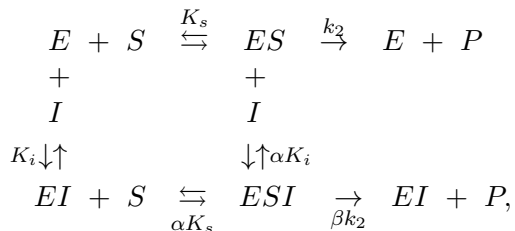


С. О. Карахім, член-кореспондент НАН України С. О. Костерін,
П. Ф. Жук

Новий спосіб оцінки впливу оборотних інгібіторів на ензиматичний процес

Для порівняння дії оборотних інгібіторів на ензиматичні реакції, в яких утворюється комплекс ензим – інгібітор – субстрат, що здатний до розпаду з виділенням продукту реакції, запропоновано використовувати константу інгібуючої дії (Q_I), яка не залежить від концентрації субстрату та інгібітора в середовищі інкубації, а також від константи дисоціації ензим-субстратного комплексу (K_s). Q_I включає в себе тільки ті параметри, які визначаються інгібітором – коефіцієнти модифікації α й β , та константу інгібування (K_i).

Оборотні інгібітори широко застосовуються в біохімії й біофізиці для дослідження механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту, лігандорецепторної взаємодії та регулювання активності ензиматичних і транспортних білків. При вивченні цих процесів кількісну оцінку ефективності дії інгібітора часто виражають через коефіцієнт інгібування (I_{50}), значення якого відповідає концентрації інгібітора, при якій досягається зниження початкової швидкості досліджуваного процесу (v_0^i) на 50% відносно початкової швидкості неінгібованої реакції (v_0) [1–5]. Іноді вважають, що I_{50} є показником спорідненості оборотного інгібітора (I) до ензиматичного або транспортного білка E , а тому, беручи за основу цей параметр, можна порівнювати дію різних оборотних інгібіторів на досліджувані ензиматичні або транспортні системи. Узагальнений механізм дії I на ензим E (транспортний білок) ілюструє така схема [4, 6]:



де S – субстрат ензиматичного або транспортного процесу; K_s й K_i – субстратна й інгібіторна константи відповідно; α й β – термодинамічний й кінетичний коефіцієнти модифікації відповідно; k_2 – число обертів; P – продукт реакції.

Проте на прикладі універсальної кінетичної схеми впливу I на ензим E (транспортну систему) було показано, що в загальному випадку I_{50} не є мірою спорідненості інгібітора до білка [4–6], оскільки він, як правило (за винятком випадку повністю неконкурентного інгібування, що видно з табл. 1), не дорівнює константі інгібування, яка тільки може бути показником спорідненості. Залежність від загальної концентрації субстрату (S_0) у середовищі інкубації є величезним недоліком коефіцієнта інгібування, що не дозволяє порівнювати результати, які отримані різними дослідниками при вивченні дії інгібіторів на досліджувану ензиматичну реакцію, якщо вони працювали з різними концентраціями субстрату в середовищі інкубації.

У ході роботи нами досліджено кількісні аспекти процесу титрування ензиму E оборотним інгібітором, що проводиться з метою визначення I_{50} , для того щоб, не збільшуючи об'єм експериментальних досліджень, визначити такий параметр, який би не залежав від S_0 у середовищі інкубації, адекватно відображав інгібуючу дію і тому був би більш об'єктивним при порівнянні ефективності дії оборотних інгібіторів на досліджувану ензиматичну систему, ніж I_{50} .

Аналіз універсальної кінетичної схеми впливу оборотного інгібітора на ензим E , проведений у рівноважному наближенні, показує, що є можливість отримати деяку нову додаткову інформацію про досліджувану ензиматичну реакцію. Отже, брали до уваги не тільки коефіцієнт інгібування, але також і початкові швидкості реакції при досліджуваних концентраціях інгібітора (I_0). Для цього потрібно побудувати графік залежності $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]$ від I_0 , який дає пряму лінію: вона може бути або паралельною осі абсцис, або проходити під певним кутом нахилу до неї (табл. 2).

