



УДК 577.152.311/547.8/548.73

© 2012

Академик НАН України С. А. Андронати, Е. А. Шестеренко,  
А. Г. Артеменко, П. Г. Полищук, Е. Н. Муратов,  
О. В. Севастьянов, И. И. Романовская, В. Е. Кузьмин

## Исследование влияния ионов металлов на активность карбоксилэстеразы печени свиньи методом QSAR

*Исследовано влияние 17 ионов металлов различных групп на эстеразную активность карбоксилэстеразы, выделенной из печени свиньи. Показано активирующее влияние ионов  $\text{Na}^+$  на активность фермента. С использованием в качестве дескрипторов атомных и ионных радиусов, а также ионизационной электроотрицательности впервые была получена QSAR модель, описывающая влияние широкого набора ионов металлов на активность карбоксилэстеразы.*

Карбоксилэстераза (КФ 3.1.1.1) печени свиньи, обладающая широкой субстратной специфичностью и высокой стереоселективностью [1], является перспективной для исследования метаболизма, активации лекарственных веществ и пролекарств *in vitro* [2], а также для стереоселективного гидролиза и синтеза широкого ряда алициклических, карбо- и гетероциклических соединений [3]. В литературе имеются сведения о влиянии ионов металлов на эстеразную активность карбоксилэстераз различного происхождения. Это влияние осуществляется за счет неспецифического связывания ионов металлов молекулами фермента. В результате некоторые ионы металлов, например  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , являются активаторами карбоксилэстеразы, тогда как другие —  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  могут ингибировать активность фермента [4, 5]. С помощью анализа QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) исследовано влияние ограниченного числа ионов металлов на эстеразную активность *Tetrahymena pyriformis*. Для построения модели использовали коэффициент мягкости ионов металлов ( $R^2 = 0,82$ ) [6].

Поскольку действие ионов металлов на эстеразную активность карбоксилэстеразы печени свиньи изучено недостаточно, актуально использование метода QSAR для исследования влияния расширенного ряда ионов металлов с широким набором характеристик на активность фермента.

**Материалы и методы исследования.** Карбоксилэстеразу из микросомальной фракции (МФ) выделяли согласно с разработанным методом, описанным в публикации [7]. В вы-

деленном препарате карбоксилэстеразы были определены: содержание белка методом Лоури в модификации Хартри [8], эстеразная активность — с помощью 1-нафтилацетата [9]; влияние ионов металлов — по изменению эстеразной активности карбоксилэстеразы в их присутствии (конечная концентрация хлоридов металлов составляла 1 ммоль/дм<sup>3</sup>). Для получения количественной оценки влияния ионов металлов на эстеразную активность применялся метод множественной линейной регрессии [10]. В качестве дескрипторов, описывающих свойства ионов металлов, использовали 70 характеристик [11], в том числе размеры, поляризуемость, термодинамические характеристики.

**Результаты и их обсуждение.** Нами разработан новый эффективный и доступный метод выделения препарата карбоксилэстеразы (закрывающийся в получении МФ из печени свиньи методом низкоскоростной седиментации с использованием Ca<sup>2+</sup>), последующей экстракцией фермента раствором пиродифосфата натрия и фракционированием фермента сульфатом аммония, что позволило выделить ферментный препарат с выходом белка 2,24 мг/г ткани и эстеразной активностью 149,0 мкмоль/(мг белка · мин) [7].

Полное ингибирование указанного препарата селективным ингибитором карбоксилэстераз ди-(*n*-нитрофенил)фосфатом (180 мкмоль/дм<sup>3</sup>) подтверждает его принадлежность к семейству карбоксилэстераз, а также свидетельствует об отсутствии примесей других эстераз. О принадлежности данного фермента к семейству карбоксилэстераз свидетельствуют и результаты SDS- и нативного электрофореза [7]. Исследование влияния 17 ионов металлов на эстеразную активность полученной карбоксилэстеразы показало, что добавление в реакционную среду хлорида Na привело к активации фермента на 16%. Остальные хлориды являлись в большей или меньшей степени ингибиторами фермента (табл. 1).

