

## ВЫБОР МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ЛОКАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ

Григорьян А.Л.<sup>1</sup>, Золотавина М.Л.<sup>2</sup>

Кубанский государственный университет

ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ; e-mail: <sup>1</sup>ms.bucky@mail.ru, <sup>2</sup>zolotavina\_m@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2020

**Аннотация.** В работе приведен обзор методов определения активности ферментов шести классов с учетом их локализации в клетке. В ходе исследования была определена субклеточная локализация ферментов разных классов и выявлено, что большая их часть сосредоточена в цитоплазме и на клеточной мембране, т.к. им присущ широкий спектр функций. Наименьшее число ферментов расположено на рибосомах и в ядерном экстракте, что связано с их специфическими действиями в клетке. Нами были проанализированы методы определения активности ферментов, которые разделены на часто и редко применяемые в клинической биохимии. Такое разделение обосновано основными характеристиками методов и главным критерием – эффективностью полученного результата. В первую группу включены методы спектрального анализа (спектрофотометрия, фотометрия и т.п.) и колориметрии (на основе цветных реакций). Во вторую группу входят методы поляриметрии, ядерно-магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа и т.п.

**Ключевые слова:** клеточная мембрана, цитоплазма, митохондрии, лизосомы, рибосомы, ядро, УФ-кинетический метод, спектрофотометрия, метод ЯМР, метод ЭПР, электрохимические методы, колориметрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Процесс катализа представляет собой явление, в ходе которого изменяется скорость химического взаимодействия под влиянием ферментов – белков, выполняющих роль биологических катализаторов. Действие ферментов обусловлено изменением энергетики химических реакций, т.е. их тепловым выходом. С другой стороны, этот механизм неразрывно связан с активным центром и процессами в нем. Детектирование этих процессов возможно методами клинической биохимии. Различные группы методов позволяют изучать скорость химических реакций и определять высоту энергетического барьера, отслеживать процесс связывания субстратов с активными центрами ферментов и т. д.

Методы определения активности ферментов внедрены в медицинскую практику давно. Изучение активности ферментов дает представление о биохимических процессах на клеточном уровне [4, 13] и позволяет определить в динамике образование адаптивных ферментов и наблюдать за конститутивными ферментами.

При выборе метода исследования, как инструмента для достижения цели необходимо учитывать ряд показателей, которые могут влиять на результат и проведение опыта или эксперимента. Основными показателями в выборе предпочтения метода являются: точность, скорость анализа, область применения, качество и эффективность, способы детектирования результата и др. [8]. Изменение каталитической эффективности ферментов реализуется различными механизмами, на которые дают ответ другие компоненты клетки, поэтому одной из задач любого исследования является оценка эффективности метода, которая заключается в точном определении активности конкретного фермента и проведении параллели между его концентрацией и клиническими проявлениями нарушений метаболизма.

Практическая значимость метода состоит в получении точного результата и его верного истолкования. Научной значимостью метода выступает его модернизация, разработка на его основе новейших способов определения активности и их внедрение в медицинскую и клиничко-биологическую практику [8].

Для определения активности ферментов используют различные группы методов: электрохимические (потенциометрия, вольтамперметрия), свето-эмиссионные (спектрофотометрия, поляриметрия, фотометрия), спектроскопические (ядерно-магнитный резонанс, электронно-парамагнитный резонанс), химические (реакции окрашивания, осаждения), агглютинационные (радиоиммунологические, связывание с лигандами), ДНК-методы (метод ПЛР, метод ПДРФ) и др. Использование методов определяется их качественными характеристиками, упомянутыми ранее, и свойствами классов ферментов (функция и локализация).

Принятая Международным союзом биохимии и молекулярной биологии в 1961 году классификация разделяет шесть классов ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Каждый класс ответственен за определенный тип катализируемой реакции [1, 13]. Ниже представлен перечень химических реакций и классы ферментов, благодаря деятельности которых они и осуществляются.

Окислительно-восстановительные реакции реализуются с помощью класса Оксидоредуктаз. Они действуют на различные группы (-СН-ОН, СН-NH<sub>2</sub> и др.). К ним относят каталазу, пероксидазу, дегидрогеназы, оксигеназы и т.д.

Перенос функциональных групп осуществляется ферментами класса Трансфераз. Они катализируют процесс переноса отдельных групп между молекулами. Например, трансминазы, метилтрансферазы и т.д.

Гидролитические реакции выполняются благодаря работе ферментов класса Гидролаз. К ним относят все

пищеварительные ферменты: пепсин, трипсин, амилаза и др.