Якщо отримана пряма є паралельною осі абсцис, то це означає, що механізм дії інгібітора на досліджувану ензиматичну реакцію полягає в тому, що утворюється неактивний ензим-інгібітор-субстратний комплекс (або він взагалі не утворюється, як у випадку повного конкурентного інгібування), який не розпадається з утворенням продукту (продукт утворюється тільки внаслідок розпаду ензим-субстратного комплексу), тобто для дослід-

Таблиця 1. Рівняння для початкової швидкості інгібованої ензиматичної реакції та коефіцієнта інгібування для різних механізмів оборотного інгібування

Тип інгібування та значення коефіцієнтів модифікації	Рівняння для v_0^i	Рівняння для I_{50}
1. Повністю конкурентний, $\alpha = \infty, \beta$ — не визн.	$v_0^i = \frac{K_i k_2 E_0 S_0}{K_s K_i + K_i S_0 + K_s I_0}$	$I_{50} = \frac{K_i (K_s + S_0)}{K_s}$
2. Неповністю конкурентний, $\alpha > 1, \beta < 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha - 2\beta) K_s + (1 - 2\beta) S_0}$
3. Частково конкурентний, $\alpha > 1, \beta = 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha - 2) K_s - S_0}$
4. Конкурентно-неконкурентний, $\alpha > 1, \beta = 0$	$v_0^i = \frac{\alpha K_i k_2 E_0 S_0}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{\alpha K_s + S_0}$
5. Повністю неконкурентний, $\alpha = 1, \beta = 0$	$v_0^i = \frac{K_i k_2 E_0 S_0}{(K_s + S_0)(K_i + I_0)}$	$I_{50} = K_i$
6. Неповністю неконкурентний, $\alpha = 1, \beta < 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (K_i + \beta I_0)}{(K_s + S_0)(K_i + I_0)}$	$I_{50} = \frac{K_i}{(1 - 2\beta)}$
7. Повністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 0, \alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{\alpha K_i k_2 E_0 S_0}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0}$
8. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta < 1, \alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0 - 2\beta (K_s + S_0)}$
9. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 1, \alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0 - 2(K_s + S_0)}$

жуваного механізму інгібування коефіцієнт модифікації (β) (див. схему) дорівнює нулеві (повне або лінійне інгібування [7–9]). Для таких механізмів (див. **1, 4, 5, 7** у табл. 2) величина $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]$ точно дорівнює величині I_{50} , чим можна послуговуватися для ідентифікації цих механізмів.

Інші механізми інгібування (див. **2, 3, 6, 8, 9** у табл. 2) з активним ензим-інгібітор-субстратним комплексом (часткове або гіперболічне інгібування [8, 9]) дають пряму, що має певний кут нахилу до осі абсцис. Ця пряма перетинає вісь абсцис у точці $I_0 = -\alpha K_i / \beta$. Це значення можна отримати, розділивши величину відрізка, який пряма відсікає на осі ординат (Y), на величину тангенса кута нахилу прямої ($\text{tg } \alpha$). Розрахована величина залежить тільки від коефіцієнтів модифікації та константи інгібування, а тому і сама є константою для досліджуваної ензиматичної реакції. Вона може бути названа константою інгібуючої дії Q_I (розмірність — концентраційна):

$$Q_I = \frac{Y}{\text{tg } \alpha} = \frac{\alpha K_i}{\beta}.$$

Фактично Q_I включає в себе саме ті (і тільки ті) параметри, які визначаються інгібітором. Вона не залежить ні від K_s , ні від S_0 у середовищі інкубації (на відміну від I_{50}), і може використовуватися для порівняння даних, отриманих різними дослідниками при вивченні

Таблиця 2. Ідентифікація механізмів оборотного інгібування з активним та неактивним ензим-інгібітор-субстратним комплексом методом лінеаризації експериментальних даних у координатах $\{[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]; I_0\}$