С использованием метода пошаговой линейной регрессии нами получена количественная оценка влияния ионов металлов на эстеразную активность. Для этого вся выборка была разделена на два набора: обучающий — 14 ионов и тестовый — 3 иона (см. табл. 1). К тесто-

Таблица 1. Наблюдаемые и предсказанные значения активности карбоксилэстеразы и исходные значения дескрипторов металлов, используемых в полученной регрессионной модели

Ион металла	Активность фермента, %		Дескриптор, %			
	$A_{\text{набл}}$	$A_{\text{пред}}$	$EN^I$	$r^A$	$r^{I6}$	$D = r^A - r^{I6}$
Li <sup>+</sup>	105,4	100,9	0,90	1,55	0,76	0,79
Na <sup>+</sup>	115,7	94,7	0,88	1,89	1,02	0,87
K <sup>+</sup>	85,5	91,3	0,81	2,36	1,38	0,98
Cu <sup>+</sup> *	12,1	28,0	1,14	1,97	0,77	1,20
Mg <sup>2+</sup>	35,0	41,9	1,31	1,60	0,72	0,88
Zn <sup>2+</sup>	52,0	24,4	1,66	1,39	0,74	0,65
Sr <sup>2+</sup>	20,4	53,9	1,13	2,15	1,18	0,97
Cd <sup>2+</sup>	22,5	28,7	1,66	1,56	0,95	0,61
Ba <sup>2+</sup>	77,7	72,9	1,07	2,21	1,35	0,86
Al <sup>3+</sup>	78,1	87,9	1,64	1,43	1,35	0,08
La <sup>3+</sup>	50,4	41,4	1,35	1,87	1,03	0,84
Sn <sup>2+</sup>	32,2	28,8	1,41	1,58	0,69	0,89
Mn <sup>2+*</sup>	92,4	77,4	1,38	1,30	0,83	0,47
Fe <sup>2+</sup>	37,8	55,7	1,40	1,26	0,61	0,65
Co <sup>2+</sup>	69,6	55,3	1,43	1,25	0,63	0,62
Ni <sup>2+*</sup>	57,1	60,4	1,45	1,24	0,69	0,55
Cr <sup>3+</sup>	10,4	14,8	1,74	1,27	0,62	0,65

\*Металлы тестовой выборки.

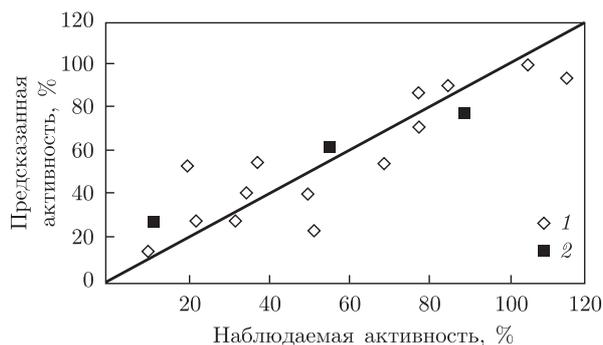


Рис. 1. Соотношение наблюдаемых и предсказанных значений изменения активности фермента для обучающей (1) и тестовой (2) выборок

вому набору случайным образом были отнесены ионы металлов  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ . В таблице приведены значения активности фермента в присутствии ионов металлов, а также значения дескрипторов, используемых для построения модели.

