

С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич

БИОКИНЕТИКА

Практический курс

*Рекомендовано Министерством
общего и профессионального образования РФ
в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по химическим, биологическим
и медицинским специальностям*

Москва
1999

ИЗДАТЕЛЬСКО
ТОРГОВЫЙ ДОМ
ГРАНД
Фант
пресс

УДК 541.1
ББК 28.071
В 18

Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г.

В 18 Биокинетика: Практический курс. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — 720 с.: ил.

Рецензенты:
академик РАН, профессор М. А. Островский,
профессор Г. Б. Сергеев

ISBN 5-8183-0050-1

В книге анализируются вопросы, связанные с применением математических моделей для описания развития биологических процессов во времени. Рассматриваются основы химической кинетики, ферментативного катализа, молекулярной рецепции, фармакокинетики и клеточного роста. Обсуждаются аспекты прикладного и теоретического характера. Основные теоретические положения проиллюстрированы примерами.

Книга рассчитана на студентов, аспирантов и специалистов в области химии, физико-химической биологии и медицины.

ББК 28.071

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни была форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

ISBN 5-8183-0050-1

© Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г., 1998
© ФАИР-ПРЕСС, 1998

ПРЕДИСЛОВИЕ

...среди неизвестного в окружающей нас природе самым неизвестным является время, ибо никто не знает, что такое время и как им управлять.

Аристотель

Первый признак, который отличает живое от неживого, это движение, постоянное развитие во времени. Мы с удивлением наблюдаем, как растет и развивается ребенок, из маленького семени возникает растение и распускается цветок. Вокруг нас и внутри нас бушует пламя жизни.

Мы заведомо знаем, что события складываются из последовательностей весьма определенных стадий и циклов, разворачиваются во времени. Каждая стадия события имеет продолжительность, определенность и значимость.

Очевидно, что в ритмах живого лежат последовательности превращений молекул. Что определяет протекание биологических процессов во времени? Каковы пути и возможности ускорений биохимических реакций? Какая стадия определяет скорость того или иного биологического явления? Какие события на молекулярном уровне задают динамику развития в целом? Постановка такого рода в высшей степени интересных и сложных вопросов связана с развитием области количественных исследований, которая называется *биологической кинетикой* (*биокинетикой*).

Исследование количественных закономерностей развития биологических процессов на молекулярном уровне во времени составляет предмет биологической (биохимической) кинетики. В задачи биокинетики входит выяснение механизмов, определяющих скорости и природу процессов, выявление их лимитирующих стадий. Составной частью биокинетики является количественное описание протекания биологических процессов во времени при использовании молекулярных представлений и базовых законов физической и химической кинетики.

Изучение динамики биологических процессов охватывает большой круг явлений. Многие из них уже в настоящее время могут быть интерпретированы на молекулярном уровне. За последние десятилетия существенный прогресс в данной области в значительной степени связан с интенсивным изучением ферментов и ферментных сис-

тем. Именно ферменты в большинстве случаев являются кинетическими элементами, определяющими скорости и направления развития биопроцессов. Поэтому значительное место в книге отведено *кинетики ферментативного катализа*.

Самосогласованность биологических процессов на молекулярном уровне существенным образом определяется отработанными эволюцией процессами обмена информацией с помощью сигнальных молекул и белковых рецепторов. Эти процессы характеризуются вполне определенными кинетическими закономерностями, анализу которых посвящен значительный раздел данной книги, называемый *молекулярной рецепцией*.

Строгие количественные законы описывают поведение каждого вещества в организме. В настоящее время особенно хорошо это изучено на примере лекарств. Раздел биокинетики, связанный с изучением кинетических закономерностей поведения лекарственных средств в организме, называется *фармакокинетикой*. В книге излагаются основы фармакокинетики.

Наконец, большой и важный раздел современной биокинетики связан с анализом кинетики роста и эволюции клеточных популяций. Клетка как элементарная ячейка жизни представляет собой высокоорганизованный реактор, обладающий удивительным свойством — полностью воспроизводить себя во всей сложности состава и структуры. Понимание динамики клеточного роста принципиально важно как при решении задач микробиологии, биотехнологии и управляемого биосинтеза, так и для развития количественной медицины, онкологии, для понимания и управления механизмами старения.