Реакции присоединения по месту двойных связей с образованием воды реализуются классом Лиаз, при этом такие ферменты не действуют на макроэргические соединения. Например, фумараза, аденилатциклаза.

Взаимопревращения оптических и геометрических изомеров регулируются ферментами класса Изомераз. Они изменяют структуру молекулы, сохраняя и ее свойства, и собственные. К ним относят фосфоглюкоизомеразу.

Ферменты, действующие на макроэргические молекулы, работают с использованием энергии АТФ и действуют по принципу слияния молекул с образованием ковалентной связи – класс Лигаз: ДНК-лигаза, цитрантсинтаза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – определение активности ферментов шести классов в органоидах клетки.

Данные для исследования были собраны благодаря накопленным знаниям, актуальным литературным изданиям в области биологической физики и химии. На их основе были определены функции фермента в органоидах клетки и проведен сравнительный анализ метода определения активности фермента и его субклеточной локализации.

Аналогии между особенностями методов исследования и клеточными субъединицами были осуществлены благодаря теоретическим методам: литературному и системному анализу, обобщению.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования мы обнаружили взаимосвязь между локализацией ферментов и функцией, которую они выполняют. Зависимость обусловлена функционалом тем клеточным органоидом, в котором залегают ферменты, в связи с чем он обладает рядом специфических свойств.

К функциям клеточной мембраны традиционно относят барьерную, защитную, транспортную функции. На их поддержание работают около 20% всех ферментов клетки. Они выступают в роли гидролитических катализаторов ( $K^+$ - $Na^+$ -АТФ-аза), рецепторов (аденилатциклаза), регулируют метаболические функции (щелочная фосфатаза), синтетические (креатинкиназа) и окислительные (цитохром р450, алкогольдегидрогеназа). Таким образом, мембранные ферменты тесно связаны с поддержанием структурных особенностей клетки и давления жидкости внутри нее, а также регуляция ионно-обменных процессов через каналы [2, 13].

В цитоплазме сосредоточено примерно 30% ферментов клетки, т.е. большая часть. Они участвуют в реализации процессов гликолиза (альдолаза, фосфоглюкоизомеразы), пентозного цикла (транскетолаза), транспорта функциональных групп (ДНК-метилтрансфераза, АЛТ). Функции ферментов обусловлены ролью цитоплазмы: поддержание осмотического давления, метаболизм, обеспечение взаимодействия органоидов [2, 10]. Благодаря своим свойствам цитоплазматические ферменты первыми реагируют на воспалительные процессы в клетке, выходят из нее, тем самым влияя на воспаление [4].

Митохондрии – энергетические станции клетки, обеспечивающие деятельность остальных структурных элементов [1, 2]. В митохондриях сосредоточено около 15% ферментов. Часть из них расположены в розовом веществе, т.е. в матриксе, другая часть на стенке мембраны. Матриксные ферменты поддерживают работу систем окисления пирувата, жирных кислот, цикла трикарбоновых кислот (цитратсинтаза). На внутренней мембране лежат ферменты окислительного фосфорилирования (АТФ-синтаза) и дыхательной цепи [13]. В межмембранном пространстве и на внешней мембране осуществляется транспорт различных функциональных групп (например, АЛТ).

Лизосомы отвечают за клеточное пищеварение, в связи с чем в них поддерживается кислая среда. К ферментам лизосом относят рН-зависимые ферменты, остро реагирующие на изменение водородного показателя. Около 10% ферментов клетки (фосфолипаза) выполняют гидролитическую функцию в лизосомах [1, 13]. Также в лизосомах залегают ферменты, поддерживающие ее кислую среду (протонная АТФаза), и ферменты, отщепляющие фосфатные группы (кислая фосфатаза).

Рибосомальные ферменты (5%) служат для осуществления синтеза белка. К таким ферментам относят: рибонуклеазу, АРСазу. Процесс синтеза белка также связан с трансферазами (например, пептидилтрансферазой), т.к. они осуществляют механизм протонного челнока и изменяют конформацию белка [13].

Ферменты ядра (6-7%) необходимы для процесса репликации ДНК (например, ДНК-полимераза  $\alpha$ ). В розовом веществе ядра (матриксе) осуществляются основные процессы синтеза, процессинга и транспорта РНК, поэтому в нем содержатся и РНК-зависимые ферменты, количество РНК при этом пропорционально влияет на активность ферментов [13].

В основе любого метода заложен принцип работы, позволяющий осуществлять необходимый анализ. Принципы основываются на законах биологической физики, физических понятиях об основных световых проявлениях, на химическом взаимодействии молекул и т.д.