В результате регрессионного анализа была получена адекватная двухпараметрическая QSAR модель, описывающая изменение активности ( $A$ , %) фермента в присутствии ионов металлов:

$$A = 293 - 120EN^I - 107D, \quad (1)$$

где  $EN^I$  — ионизационная электроотрицательность;  $D = r^A - r^{I6}$  — разность между атомным радиусом  $Me$  ( $r^A$ ) и ионным радиусом для координационного числа, равного 6 ( $r^{I6}$ ). Статистические характеристики модели следующие: коэффициент корреляции  $R^2 = 0,77$ ; среднеквадратичная ошибка предсказания  $SE = 17,1$ ; критерий Фишера  $F = 18,2$ , что значительно превышает критическое значение ( $F_{кр} = 3,0$ ). Модель является устойчивой (коэффициент корреляции в условиях скользящего контроля  $Q^2 = 0,59$ ) и обладает хорошей предсказывающей способностью ( $R_{test}^2 = 0,85$ ). Диаграмму соотношения наблюдаемых и предсказанных значений изменения активности фермента для обучающей и тестовой выборок демонстрирует рис. 1.

Параметры, используемые в модели, с одной стороны, характеризуют поляризирующее влияние ионов ( $EN^I$ ), с другой — способность тех же ионов к поляризации (параметр  $D = r^A - r^{I6}$  фактически отражает размер электронной оболочки), т. е., чем меньше величины  $EN^I$  и  $D$ , тем выше активность фермента в присутствии иона металла. Рассматриваемые свойства, в сущности, отражают обратные тенденции в распределении электронной плотности: коэффициент взаимных корреляций для них равен  $R(EN^I, D) = -0,65$  (рис. 2). Сильно поляризирующие ионы ( $\text{Al}^{3+}$ ) имеют высокое значение  $EN^I$ , но низкое значение  $D$ , а наиболее поляризующиеся ионы ( $\text{Cu}^+$ ) — напротив, низкое значение  $EN^I$  и высокое значение  $D$  (см. табл. 1). В связи с этим, максимальная активность фермента сохраняется в присутствии ионов щелочных металлов, обладающих низкой ионизационной электроотрицательностью ( $EN^I$ ) и средними значениями  $D$ .

Рис. 3 иллюстрирует соотношение абсолютных величин нормированных (приведенных к единой шкале) вкладов значений дескрипторов ( $EN^I$ ,  $D$ , %) в изучаемое свойство, рассчитанных по уравнению (1). Как видно из диаграммы, ионизационная электроотрицательность в большей степени влияет на изменение активности фермента.

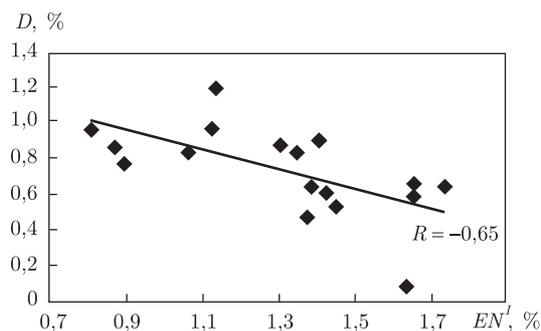


Рис. 2. Соотношение между ионизационной электроотрицательностью ионов металлов ( $EN^I$ ) и параметром  $D$ , характеризующим размер электронной оболочки

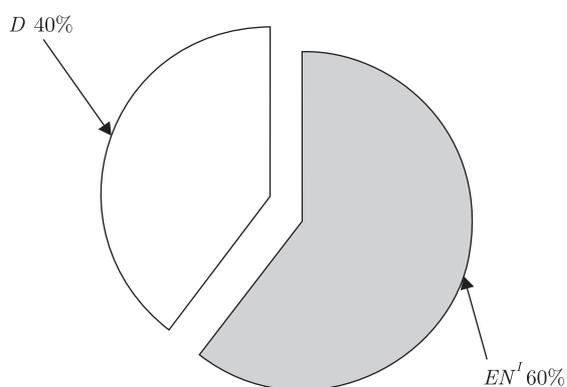


Рис. 3. Процентное соотношение вкладов дескрипторов в изменение активности карбоксилэстеразы

Полученные результаты относительно влияния переходных металлов на активность карбоксилэстеразы полностью согласуются с рядом Ирвинга–Вильямса ( $Mn^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$ ) в соответствии с прочностью комплекса иона металла с молекулой белка (Н. Irving, R. J. P. Williams, 1953). Построенная QSAR модель позволяет установить количественный вклад структурных характеристик расширенного набора ионов металлов в изменение активности карбоксилэстеразы с возможностью ее прогноза.