Итак, *биокинетика — наука, изучающая на молекулярном уровне закономерности развития биологических процессов в системах in vitro, живых органах и тканях, клеточных популяциях*.

Для удобства восприятия теоретического материала книга проиллюстрирована примерами анализа результатов биокинетических экспериментов, взятых из отечественной и зарубежной литературы. Особое внимание в книге уделено практическому анализу результатов экспериментов. Для простоты понимания многие теоретические вопросы обоснования тех или иных уравнений, методов оставлены за рамками этой книги. Их рассмотрение можно найти в специальных источниках, на которые даны ссылки в тексте.

Книга состоит из четырех основных глав:

1. Ферментный катализ. В этой главе рассматриваются основные кинетические модели неосложненного и осложненного процессов взаимодействия ферментов с субстратами.

2. Молекулярная рецепция. Данная глава посвящена основным вопросам, связанным с различными механизмами взаимодействия лигандов с рецепторами.

3. Фармакокинетика. В этой главе рассмотрены основные линейные и ряд нелинейных фармакокинетических моделей, а также методы оптимизации фармакотерапии, основанные на применении фармакокинетических моделей.

4. Клеточный рост. Рассмотрены основные модели, позволяющие описать процесс роста и эволюции клеточных популяций.

В главах 1 и 6 рассмотрены основы химической кинетики и некоторые математические методы, используемые в биокинетике.

Последовательное изложение материала по принципу «от простого к сложному» облегчает усвоение материала. Книга рассчитана на студентов и аспирантов медицинских, биологических и химических специальностей в качестве учебного пособия по курсам «Ферментативная кинетика», «Химическая кинетика», «Биохимическая кинетика», «Биохимия», «Фармакокинетика», «Фармакология», «Микробиология», «Математические методы в биологии», «Математическое моделирование в медицинских и биологических системах» и др. Книга также может быть рекомендована специалистам в данных областях в качестве справочного пособия.

Авторы приносят благодарность за помощь в работе над книгой *Леенсону И.А.* (МГУ им. М.В. Ломоносова), *Куликову М.А.* (Институт нейрофизиологии и высшей нервной деятельности РАМН), *Горькову В.А.* (Научный центр психического здоровья РАМН), *Ростопицовой Т.В.* (Российский государственный медицинский университет), *Харкевичу Д.А.* (Московская медицинская академия), *Колотиловой Н.Н.* (МГУ им. М.В. Ломоносова), *Севериной И.С.* (НИИ биомедицинской химии РАМН), *Добрыниной О.В.* (Российский государственный медицинский университет), *Зозуле А.А.* (Научный центр психического здоровья РАМН), *Тишкову В.И.* (МГУ им. М.В. Ломоносова), *Саутевой К.И.* (МГУ им. М.В. Ломоносова), *Духанину А.С.* (Российский государственный медицинский университет), *Гачок И.В.* (МГУ им. М.В. Ломоносова), *Глазковой М.М.* (Российская государственная библиотека), *Казанской Н.Ф.* (МГУ им. М.В. Ломоносова).

Авторы благодарят профессора *Клессова А.А.* за разрешение использовать некоторые задачи из книги Березин И.В., Клесов А.А. «Практический курс химической и ферментативной кинетики».

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

μ	— удельная скорость роста микроорганизмов
E	— фермент, концентрация фермента
ES	— фермент-субстратный комплекс, концентрация фермент-субстратного комплекса
H	— энтальпия
k	— константа скорости химической реакции
$k_{эфф}$	— эффективная (кажущаяся) константа скорости химической реакции
k_{+1}	— константа скорости ассоциации
k_{-1}	— константа скорости диссоциации
K	— равновесная константа (константа равновесия)
K_a	— константа ассоциации
K_d	— константа диссоциации
K_i	— константа ингибирования
K_m	— константа Михаэлиса-Ментен
L	— лиганд, концентрация лиганда
LR	— лиганд-рецепторный комплекс
N	— число клеток
M	— биомасса
R	— рецептор, концентрация рецепторов
S	— субстрат, концентрация субстрата
T	— абсолютная температура
t	— время реакции
v	— скорость реакции
X	— вещество, концентрация вещества

