альдегида. При этом получают иммобилизованную ХЭ, обладающую примерно в 3–4 раза меньшей каталитической активностью, чем при последующей обработке иммобилизованного фермента бифункциональным реагентом. Для увеличения каталитической активности этих образцов необходимо использовать большие концентрации активаторов (для Ca^{2+} — $6 \cdot 10^{-3}$ – $6 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л⁻¹).³⁷ Для подтверждения наблюдаемых эффектов авторы³⁷ использовали радиохимический метод с применением изотопа ⁸⁵Sr. Из полученных данных следует, что в присутствии ионов щелочноземельных металлов в оптимальных условиях (pH 9.05, концентрация ионов Sr^{2+} $5 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹, концентрация субстрата $2 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹) каталитическая активность иммобилизованной ХЭ изменяется в порядке $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$, что согласуется с радиусом ионов. Подобная корреляция между радиусами ионов и их активирующим действием отмечалась ранее³⁶ для ионов щелочных металлов. С увеличением концентрации субстрата от $2 \cdot 10^{-3}$ до $4 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹ вид активации изменяется от ассоциативной активации к псевдоактивации и двухпараметрически рассогласованной активации. Величины констант активации для ионов Ca^{2+} составляют $(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹ при низких $((1.5-3) \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹) и $(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ моль $\cdot$ л⁻¹ при более высоких ($4 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹) концентрациях субстрата. Для ионов Ba^{2+} величина константы активации равна $(8.40 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹. Полученные значения констант активации коррелируют с обнаруженной экспериментально большей активирующей способностью ионов Ca^{2+} ; в их присутствии сильнее возрастает каталитическая активность иммобилизованной ХЭ.

3. Зависимость характера действия ионов металлов от их концентрации

Хорошо известно, что одни и те же металлы в зависимости от концентрации могут увеличивать или уменьшать каталитическую активность ферментов.

Так, ионы Cu^{2+} при низких концентрациях стимулируют активность очищенной поли(АДФ-рибозо)полимеразы. При концентрации Cu^{2+} $5 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹ полимеразная активность увеличивается в 1.4 раза. Последующее увеличение концентрации Cu^{2+} подавляет ферментативную активность, и при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л⁻¹ полимеразная активность равна нулю. Поли(АДФ-рибозо)полимераза содержит участки, имеющие различное сродство к катионам Cu^{2+} . При

низких концентрациях связывание Cu^{2+} с участками фермента с высоким сродством к катиону увеличивает полимеразную активность, тогда как при высоких концентрациях катионы Cu^{2+} , по-видимому, связываются и с участками, имеющими более низкое сродство к металлу, что подавляет ферментативную активность.²⁶

Ионы Mg^{2+} при концентрации от 10^{-3} до 1 мкг $\cdot$ мл⁻¹ оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность щелочной фосфатазы из кишечника цыплят. В интервале концентраций 1–100 мкг $\cdot$ мл⁻¹ ионы магния значительно активируют фермент. Ионы алюминия незначительно ингибируют фермент при концентрациях 10^{-3} –1 мкг $\cdot$ мл⁻¹ и довольно сильно активируют при концентрациях 1–10 мкг $\cdot$ мл⁻¹ (см.²⁷).

Ионы Mn^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} при низких концентрациях активируют пируваткиназу мышц, а при более высоких концентрациях ингибируют данный фермент. Ионы Ca^{2+} в концентрации $4 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л⁻¹ ингибируют глутаматдегидрогеназу печени, а в концентрации выше $4 \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л⁻¹ активируют этот фермент. В то же время ионы Mg^{2+} ингибируют глутаматдегидрогеназу только в интервале концентраций $(2-4) \cdot 10^{-4}$ моль $\cdot$ л⁻¹. Более высокие и более низкие концентрации Mg^{2+} активируют этот фермент. Некоторые фосфатазы активируются низкими (до $5 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹) концентрациями Mg^{2+} , а при более высоких концентрациях наблюдается ингибирование.³⁴

В табл. 1 обобщены данные об изменении свойств ферментов в присутствии ионов некоторых металлов.