Согласно А. Н. Ремизову [9], ферменты биологических мембран должны регистрироваться теми методами, которые позволят детектировать потенциал, его изменение, поглощение и испускание света. Для этого подходят электрохимические методы (в частности потенциометрия), ими определяют активность таких ферментов как

пероксидаза, холинэстераза; свето-эмиссионные методы (спектрофотометрия, флуорометрия, ЯМР), ими можно определить активность оксидоредуктаз (цитохром р450), лиаз (аденилатциклаза).

Как было отмечено, цитохром р450 исследуют методом флуоресцентного анализа. Его кинетику измеряют в максимуме поглощения при длине 450 нм [4,5]. Однако часто отмечается явление тушения флуоресценции, которое снижается при добавлении в систему ингибитора (например, низкий рН среды). А. С. Рубин [11] рассматривает метод ЭПР как решение данной проблемы, т.к. метод позволяет исследовать флуоресцирующие соединения в присутствии жидкого гелия без дополнительных ингибиторов.

Спектральные методы позволили определить активность мембранных ферментов (например, семейства цитохромов) и выявить, что наибольшая их активность отмечается в менее вязком липидном слое, т.е. было открыто влияние ферментов на характер упаковки углеводородных цепей в липидном слое.

Следует также отметить колориметрию, которую применяют для определения активности некоторых трансфераз – креатинкиназы [12]. Достоинствами реакций окрашивания является простота эксплуатации и скорость анализа, что дает возможность в короткие сроки получать результат и динамически отслеживать активность фермента во времени. Но ввиду относительно низкой эффективности и точности колориметрии постепенно вытесняется спектральными и фотометрическими методами исследования.

Цитоплазматические ферменты – самая распространенная группа внутриклеточных включений. Быстрое изменение электронного состояния молекул ферментов приводит к конформационно-релаксационной концепции ферментативного катализа, что связано с термодинамическими константами процесса и его направленностью [10, 13]. Кинетику механизма ферментативного катализа можно описать с помощью системы дифференциальных уравнений с концентрациями взаимодействующих веществ в качестве переменных, что обуславливает наибольшую эффективность кинетического анализа при их изучении. Его реализация осуществляется с применением УФ-излучения и излучения в видимой области [10].

Таким образом, для определения активности цитоплазматических ферментов чаще всего используют свето-эмиссионные и химические методы ввиду их простоты, скорости и точности [3]. Спектральные методы анализа (спектрофотометрия, ЯМР) применяют для гидролитических ферментов (пепсин), ферментов гликолиза (альдолаза), ферментов-трансфераз (гликогенсинтаза, АНАТ), УФ-кинетический для изоферментов трансфераз (АСТ).

Определение активности ферментов-изомераз (например, фосфоглюкоизомеразы) осуществляется с помощью поляриметрического метода анализа, который является уникальным и применяется только для изометрических энзимов, локализованных в цитоплазме [6]. Поляриметрия позволяет изучать не только активность фермента, но и удельное вращение, т.е. хиральность. Модернизированный метод, спектрополяриметрия, основан на применении различных светофильтров, благодаря ему была найдена линейная зависимость величины удельного вращения от длины волны [6].

Химические методы реализуются только реакциями окрашивания, что связано с изменением структуры молекулы при добавлении функциональной группы. Колориметрический метод широко используется в небольших опытах из-за его низкой себестоимости и доступности материала и оборудования.

Деятельность митохондриальных ферментов связана с поглощением и изучением энергии молекулами, с особенностями строения самих митохондрий и системы электрон-транспортной сети [1]. Активность митохондриальных ферментов зависит от общей концентрации липидов, что связано с их строгой специфичностью по отношению к полярным головкам липидов. Это обуславливает применение ЯМР и ЭПР методов, позволяющих определять атомарный состав и поведение ферментов в растворе с различными ингибиторами. Перекисное окисление липидов ведет к изменению активности ферментов с тиоловыми SH-группами (цитратсинтаза) [7]. Для определения ее активности метод должен включать в себя понятия кинетики реакции, возможность детектирования процессов окисления и восстановления. Поэтому применяются спектрофотометрические методы.

Трансформация энергии в митохондриях осуществляется с помощью АТФ-синтазы. Механизм ее действия связан с разностью электрохимических потенциалов на мембране. Использование потенциометрического метода позволяет определять активность АТФ-синтазы благодаря создаваемой ей разности потенциалов.