Дополнительные обозначения

$[]$	— концентрация вещества, употребляется только в тех случаях, когда отсутствие скобок может привести к разночтениям, например LR можно прочесть как $[LR]$ и как $[L][R]$
0	— подстрочный знак «ноль», обозначает начальный, начальная. Например, v_0 — начальная скорость реакции
m	— подстрочный знак «m», обозначает максимальный, максимальная. Например, N_m — максимальное число микроорганизмов
p	— подстрочный знак «p», обозначает равновесный, равновесная. Например, X_p — равновесная концентрация вещества X
∞	— подстрочный знак «бесконечность», возникающий при бесконечно большом времени химической реакции. Например, X_∞ — концентрация вещества X при бесконечно большом времени наблюдения за реакцией

Глава 1

ВВЕДЕНИЕ В ХИМИЧЕСКУЮ КИНЕТИКУ

— Движенья нет, — сказал мудрец брадатый.
Другой смолчал и стал пред ним ходить.

А. Пушкин

1.1. Кинетический эксперимент

Философия — отыскивание сомнительных причин в обосновании того, во что веришь инстинктивно.

О. Хаксли

Химическая кинетика (от греческого $\kappa\iota\nu\eta\tau\iota\chi\omicron\varsigma$ — приводящий в движение) — наука, изучающая механизмы и закономерности протекания химических реакций во времени в зависимости от концентраций реагирующих веществ и условий проведения эксперимента: температуры, давления, pH и т.д.

Для простоты изложения материала в дальнейшем будем употреблять существительное кинетика без прилагательного химическая.

История химической кинетики

Чем дальше эксперимент от теории, тем ближе он к Нобелевской премии.

Ф.Ж.Кюри

Выделение химической кинетики в самостоятельную научную дисциплину произошло в 80-е гг. XIX в. Это оказалось возможным благодаря накоплению и систематизации громадного фактического материала по изучению механизмов химических превращений.

Вероятно, одной из самых первых попыток изучения механизма химической реакции являются работы Р. Бойля, который в 1680 г. наблюдал яркое свечение фосфора при уменьшении давления воздуха. Несколько позже, в начале—середине XVIII в. А. Лавуазье изучал образование оксида ртути при взаимодействии этого металла с кислородом. В рамках этой ра-

боты в 1770 г. Лавуазье провел один из самых длинных за всю историю химии опыт, длившийся 100 дней.

Вслед за Лавуазье ученые-химики не раз предпринимали попытки исследовать закономерности химических превращений, найти материальный субстрат химических реакций. Систематическое изучение «силы сродства» веществ друг к другу (современный аналог скорости химической реакции) было предпринято во второй половине XVIII в. Наибольший интерес представляет труд немецкого ученого К. Венцеля «Учение о сродстве» (1777), в котором он впервые обобщает известный фактический материал и приходит к выводу, что «сродство тел к общему растворителю обратно пропорционально времени, которое необходимо для их растворения». В своей работе Венцель использовал экспериментальные данные других авторов для установления количественных соотношений между концентрациями реагирующих веществ и фактически сформулировал основные положения закона действующих масс почти на 100 лет раньше норвежцев К. Гульдберга и П. Вааге. Однако, как это нередко бывает в науке, основные результаты работы Венцеля не были замечены современниками.

В 1789 г. английский ученый У. Хиггинс предположил, что процесс растворения железа в кислоте является сложной реакцией, протекающей с образованием промежуточных соединений. Эти промежуточные соединения распадаются к моменту окончания реакции из-за действия «силы сродства». Благодаря работе Хиггинса в химию было впервые введено понятие времени протекания химической реакции.

В 1894 г. ученица Хиггинса У. Фульгем показала, что вода способна образовывать промежуточные соединения с реагентами при протекании химических реакций в водных растворах. Фульгем предположила, что вода катализирует реакции, происходящие в растворах.

Гипотезы английских ученых У. Хиггинса и У. Фульгем о наличии промежуточных продуктов химической реакции соответствуют современным представлениям, согласно которым любая химическая реакция представляет собой совокупность элементарных актов (превращений). Эти превращения происходят из-за взаимодействия между собой молекул исходных веществ (субстратов реакции) и приводят к образованию продуктов реакции. При этом любое химическое превращение обратимо.