Почти все исследователи отмечают двойственное влияние ионов металлов на активность ХЭ: активирующее действие при малых концентрациях и ингибирующее при больших.⁴⁷ Даже такие катионы, как Na^{+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} при высоких концентрациях не увеличивают каталитическую активность ХЭ.⁵⁶ Ионы Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} и Pt^{+} при концентрациях меньше 10^{-7} – 10^{-6} моль $\cdot$ л⁻¹ активируют ХЭ, а при больших проявляют ингибирующий эффект.^{36, 37, 52, 53} Большинство авторов связывает активирующее действие катионов с возможностью образования тройного комплекса $E-M-S$ (рис. 1, путь II),^{1, 58} обеспечивающего конформационно наиболее благоприятные условия для протекания ферментативной реакции. Ингибирующее же действие ионов металлов в больших концентрациях объясняют конкурентной реакцией между катионами металлов и катионами субстрата (если субстрат имеет положительный заряд) за активный центр фермента. При больших концентрациях солей активный центр молекулы может быть занят ионами металла и окажется недоступным для катионов субстрата. Вследствие этого, в частности, может снижаться каталитическая активность как нативной, так и иммобилизованной ХЭ.^{36, 59} По мнению других авторов⁶⁰, влияние ионов металлов на активность фермента связано с изменением растворимости субстратов при высоких концентрациях солей.

Очевидно, что действие ионов металлов на ферменты зависит от многих факторов. При этом трудно, а зачастую невозможно, выделить определяющий фактор. В частности, влияние металлов на каталитическую активность ферментов зависит от природы металла, его размеров, заряда, потенциала ионизации, от природы фермента, нативный он или иммобилизованный, условий проведения ферментативной реакции. Чаще всего влияние ионов металлов на активность ферментов связывают с их способностью образовывать комплексы между ферментом и субстратом, которые могут участвовать в каталитическом процессе, облегчая перенос электронов, стабилизировать активную конформацию фермента или ассоциацию его субъединиц, а также выступать в роли «якорной группировки», не принимая непосредственного участия в акте катализа. Возможно также сочетание различных факторов из числа перечисленных. К сожалению, большинство авторов приводят лишь качественную оценку

Таблица 1. Влияние некоторых ионов металлов на каталитическую активность ферментов.

Фермент	Ион металла	Характер действия	$c_{эфф}^a$, моль · л ⁻¹	Ссылки
Ca ²⁺ -АТФаза К.Ф. 3.6.1.3.	Mg ²⁺ , Co ²⁺	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	23
	Mn ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	23
АТФаза К.Ф. 3.6.1.8.	Ca ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	45
	Mg ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$	45
Гексокиназа К.Ф. 2.7.1.1.	Ca ²⁺	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2}$	35
ГАФД К.Ф. 1.1.1.8	Ca ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	43
Глутаматдегидрогеназа К.Ф. 1.4.1.4.	Cu ²⁺	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	25
	Zn ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	25
Глюкозоизомераза К.Ф. 5.3.1.18.	Mg ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-3} - 9 \cdot 10^{-1}$	57
	Co ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-3} - 9 \cdot 10^{-1}$	57
Креатинкиназа К.Ф. 2.7.3.2.	Ca ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$	44
	Mg ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$	44
Неорганическая пироглутатаминатаза К.Ф. 3.6.1.1.	Pr, Nb, Sm	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	24
	Eu, Tb, Er	»	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	24
	Tu, Yb	»	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	24
Пероксидаза К.Ф. 1.11.1.7.	Hg ²⁺	»	$5 \cdot 10^{-13} - 5 \cdot 10^{-8}$	28
	Bi ³⁺	»	$1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$	31
Поли(АДФ-рибозо)полимераза К.Ф. 2.4.2.30	Zn ²⁺	»	$2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$	26
	Cu ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-5}$	26
	Cu ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	26
	Cu ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	26
Рибонуклеаза К.Ф. 3.1.4.8.	Ba ²⁺ , Sr ²⁺	Не влияет	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Ca ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Zn ²⁺ , Mn ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Fe ²⁺ , Co ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Ni ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
	Ni ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$	16
Уреаза К.Ф. 3.5.1.5.	Ag ⁺ , Hg ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	17
	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	17
	Pb ²⁺ , Ni ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	17
	Cd ²⁺ , Co ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	17
	Cd ²⁺ , Co ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	17
Холинэстераза К.Ф. 3.1.1.8.	Pb ²⁺	»	$5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-3}$	36
	Pb ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-7}$	53
	Cd ²⁺	Ингибитор	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$	37
	Cd ²⁺	Активатор	$5 \cdot 10^{-9} - 8 \cdot 10^{-7}$	53
	Hg ²⁺	Ингибитор	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	36
	Hg ²⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-12} - 1 \cdot 10^{-6}$	53
	Tl ⁺	Ингибитор	$5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$	37
	Tl ⁺	Активатор	$1 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-5}$	53
	Ca ²⁺ , Sr ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	56
	Ba ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	56
	Ba ²⁺	»	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	56
Щелочная фосфатаза К.Ф. 3.1.3.1.	Ca ²⁺	Ингибитор	$2 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-5}$	27
	Ba ²⁺	»	$7 \cdot 10^{-9} - 7 \cdot 10^{-7}$	27
	Cd ²⁺	»	$9 \cdot 10^{-9} - 9 \cdot 10^{-4}$	27
	Pb ²⁺	»	$5 \cdot 10^{-9} - 5 \cdot 10^{-4}$	27
	Mg ²⁺	»	$4 \cdot 10^{-8} - 4 \cdot 10^{-5}$	27
	Mg ²⁺	»	$4 \cdot 10^{-8} - 4 \cdot 10^{-5}$	27
	Mg ²⁺	Активатор	$4 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-3}$	27