Тип інгібування та значення коефіцієнтів модифікації	Лінеаризація у координатах $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)] - I_0$	Значення Q_I	Відповідність I_{50} та $v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)$
1. Повністю конкурентний, $\alpha = \infty, \beta$ — не визн.	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{K_i(K_s + S_0)}{K_s}$	—	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
2. Неповністю конкурентний, $\alpha > 1, \beta < 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i(K_s + S_0) + (K_s + S_0)\beta I_0}{K_s(\alpha - \beta) + S_0(1 - \beta)}$	$Q_I = \frac{\alpha K_i}{\beta}$	—
3. Частково конкурентний, $\alpha > 1, \beta = 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(K_s + S_0)(\alpha K_i + I_0)}{K_s(\alpha - 1)}$	$Q_I = \alpha K_i$	—
4. Конкурентно-неконкурентний, $\alpha > 1, \beta = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i(K_s + S_0)}{\alpha K_s + S_0}$	—	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
5. Повністю неконкурентний, $\alpha = 1, \beta = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = K_i$	—	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
6. Неповністю неконкурентний, $\alpha = 1, \beta < 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{K_i + \beta I_0}{(1 - \beta)}$	$Q_I = \frac{K_i}{\beta}$	—
7. Повністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 0, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i(K_s + S_0)}{S_0}$	—	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
8. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta < 1, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(\alpha K_i + \beta I_0)(K_s + S_0)}{S_0 - \beta(K_s + S_0)}$	$Q_I = \frac{\alpha K_i}{\beta}$	—
9. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 1, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(\alpha K_i + I_0)(K_s + S_0)}{-K_s}$	$Q_I = \alpha K_i$	—

процесів інгібування однієї й тієї самої ензиматичної реакції певним інгібітором при різних концентраціях субстрату. Константа інгібуючої дії може бути корисною при порівнянні даних, отриманих при титруванні досліджуваного білка певним інгібітором у присутності субстратів-аналогів. Такий підхід дозволяє оцінити співвідношення α/β , оскільки Q_I не залежить від K_s , а K_i при цьому залишається незмінною.

У загальному випадку за допомогою константи інгібуючої дії можна порівнювати дію різних інгібіторів на різні ензиматичні реакції (що відбуваються за механізмами **2, 3, 6, 8, 9** з табл. 2): при цьому слід просто пам'ятати, що Q_I змінюється пропорційно αK_i і обернено пропорційно β .

Таким чином, для всіх можливих механізмів інгібування з активним ензим-інгібітор-субстратним комплексом (див. механізми **2, 3, 6, 8, 9** з табл. 2) параметр Q_I визначається за однаковою методикою. Для механізмів інгібування, в яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс залишається неактивним ($\beta = 0$), неможливо визначити параметр Q_I , оскільки значення $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]$ виявляється незалежним від I_0 . Але в цих випадках значення $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]$ повністю ідентичне I_{50} . Практично факт незалежності $[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]$ від концентрації інгібітора і збігу його з I_{50} є критерієм визначення механізмів інгібування з неактивним ензим-інгібітор-субстратним комплексом. Як видно з даних табл. 1 і 2, для механізмів інгібування, що характеризуються $\beta = 0$, фактично I_{50} визначається рівнянням:

$$I_{50} = \alpha K_i \frac{K_s + S_0}{\alpha K_s + S_0}$$

з урахуванням відповідних змін у значенні коефіцієнта модифікації α залежно від механізму інгібування.

З табл. 2 видно, що для механізмів, в яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс не здатен розпадатись з утворенням продукту (або зовсім не утворюється), пряма у координатах $\{[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]; I_0\}$ є паралельною осі абсцис і відсікає на осі ординат відрізок, який чисельно дорівнює коефіцієнту інгібування $Y = I_{50}$. Для механізмів, у яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс розпадається з утворенням продукту, пряма у координатах $\{[v_0^i I_0 / (v_0 - v_0^i)]; I_0\}$ нахилиється відносно осі абсцис і точка перетину прямої та осі ординат внаслідок цього зміщується трохи вниз, в результаті чого відрізок, що відсікається на осі ординат Y , перестає бути таким, який чисельно дорівнює I_{50} . Константа інгібуючої дії якраз і відображає ступінь відхилення Y від I_{50} :

$$\frac{1}{Y} - \frac{1}{I_{50}} = \frac{1}{Q_I} = \frac{\beta}{\alpha K_i}.$$

З даного рівняння видно, що для механізмів з $\beta = 0$ справджується рівність $Y = I_{50}$ і для них неможливо розрахувати параметр Q_I .