Впервые предположил обратимый характер химических превращений Д.И. Менделеев в книге «Основы химии» (1869). В этой книге он уделяет особое внимание влиянию внешних условий на закономерности протекания химических реакций и подчеркивает сложный характер химических превращений.

Формирование представлений о сложном характере химических реакций также тесно связано с трудами Х. Хеннеля (1827), Ю. Либиха (1833), А. Вильямсона (1851), посвященными изучению реакции образования диэтилового эфира из спирта в присутствии серной кислоты. В результате серии работ было показано, что данная реакция является сложным многостадийным процессом, протекающим с образованием промежуточных соединений.

В 30-е гг. XIX в. проводятся серии исследований по изучению механизмов сложных реакций, сопровождающихся начальным ускорением. Наибольший интерес представляют труды О. де ля Рива, Ф. Миллона и Х. Шенбайна. В результате их работ углубились представления о времени как факторе протекания химических реакций.

Обобщение имеющихся результатов по изучению механизмов сложных реакций было предпринято в 1850-е гг. французским химиком О. Лораном и немецким химиком А. Кекуле. При изучении реакции взаимодействия хлористого бензоила и аммиака этими авторами была гениально предположена столь привычная в наши дни шестичленная формула бензола. Однако книга Лорана вышла в свет уже после его смерти (1854), и некоторые результаты исследований, изложенные в ней, остались незамеченными. Лишь четыре года спустя, в 1858 г., в журнальной статье Кекуле, рассматривая «химические метаморфозы», повторно открыл формулу бензола, которую сейчас принято называть формулой Кекуле.

Дальнейшее развитие учения о механизмах химических реакций связано с именами А.М. Бутлерова и М.Д. Львова. В 1861 г. Бутлеров сформулировал теорию химического строения, в которой подчеркивал, что закономерности протекания химических реакций зависят от строения веществ, вступающих в реакцию. Теория химического строения Бутлерова была развита и дополнена его учеником М.Д. Львовым (1884).

Рассказывают, что в 70–80-е гг. XIX в. Бутлеров читал лекции на химическом факультете МГУ. Читал он медленно и скучно, и студенты почти не ходили на его лекции. Однако экзамен сдавать как-то надо...

И вот, уже на экзамене, Бутлеров беседует со студентом. Тот что-то отвечает. И вдруг Бутлеров спрашивает:

— Почему это вы, голубчик, на моих лекциях не были?

— Как же, герр профессор, был. Я за колонной сидел.

— Боже мой! Казалось бы, такая маленькая колонна, а сколько студентов за ней помещается.

Современные представления о механизме химической реакции

Чтобы произошла химическая реакция, необходимо взаимодействие между молекулами веществ, вступающих в реакцию. Это взаимодействие происходит из-за столкновений молекул. Однако не каждое столкновение приводит к образованию продуктов реакции; для того чтобы произошла химическая реакция, необходимо, чтобы энергия взаимодействующих молекул была не меньше некоторой критической величины, называемой *энергией активации*. При этом для каждой химической реакции существует своя энергия активации, зависящая от природы реагирующих веществ.

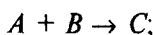
Термин «энергия активации» был введен С. Аррениусом в 1889 г. Представления о химических реакциях как следствие соударений молекул были

обобщены в 10-е годы XX в. В. Мак-Льюисом. Его идеи в 20–30-е годы развивали К. Герцфельд, И. Христиансен, М. Поляни, Э. Мелвин-Хьюз, Г. Эйринг, М. Эванс, В. Вини-Джонс, К. Лейдер, Н.Н. Семенов и др.

Согласно современным представлениям, все химические реакции (рис. 1.1) делятся на простые и сложные.

Реакции, представляющие собой совокупность однотипных элементарных актов, называются *простыми*. В зависимости от числа атомов, вступающих в простую реакцию, различают три вида реакций (см. рис. 1.1): *мономолекулярные*, *бимолекулярные*, *тримолекулярные*. Взаимодействие более чем трех молекул одновременно практически невозможно.