^a $c_{эфф}$ — область концентраций, при которой наблюдается эффект.

изменения ферментативной активности, что, естественно, затрудняет сопоставительный анализ приводимых экспериментальных данных. Лишь немногие пытаются количественно оценить эффекты, оказываемые ионами металлов, и объяснить механизм их влияния. Именно этим работам и

было уделено наибольшее внимание при изложении приведенного выше материала.

III. Изменение каталитической активности ферментов в присутствии ионов металлов: аналитический аспект

Долгое время исследователи лишь отмечали влияние ионов металлов на каталитическую активность ферментов, но эти эффекты не находили практического использования. По мере накопления результатов стало возможным аналитическое применение данных эффектов. Работы в этой области за период с 1949 по 1979 г. были обобщены в обзоре.⁶¹

Одной из первых отечественных работ, посвященных использованию действия металлов на ферменты в аналитических целях, была работа И.Ф.Долмановой с соавт.²⁸, в которой предложен высокоселективный способ определения ртути, основанный на ее ингибирующем влиянии на пероксидазу хрена (предел обнаружения $(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$ мкг · мл⁻¹). Дальнейшие исследования в этой области были направлены на использование различных субстратов и оптимизацию условий протекания ферментативных реакций. Это позволило понизить предел обнаружения до $3.0 \cdot 10^{-7}$ мкг · мл⁻¹ (см.²⁹). Определению мешают ионы висмута и кадмия. Предложена методика³⁰ определения ртути (нижняя граница определяемых концентраций — $1 \cdot 10^{-5}$ мкг · мл⁻¹), отличающаяся от традиционных меньшим временем проведения анализа (30 мин вместо 4 ч) и возможностью определения ртути в присутствии относительно больших (≥ 1 мкг · мл⁻¹) количеств Fe³⁺. Железо маскирует винной кислотой, которая в условиях проведения эксперимента и в подобранных концентрациях не влияет на каталитическую активность пероксидазы. Определение ртути в природной воде проводят методом добавок, который позволяет учесть влияние остальных компонентов матрицы, в частности Fe³⁺, без маскирования.

Ингибирующее действие Bi³⁺ на каталитическую активность пероксидазы хрена положено в основу кинетического метода его определения. Нижняя граница определяемых концентраций висмута составляет $2 \cdot 10^{-4}$ мкг · мл⁻¹. Определению висмута не мешают 1000-кратные количества Са, Mg, Zn, Ni, Al; 100-кратные — Pb и Ag и 10-кратные — Cd. Мешает наличие соизмеримых количеств Hg²⁺ (см.^{31, 62}).