Лизосомы содержат гидролитические ферменты, их деятельность тесно связана с поддержанием кислотности среды и с количеством посторонних частиц в растворе. Определение активности ферментов осуществляется методом рН-метрии (амилаза, кислая фосфотаза), который учитывает оба признака и позволяет точно производить расчет [13]. Однако согласно другим источникам [8], более эффективными являются методы ЯМР, которые наиболее точные и специфичные, несмотря на свою дороговизну и длительность анализа.

Наиболее эффективные результаты исследования фермент-субстратных взаимодействий кристаллических ферментов (трипсин, уреазы) были получены методом рентгеноструктурного анализа. Таким образом были получены координаты атомов фермента и субстрата и оптимизированы. После обработки и составления дифференциальных уравнений были получены значения активности и произведен анализ их величины с конформацией отдельных фрагментов ферментов.

Химотрипсин и трипсин были исследованы [6] с применением радиоизотопных меток, вследствие чего была выявлена динамическая кривая его активности в зависимости от концентрации изотопа йода в растворе.

Рибосомальные и ядерные ферменты находятся в очень малых количествах, поэтому их определение стандартными свето-эмиссионными (спектрофотометрическими) методами затруднено ввиду их недостаточной точности, однако методы ЯМР, несмотря на свою стоимость, позволяют анализировать структуру молекул и

следить за их динамикой. В настоящее время определение ядерных ферментов осуществляется ДНК-методами (например, ПЛР) и встречается чаще ввиду точности, эффективности метода и малых объемов реагентов [14].

Модернизация метода ЭПР в метод спин-меток позволила определять активность рибосомальных ферментов и ориентации их химических связей; в основе метода – связывание известного парамагнитного соединения с исследуемой молекулой [9].

У рибосомальных ферментов отмечается высокая напряженность поля вследствие образования локальных электрических полей за счет концентрации диполей пептидных связей [13]. Это свойство позволяет определять их не только методом ЭПР, но и простыми электро-химическими методами: например, вольтамперметрия. Полученная величина измеряется в В/см и переводится в стандартные единицы активности.

По результатам проведенного исследования были сделаны следующие выводы.

1. Функции ферментов связаны с типом катализируемой ими химической реакции и их локализацией в клетке. Понимание этой взаимосвязи дает наиболее полное представление о метаболических процессах в клетке и способах реализации основных биохимических механизмов.

2. Локализация ферментов неоднородна и зависит от специфики органоида. Ввиду этого больше всего ферментов сосредоточено в крупных структурах (цитоплазма и клеточная мембрана), меньшее количество представлено в уникальных органоидах (ядро, рибосомы).

3. В настоящее время в клинической биохимии представлен широкий спектр методов определения активности ферментов. Они варьируют от простых и недостаточно точных (колориметрия) методов до высокоэффективных (метод ЯМР, рентгеноструктурный анализ). Такое количество методов позволяет исследовать активность ферментов на разном уровне, сравнивать полученные результаты и выявлять наиболее эффективные и подходящие конкретному ферменту методы.

Таким образом, в ходе исследования была выявлена взаимосвязь между субклеточной локализацией фермента и методом клинической биохимии для определения его активности. Эта взаимосвязь определяется функциями отдельных органоидов клетки и самих ферментов, а также индивидуальными параметрами метода. Широкий спектр методов позволяет исследователю совершить правильный выбор, сравнивая характеристики и оценивая эффективность каждого метода.