Примеры схем простых реакций:



Понятие «простые реакции» введено Я. Вант-Гоффом в 1884 г. Обобщая известный фактический материал, Вант-Гофф формальным образом описал закономерности протекания любой химической реакции:

$$-\frac{dA}{dt} = kA^n,$$

где A — концентрация реагирующих веществ; t — время протекания химической реакции; k — коэффициент пропорциональности (константа скорости реакции с точки зрения современных представлений), $n = 1, 2, 3$. (Реакции, для которых $n = 1$, Вант-Гофф назвал мономолекулярными, реакции с $n = 2$ — бимолекулярными, с $n = 3$ — тримолекулярными.) Однако с точки зрения современных представлений термины, введен-



Рис. 1.1. Типы химических реакций.

ные Вант-Гоффом, справедливы лишь для простых реакций. В случае, если изменение концентрации веществ в сложной реакции описывается данным уравнением, говорят о реакциях псевдопервого порядка ($n = 1$), псевдвторого порядка ($n = 2$) и псевдотретьего порядка ($n = 3$).

Заметим, что простые реакции имеют ограниченное распространение; большинство реакций в химии — совокупность простых реакций.

Реакции, представляющие собой совокупность нескольких простых реакций, называются *сложными*.

К сложным реакциям относятся (рис. 1.1): обратимые, циклические, параллельные, последовательные, каскадные, смешанные.

Если химическая реакция протекает как от субстратов к продуктам, так и от продуктов к субстратам, то она называется *обратимой* при условии, что протекание реакции в обе стороны происходит через одни и те же вещества, но в обратном порядке; *циклической*, если протекание реакции в обе стороны происходит через разные вещества или же через те же вещества, но в порядке, отличном от обратного.

Химические процессы, в которых протекает несколько реакций одновременно с не менее чем одним общим субстратом, называются *параллельными*. Химические реакции, в которых продукт одной является субстратом следующей реакции, называются *последовательными*. Последовательно-параллельные реакции, в которых на каждом этапе происходит увеличение числа молекул, участвующих в реакции, называются *каскадными*.

Систематическое изучение сложных реакций началось во второй половине XIX в. Одной из первых опубликованных работ был труд В. Оствальда (1883), посвященный изучению механизма омыления эфиров уксусной кислоты. Четыре года спустя аналогичное уравнение получил Д.П. Коновалов. В 1896 г. В.А. Костяковский экспериментально подтвердил справедливость

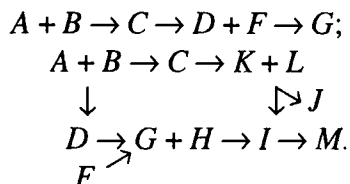


Вант-Гофф Я.Г.
(1852–1911)

Физикохимик. В 1884 г. создал теорию кинетики равновесных реакций, ввел понятия моно-, би- и три-молекулярных реакций. В 1886 г. из уравнения Клайперона-Клаузиуса вывел уравнение зависимости равновесной константы химической реакции от температуры. Нобелевская премия по химии, 1901.

уравнений Оствальда и Коновалова для многих сложных реакций. Необходимо подчеркнуть особую роль в изучении механизмов сложных реакций трудов А.Н. Баха и Г. Энглера (конец XIX — начало XX в.) и М. Боденштейн (1894, 1899). В результате серии работ этих авторов сложились представления о сложных реакциях как совокупности простых.

Примеры сложных реакций:



В последовательных сложных реакциях помимо субстрата и продуктов реакции принято выделять *интермедиаты* (промежуточные продукты реакции), представляющие собой вещества, образующиеся и распадающиеся в процессе химической реакции. С учетом интермедиата схему последовательной сложной реакции можно записать следующим образом:



В соответствии с определением химической кинетики *основной задачей* этой дисциплины является изучение механизмов протекания химических реакций. При этом наиболее простой является задача определения количественных закономерностей химических превращений. Более сложная задача — определение всех промежуточных продуктов реакции. Полностью изучить механизм химической реакции — значит определить, из каких элементарных актов состоит реакция, в какой последовательности протекают элементарные акты и как они соотносятся между собой.