Описан высокочувствительный ($c_{\min} = 8 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-4}$ мкг · мл⁻¹) и селективный ферментативный метод²⁴ определения РЗЭ, основанный на их ингибирующем влиянии на каталитическую активность пироглутатаминатазы из пекарских дрожжей и *E. coli*. Мешающее влияние ионов Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ устраняли введением в индикаторную реакцию избыточных количеств магния. Введение в систему $5 \cdot 10^{-3}$ моль · л⁻¹ магния в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ мкг · мл⁻¹ празеодима и $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$ мкг · мл⁻¹ Mn, Co, Ni устраняет их мешающее влияние. Отметим, что такая концентрация магния не влияет на ингибирующее действие празеодима. Мешающее влияние ионов кальция устраняли маскированием его с помощью тартрата.

Высокая чувствительность ферментативных методов позволяет определять многие компоненты вод различного происхождения на уровне ПДК из малых проб без предварительного концентрирования. Например, ионы таких металлов, как Cu, Co, Ni, Fe, Mn, Cr, Hg, Cd, Bi, Pb, Zn, можно определять при концентрациях $1 - 100$ пг · мл⁻¹ по их ингибирующему влиянию на пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу.⁶³

Ферментативные методы предложено использовать для изучения образования гидрокомплексов. В работе²⁰ рассчитаны константы устойчивости гидрокомплексов $K_{\text{мон}}$ для цинка, меди, железа, кобальта, никеля. Метод анализа с использованием ферментов дает возможность с высокой чувствительностью и избирательностью, недоста-

жимыми для большинства других методов, определять равновесные концентрации гидроксид-ионов и ионов некоторых *d*-элементов в сложных гетерогенных системах, а также изучать гидролиз солей металлов.³⁴

Использование нативных ферментов при проведении обсуждаемых аналитических определений имеет ряд недостатков: неустойчивость ферментов при хранении и различных воздействиях, в частности тепловых, невозможность отделения ферментов от реагентов и продуктов реакции. В настоящее время для этих целей широко используются иммобилизованные ферменты. Иммобилизация позволяет увеличить стабильность фермента при длительном хранении и повышает его устойчивость к внешним воздействиям. Возможность многократного использования иммобилизованного ферментного препарата существенно снижает стоимость анализа.

Применению иммобилизованных ферментов для определения ионов металлов посвящен обзор.⁶⁴ Для иммобилизации ферментов, как правило, используют включение их в различные пленки или связывание на стеклянных шариках. В последнее время полимерные пленки с включенными в них ферментами часто применяют в качестве мембран в биохимических сенсорах.

Так, на основе ХЭ, иммобилизованной включением в пленки из нитрата целлюлозы, создан амперометрический биохимический сенсор для определения ионов металлов.^{36–38} На основе ингибирующего действия ионов тяжелых металлов на каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы разработана³⁸ методика определения Cr^{3+} , Ti^{4+} , Zr^{4+} , Hf^{4+} в концентрациях $1 \cdot 10^{-10}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ моль $\cdot$ л⁻¹.

В работе⁶⁵ предложено определять катионы Cu^{2+} с помощью ферментативного электрода на основе глюкозооксидазы по их ингибирующему действию на фермент в интервале концентраций $2.5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-3}$ моль $\cdot$ л⁻¹.

В последнее время все большее значение приобретают полуколичественные тест-методы, позволяющие быстро, просто и достаточно надежно определять содержание токсичных веществ на уровне ПДК. При разработке таких методов также перспективно использование иммобилизованных ферментов.

Описан⁶⁶ тест-метод определения Hg^{2+} с использованием пероксидазы, иммобилизованной переводением ее в твердый раствор в хитозане. Определение ртути основано на ее ингибирующем действии на иммобилизованную пероксидазу в реакции окисления *o*-дианизидина, *o*-фенилендиамина и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода в присутствии тиомочевины. Изменение окраски реакционного раствора в результате образования красных либо оранжевых продуктов ферментативного окисления позволяет следить за скоростью процесса визуально. Нижняя граница концентраций ртути, определяемых указанными реакциями, составляет $1 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-7}$ мкг $\cdot$ мл⁻¹ соответственно. Метод характеризуется селективностью (определению ртути мешают лишь 10^5 -кратные избытки кадмия и висмута), быстротой (анализ продолжается не более 15 мин), простотой и невысокой стоимостью.