#### Список литературы / References:

1. *Биохимия: учебник* под ред. Северина Е.С. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 768 с. [*Biochemistry: textbook* ed. by Severin E.S., M.: GEOTAR-Media, 2016, 768 p. (In Russ.)]
2. *Гистология, эмбриология, цитология: учебник* под ред. Афанасьева Ю.И., Юриной Н.А. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016, 800 с. [*Histology, embryology, cytology: textbook* ed. by Afanaseva U.E., Urina N.A. M.: GEOTAR-Media, 2016, 800 p. (In Russ.)]
3. Емельянов В.В., Максимова Н.Е., Мочульская Н.Н. *Биохимия: учебное пособие*. Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2016, 132 с. [Emelyanov V.V., Maksimova N.E., Mochulskaya N.N. *Biochemistry: study guide*. Ekaterinburg: Ural Uni. Publ. House, 2016, 132p. (In Russ.)]
4. *Клиническая фармакология: учебник* под ред. Кукеса В.Г., Сычева Д.А. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017, 1024 с. [*Clinical pharmacology: textbook* ed. by Kukes V.G., Sychev D.A. M.: GEOTAR-Media, 2017, 1024 p. (In Russ.)]
5. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.А., Шумянцева В.В. Методы определения функциональной активности изоферментов цитохрома р450. *Биомедицинская химия*, 2018, т. 64, с. 149-168. [Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Archakov A.A., Shumyantseva V.V. Methods for determining of cytochrome p450 isoenzymes functional activity. *Biomeditsynskaya himiya*, 2018, vol. 62, no. 62, pp. 149-168. (In Russ.)]
6. Кулаков В.Н., Коршунов В.Б., Трифоненкова Н.К., Баженова Т.Л., Сорокин В.П., Седов В.В. Получение и свойства химотрипсина и трипсина, меченных радиоизотопами йода. *Вопросы медицинской химии*, 1985, т. 5, с. 98-100. [Kulakov V.N., Korshunov V.B., Trifonenkova N.K., Bajenova T.L., Sorokin V.P., Sedov V.V. Isolation and properties of chymotrypsin and trypsin labeled with iodine radioisotopes. *Voprosy meditsinskoy himii*, 1985, vol. 5, pp. 98-100. (In Russ.)]
7. Масловская А.А. Механизм развития кетоза при сахарном диабете и голодании. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*, № 3, 2012, с. 8-10. [Maslovskaya A.A. Mechanism of ketosis in diabetes mellitus and starvation. *Journal Grodno state medical university*, no. 3, 2012, pp. 8-10. (In Russ.)]
8. *Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии* под ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013, 848 с. [*Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* ed. by K. Wilson, J. Walker. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2013, 848 p. (In Russ.)]
9. Ремизов Н.А. *Медицинская и биологическая физика: учебник*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013, 648 с. [Remizov N.A. *Medical and biological physics: textbook*. M.: GEOTAR-Media, 2013, 648 p. (In Russ.)]
10. Рубин А.Б. *Биофизика: т. 1. Теоретическая биофизика: учебник*. М.: Из-во МГУ; из-во «Наука», 2004, 448 с. [Rubin A.B. *Biophysics: vol. 1. Theoretical biophysics: textbook*. M.: MGU publ. house: «Nauka» publ. House, 2004, 448 p. (In Russ.)]
11. Рубин А.Б. *Биофизика: т. 2. Биофизика клеточных процессов: учебник*. М.: Из-во МГУ; из-во «Наука», 2004, 469 с. [Rubin A.B. *Biophysics: vol. 2. Biophysics of cellular processes: textbook*. M.: MGU publ. house: «Nauka» publ. House, 2004, 469p. (In Russ.)]
12. Яковлева Г.Е. *Ферменты в клинической биохимии: пособие для врачей*. Новосибирск: ЗАО «Вектор-

Бест», 2005, 44 с. [Yakovleva G.E. *Enzymes in clinical biology: guide for doctors*. Novosibirsk: ZAO «Vector-Best», 2005, 44 p. (In Russ.)]

13. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, 2017, 1328 p.

14. Weidmann J., Schnölzer M., Dawson P.E., Hoheisel J.D. Copying life: synthesis of an enzymatically active mirror-image DNA-ligase made of D-amino acids. *Cell Chemical Biology*, 2019, no. 26. pp. 645-651.

#### CHOICE OF A METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF ENZYMES OF DIFFERENT CLASSES, DEPENDING ON THEIR LOCALIZATION IN THE CELL

Grigoryan A.L.<sup>1</sup>, Zolotavina M.L.<sup>2</sup>

Kuban State University

*Stavropolskaya str., 149, Krasnodar, 350040, Russia; e-mail: <sup>1</sup>ms.bucky@mail.ru, <sup>2</sup>zolotavina\_m@mail.ru*

**Abstract:** The labor is given an overview of methods for determining the activity of enzymes of six classes in the view of its localization in the cell. During the research we determined the subcellular localization of enzymes of different classes and it was revealed that the most of them are concentrated in the cytoplasm and on the cell membrane, because they have wide range of effects. The smallest number of enzymes is located on the ribosomes and in the nuclear extract, which is associated with their specific functions. We also have analyzed methods of determining the activity of enzymes and it was divided into widely and narrowly used groups. The separation is justified by the main characteristics of the methods and the main criterion is the effectiveness of the result. The first group includes spectral methods (spectrophotometry, photometry, etc.) and the colorimetry (based on color reactions). The second group includes methods of polarimetry, nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction analysis, etc.

**Key words:** *cell membrane, cytoplasm, mitochondria, lysosomes, ribosomes, nuclear, UV-kinetic methods, spectrophotometry, method of NMR, method of ESR, methods of electrochemistry, colorimetry.*