Таким образом, установлено активирующее влияние ионов  $Na^+$  на активность карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи. Нами впервые была получена QSAR модель, описывающая влияние ионов металлов различных групп на активность карбоксилэстеразы печени свиньи.

1. Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – **31**, No 1. – P. 620–624.
2. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrug // *Molecules.* – 2008. – **13**, No 2. – P. 412–431.
3. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J. *Hydrolases in organic synthesis.* – Weinheim: Wiley-VCH, 2006. – 368 p.
4. Faiz O., Colak A., Saglam N. et al. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4 // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – **40**, No 4. – P. 588–594.

5. Yu S., Zheng B., Zhao X., Feng Y. Gene cloning and characterization of a novel thermophilic esterase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 // *Acta biochim. et biophys. Sin.* – 2010. – **42**, No 4. – P. 288–295.
6. Bogaerts P., Bohatierb J., Bonnemoya F. Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure-activity relationships of xenobiotics: Comparison with the Microtox Test // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2001. – **49**, No 3. – P. 293–301.
7. Андронаті С. А., Шестеренко Є. А., Севастьянов О. В. та ін. Виділення і характеристика карбоксилестерази печінки свині та її використання в отриманні стереоселективних похідних 1,4-бенздіазепін-2-ону // *Біотехнологія*. – 2011. – **4**, № 5. – С. 71–76.
8. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* – 1972. – **48**, No 2. – P. 422–427.
9. Yang S., Liu K., Guengerich P. Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction // *Chirality*. – 1990. – **2**, No 3. – P. 150–155.
10. Фёрстер Э., Рёнц Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. – Москва: Финансы и статистика, 1983. – 304 с.
11. Волков А. И., Жарский И. М. Большой химический справочник. – Минск: Совр. шк., 2005. – 608 с.

*Фізико-хімічний інститут ім. А. В. Богатського  
НАН України, Одеса*

*Поступило в редакцію 06.04.2012*

**Академік НАН України С. А. Андронаті, Є. А. Шестеренко, А. Г. Артеменко,  
П. Г. Поліщук, Є. Н. Муратов, О. В. Севастьянов, І. І. Романовська,  
В. Є. Кузьмін**

### **Дослідження впливу іонів металів на активність карбоксилестерази печінки свині методом QSAR**

*Досліджено вплив 17 іонів металів різних груп на естеразну активність карбоксилестерази, виділеної з печінки свині. Показано активуючий вплив іонів Na<sup>+</sup> на активність ферменту. З використанням як дескрипторів атомних та іонних радіусів, а також іонізаційної електронегативності вперше було отримано QSAR модель, що описує вплив широкого набору іонів металів на активність карбоксилестерази.*

**Academician of the NAS of Ukraine S. A. Andronati, E. A. Shesterenko,  
A. G. Artemenko, P. G. Polyschuk, E. N. Muratov, O. S. Sevastyanov,  
I. I. Romanovska, V. E. Kuz'min**

### **Investigation of metal ions influence on the activity of pig liver carboxyl esterase by the QSAR method**

*The influence of 17 metal ions belonging to different groups on the activity of carboxyl esterase isolated from porcine liver is studied. The activating action of Na<sup>+</sup> ions on the enzyme activity is shown. Using atomic and ionic radii, as well as the ionization electronegativity as descriptors, the QSAR model describing the influence of the wide collection of metal ions on the carboxyl esterase activity is first developed.*