Ферментативные методы определения ионов металлов отличаются высокой чувствительностью и в отдельных случаях высокой селективностью.²⁷ Однако в большинстве случаев селективности недостаточно. Комбинация высокой чувствительности биохимических сенсоров на основе иммобилизованных ферментов с традиционными способами маскирования позволяет решать сложные аналитические задачи. Таким образом, ферменты выступают как аналитические реагенты нового поколения. Использование биосенсоров для определения ионов металлов перспективно еще и потому, что в этом случае реализуются условия, моделирующие отдельные функции живого организма. Разработка новых средств измерения, в том числе биосенсоров, тем более основанных на высокочувствительных методах реги-

страции, значительно расширяет возможности оценки влияния ионов металлов на каталитическую активность ферментов. Можно предположить, что во многих случаях лишь ограниченные возможности регистрирующих систем не позволили пока найти концентрационный интервал ингибирования или активации для определенной пары металл–фермент. Кроме того, при проведении конкретных определений необходимо учитывать ионный состав среды и буферных растворов для каждого используемого фермента. Следует подбирать буферные растворы с ионным составом, обеспечивающим максимальную каталитическую активность фермента. Это создает условия для получения максимального аналитического сигнала, что, в свою очередь, расширяет аналитические возможности ферментативного определения эффекторов различной природы, в том числе и ионов металлов.^{37, 57}

IV. Заключение

Проведенный анализ литературных данных показывает, что вопросы влияния ионов металлов на каталитическую активность ферментов продолжают оставаться в поле зрения исследователей. В то же время можно отметить некоторые специфические особенности работ в данной области, появившихся в последнее время. В частности, в 60–70-е годы действие металлов рассматривалось преимущественно с биологической или медицинской точек зрения,¹³ в то время как в 90-х годах произошло смещение интереса к химической стороне обсуждаемых вопросов. Это связано, во-первых, с загрязненностью биосферы различными металлами выше допустимых уровней, во-вторых, с возможностью оценки содержания ионов металлов с помощью ферментсодержащих препаратов с большой чувствительностью, а в отдельных случаях и селективностью. Можно выделить два основных направления в этих исследованиях: количественное определение ингибиторов или активаторов по величине наблюдаемого эффекта и применение активирующего эффекта ионов металлов для повышения чувствительности определений широкого круга соединений другой природы.

Анализ литературных данных показывает, что трудно *a priori* предсказать, как будет действовать тот или иной металл на данный фермент. Это зависит не только от природы металла и фермента, но и других конкретных условий, главными из которых являются радиус металла и его концентрация. Нельзя также рассматривать взаимодействие ионов металлов с ферментом без учета величины pH раствора, наличия или отсутствия субстрата. Говорить об активирующем или ингибирующем влиянии металлов можно, учитывая лишь все эти факторы.

К сожалению, в настоящее время большинство авторов ограничивается качественным описанием действия ионов металлов на каталитическую активность ферментов, в то время как количественной оценке и изучению механизма взаимодействия металлов и ферментов посвящены единичные работы. Однако можно предположить, что количество таких работ будет возрастать по мере развития высокочувствительных методов регистрации.

Литература

1. Г.Эйхгорн. *Неорганическая биохимия*. Мир, Москва, 1978
2. M.Cohn, J.S.Leigh. *Nature (London)*, **193**, 1037 (1962)
3. W.J.O.Sullivan, M.Cohn. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3104 (1966)
4. W.J.O.Sullivan, R.Virden, S.Blethen. *Eur. J. Biochem.*, **8**, 562 (1969)
5. W.J.O.Sullivan, L.Noda. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1424 (1968)
6. R.H.Himes, M.Cohn. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3628 (1967)
7. A.S.Mildan, J.S.Leigh, M.Cohn. *Biochemistry*, **6**, 1805 (1967)
8. W.N.Lipscomb, J.A.Hartsuck, G.N.Rieke, F.A.Quiocho, L.P.Noda, W.W.Cleland. *Brookhaven. Symp. Biol.*, **21**, 24 (1968)
9. M.Riepe, J.H.Wang. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2778 (1968)