Можна також показати, що Q_I відповідає такій концентрації інгібітора, яка дозволяє зменшити початкову швидкість інгібованої реакції v_0^i у n разів відносно початкової швидкості неінгібованої реакції v_0 , і значення n визначається рівнянням:

$$n = 0,5 + \frac{\alpha K_s + S_0}{2\beta(K_s + S_0)}.$$

Можна застосувати ще один метод визначення коефіцієнта інгібування (для механізмів повного інгібування) та константи інгібуючої дії (для механізмів часткового інгібування).

Якщо взяти певну концентрацію інгібітора за базову I_0^b (а відповідну початкову швидкість позначити v_0^b) і всі подальші концентрації інгібітора подати у вигляді $I_0 = I_0^b + dI$ (з відповідними початковими швидкостями v_0^i), то можна показати, що залежність $[v_0^i/(v_0^b - v_0^i)]$ від $1/dI$ буде прямою, яка проходить через початок системи координат (для механізмів повного інгібування) або перетинає вісь абсцис у точці $dI = -1/(Q_I + I_0^b)$ (для механізмів часткового інгібування). Q_I може бути розрахована з цього співвідношення або зі співвідношення тангенса кута нахилу прямої $\text{tg } \alpha$ та відрізка, що відсікається прямою на осі ординат Y :

$$(\text{tg } \alpha/Y) = Q_I + I_0^b.$$

Відповідно, для механізмів повного інгібування з величини тангенса кута нахилу прямої $\text{tg } \alpha = I_{50} + I_0^b$ можна визначити значення I_{50} .

Проведення титрування білків оборотним інгібітором при різних концентраціях субстрату в середовищі інкубації може дозволити ідентифікувати механізм, за яким відбувається інгібування, та визначити значення індивідуальних кінетичних констант, якщо проводити обробку експериментальних даних способами, описаними в літературі (наприклад, у [3, 5, 7–9]).

1. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. – Москва: Наука, 1965. – 248 с.
2. Петушкова Е. В. Введение в кинетику ферментативных реакций. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1972. – 200 с.
3. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – Москва: Мир, 1990. – 352 с.
4. Березин И. В., Клесов И. В. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 320 с.
5. Cortes A., Cascante M., Cardenas M., Cornish-Bowden A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data // Biochem. J. – 2001. – **357**. – P. 263–268.
6. Костерин С. О. Коефіцієнт інгібування I_{50} та його використання у фізико-хімічній біології // Укр. біохім. журн. – 1999. – **71**, № 2. – С. 100–103.
7. Bravo I. G., Busto F., De Arriaga D. et al. Application of a normalised plot to the study of uni-uni enzyme-inhibitor systems // Biochim. et Biophys. Acta. – 2002. – **1571**. – P. 183–189.
8. Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised ed. by A. Cornish-Bowden. – London: Portland Press, 2002. – 344 p.
9. Yoshino M. A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors // Biochem. J. – 1987. – **248**. – P. 815–820.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 10.02.2010

S. O. Karakhim, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **S. O. Kosterin**,
P. F. Zhuk

A new method of evaluation of the influence of reversible inhibitors on an enzymatic process

It is proposed to use the constant of inhibitory effect Q_I for the comparison of reversible inhibitor actions on enzymatic reactions with a productive enzyme-inhibitor-substrate complex. This constant does not depend on the substrate dissociation constant and the inhibitor and substrate concentrations, but it involves only parameters which are defined by the inhibitor: modification coefficients α and β and inhibition constant K_i .