10. E.R.Stadtman, B.M.Shapiro, H.S.Kingdon, C.A.Woolfolk, J.S.Hubbard. *Adv. Enzymol. Regulation*, **6**, 257 (1968)
11. J.F.Kachmar, P.D.Boyer. *J. Biol. Chem.*, **200**, 669 (1953)
12. H.T.Evans, G.J.Sorger. *Rev. Plant. Physiol.*, **17**, 47 (1966)
13. Х.Зигель, А.Зигель. *Некоторые вопросы токсичности ионов металлов*. Мир, Москва, 1993
14. Л.Н.Николаев. *Металлы в живых организмах*. Просвещение, Москва, 1986
15. K.P.Nau, P.C.L.Wong, W.F.Fong. *Biochem. Int.*, **28**, 169 (1992)
16. В.И.Крупяно. *Биохимия*, **53**, 905 (1988)
17. А.А.Глемжа, В.Б.Ковзан, Д.Ю.Юодвальните. *Биохимия*, **49**, 2045 (1984)
18. Т.А.Черкасова, Ю.А.Лейкин, В.Е.Вонский, М.М.Деева. В кн. *Аналитическая химия объектов окружающей среды*, (Тез. докл.). С.Петербург – Сочи, 1991. С.200
19. Т.А.Cherkasova, V.A.Koschug, Yu.A.Leikin. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry. (Abstracts of Reports)*. Moscow, 1995. P.54
20. Е.Б.Никольская. *Докл. АН СССР*, **258**, 682 (1981)
21. В.В.Рощина. *Биомедиаторы в растениях. Ацетилхолин и био-генные амины*. Пуццо, 1991
22. K.Vackova, M.Kutucak, R.M. de Almeida. *Biol. Plant.*, **26**, 275 (1984)
23. Н.Г.Гиммельрейх. *Биохимия*, **40**, 1047 (1975)
24. Т.Н.Шеховцова, С.В.Пирогова, И.Ф.Долманова, А.А.Байков. *Журн. анал. химии*, **48**, 518 (1993)
25. С.А.Агаджанян, Л.В.Карабашян. *Биохимия*, **47**, 1022 (1982)
26. Т.М.Заалишвили, Н.Ш.Джапаридзе, Д.И.Сабелашвили, Р.Д.Мичиллашвили. *Биохимия*, **55**, 659 (1990)
27. Т.Н.Шеховцова, В.В.Кучеряева, И.Ф.Долманова. *Журн. анал. химии*, **40**, 1810 (1985)
28. И.Ф.Долманова, Е.В.Ершова, В.Ю.Надь, Т.Н.Шеховцова. *Журн. анал. химии*, **34**, 1644 (1979)
29. И.Ф.Долманова, Т.Н.Шеховцова, Н.Н.Стародумова. *Журн. анал. химии*, **42**, 1824 (1987)
30. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая, И.Ф.Долманова. *Журн. анал. химии*, **50**, 309 (1995)
31. И.Ф.Долманова, И.М.Попова, Н.Н.Угарова, Т.Н.Шеховцова. *Журн. анал. химии*, **36**, 1347 (1981)
32. В.А.Труфанов, С.В.Кичатинова, В.Р.Шатилов, В.Л.Кретович. *Прикл. биохимия и микробиология*, **26**, 3 (1990)
33. Е.Б.Никольская. *Журн. анал. химии*, **38**, 5 (1983)
34. А.Я.Розанов. *Механизмы регуляции биокатализа*. Выща школа, Киев, 1989
35. М.С.Генин, Ю.Ф.Романов, В.С.Андреев. *Биохимия*, **37**, 732 (1972)
36. Г.К.Будников, Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, А.В.Волков. *Журн. анал. химии*, **44**, 2253 (1989)
37. Э.П.Медянцева, Г.К.Будников, С.С.Бабкина. *Журн. анал. химии*, **45**, 1386 (1990)
38. Э.П.Медянцева, Г.К.Будников, Ли Фа-Шень. В кн. *Химический анализ пищевых продуктов и загрязнений окружающей среды*. ЦРДЗ, Москва, 1992. С.44
39. В.З.Горкин. В кн. *Ферменты*. Наука, Москва, 1964. С.192
40. М.Диксон, Э.Уэбб. *Ферменты*. Мир, Москва, 1982
41. Ю.Ю.Кулис. *Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов*. Мокслас, Вильнюс, 1981
42. В кн. *Иммобилизованные ферменты: Современное состояние и перспективы*. Т.1. (Под ред. И.В.Березина, В.К.Антонова, К.Мартиника). Изд-во МГУ, Москва, 1976
43. M.S.Wernette, R.S.Ochs, H.A.Lardy. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12767 (1981)
44. Е.П.Четверикова, Л.Л.Алиевская, А.В.Кринская. *Биохимия*, **36**, 717 (1971)
45. Т.Т.Таран, С.А.Костерин. *Вопр. мед. химии*, **39**, 26 (1993)
46. Б.П.Никольский, А.Б.Валиотти, Е.Б.Никольская. *Докл. АН СССР*, **225**, 1206 (1975)
47. К.Е.Дорохов, Г.Л.Григорян, Р.И.Жданова. В кн. *Биомакромолекулы в методе спиновых меток и зондов*. Наука, Москва, 1988. С.18
48. К.Е.Дорохов, Г.Л.Григорян. *Биофизика*, **31**, 746 (1986)
49. J.C.Lee, J.A.Harst. *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 55 (1971)
50. А.И.Крашенюк, С.С.Михайлов, В.И.Розенгарт. *Укр. биохим. журн.*, **46**, 586 (1974)
51. L.M.Chan, C.H.Himmel, A.R.Main. *Biochemistry*, **13**, 86 (1974)
52. Э.П.Медянцева. В кн. *Тез. докл. Всерос. конф. по электрохимическим методам анализа*. Москва, 1994. С.20
53. А.с. 1822971 СССР; *Бюл. изобрет.*, (23), 53 (1993)
54. Э.П.Медянцева, М.Г.Вертлиб, Г.К.Будников, В.Б.Иванов. В кн. *Тез. докл. XV Черняевского совещания по химии, анализу и технологии платиновых металлов*. Гиналмаззолото, Москва, 1993. С.198
55. М.Г.Вертлиб, Г.Ф.Фахертдинова, В.Б.Иванов. В кн. *Тез. докл. Всерос. конф. по электрохимическим методам анализа*. Москва, 1994. С.110
56. Э.П.Медянцева, М.Г.Вертлиб, Г.К.Будников, Е.Б.Никольская. *Журн. анал. химии*, **49**, 1220 (1994)
57. А.В.Ананьев, И.В.Улезло, А.М.Егоров, А.А.Резчиков, А.М.Безбородов. *Биохимия*, **48**, 111 (1983)
58. M.G.Vertlib, E.P.Medyantseva, M.P.Tyshlek, H.C.Budnikov. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry. (Abstracts of Reports)*. Moscow, 1995. P.52
59. T.Kesvaters, A.Aaviksaas, E.Pechema, J.Järv. *Bioorg. Chem.*, **16**, 429 (1988)
60. Л.П.Кузнецова, Е.Б.Никольская. *Укр. биохим. журн.*, **60**, 35 (1988)
61. И.Ф.Долманова, Н.Н.Угарова. *Журн. анал. химии*, **35**, 1597 (1980)
62. T.N.Shekhovtsova, S.V.Chernetskaya. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry. (Abstracts of Reports)*. Moscow, 1995. P.48
63. И.Ф.Долманова, Г.А.Золотова, Т.Н.Шеховцова. В кн. *Тез. докл. XV Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*. Наука і техника, Минск, 1993. С.332
64. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая, Н.В.Белкова, И.Ф.Долманова. *Журн. анал. химии*, **49**, 789 (1994)
65. A.M.Donlan, G.J.Moody, J.D.R.Thomas. *Anal. Lett.*, **22**, 1837 (1989)
66. Т.Н.Шеховцова, С.В.Чернецкая, Е.Б.Никольская, И.Ф.Долманова. *Журн. анал. химии*, **49**, 862 (1994)

METAL IONS AS EFFECTORS OF ENZYMES

E.P.Medyantseva, M.G.Vertlib, G.K.Budnikov

Kazan' State University

18, ul. Lenina, 420008 Kazan', Russian Federation, Fax +7(843)238-0994

Effects of metal ions as modulators of enzymes are considered. Data on inhibition and activation by metal ions are reviewed. Dual action of modulators depending on enzyme nature and effector concentration are noted. Analytical application of metal ions effects is discussed.

Bibliography — 66 references.

Received 4th August 1997