Биокинетика

Один из основных разделов кинетики изучает кинетику биологических реакций; этот раздел принято называть *биокинетикой*. Биокинетика является пограничной наукой, возникшей на стыке биохимии и химической кинетики (рис. 1.2). Выделение биокинетики в отдельную дисциплину неслучайно, оно логически оправдано и связано с исключительной значимостью кинетических процессов для всех живых орга-

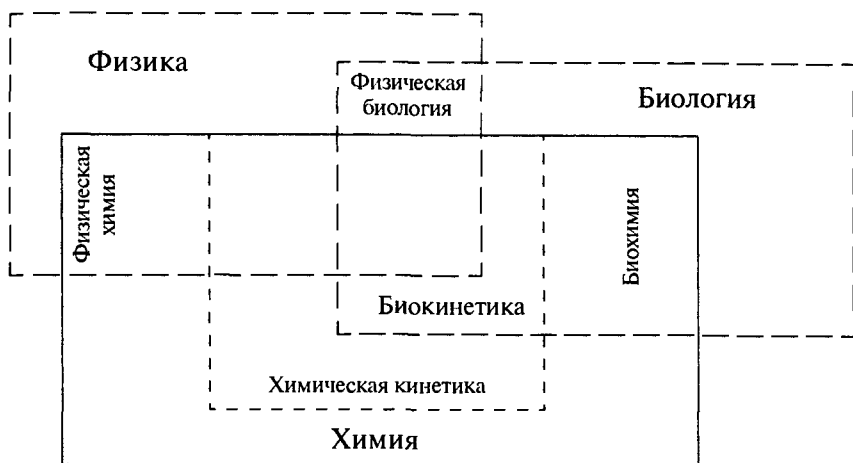


Рис. 1.2. Соотношение между основными естественно-научными дисциплинами.

низмов. Биокинетика — относительно молодая наука. Термин «биокинетика» был введен И.В. Березиным и С.Д. Варфоломеевым в 1979 г. (Биокинетика. М., 1979). Традиционно в курсе биокинетики рассматриваются ферментативные реакции, процессы взаимодействия лигандов с рецепторами и процессы клеточного роста. Механизмы основных биологических реакций, особенности их протекания будут рассмотрены позднее в соответствующих главах.

Кинетический эксперимент

Студент — это не сосуд, который надо наполнить, а факел, который надо зажечь.

Л. Арцимович

Для того чтобы определить механизмы любой химической реакции, проводят *кинетический эксперимент*, который заключается в измерении концентрации исследуемого вещества в зависимости от времени и ряда изучаемых параметров. Выбор исследуемого вещества зависит от известных или предполагаемых механизмов реакции и возможности экспериментальных методов.

В качестве исследуемого вещества может быть выбрано:

1. Одно из веществ, вступающих в реакцию (субстрат реакции).

2. Промежуточные соединения, образующиеся в ходе реакции (промежуточный продукт, или интермедиат).

3. Продукты химической реакции.

Выбор конкретного вещества зависит от целей и задач исследования, методов, которыми владеет экспериментатор и которые в настоящий момент являются доступными.

Кинетический эксперимент может иметь две основные цели:

1. Идентификация механизма реакции.

2. Оптимизация условий проведения реакции, т.е. нахождение условий, позволяющих провести реакцию с наибольшим выходом за наименьшее время.

Заметим, что под материалами исследования понимают все лабораторное оборудование, все реактивы, исследуемые образцы (экстракты, органы, ткани и т.д.). Под методами исследования подразумевают операции, проведенные экспериментатором, включая методы получения образцов и обработки результатов исследований.

Разницу между целями, задачами и методами можно проиллюстрировать на основании следующего гипертрофированного и аллегоричного примера.

Цель работы: приблизиться к Луне.

Задачи работы: 1. Привезти самосвал с песком. 2. Высыпать песок на землю. 3. Насыпать холмик песка. 4. Забраться на холмик. (Тем самым цель работы достигнута: мы действительно приблизились к Луне по сравнению с обычным уровнем земли.)

Материалы работы: самосвал, песок, лопата.

Методы работы: погрузка, разгрузка и вождение самосвала, земляные работы по насыпанию холмика.

При проведении кинетического эксперимента необходимо стремиться к измерению динамики изменения всех параметров, всех компонентов системы. Однако в реальных исследованиях это практически невозможно. Поэтому экспериментатор вынужден ограничиться измерением лишь некоторых, как правило, наиболее информативных параметров.

Если задача исследования заключается в определении процесса образования окончательного продукта химической реакции во времени, то разумным методом решения данной задачи является измерение концентрации продуктов реакции. Измерение концентрации субстратов реакции для решения данной задачи также имеет смысл. При этом концентрация каждого из этих веществ равным образом информативна с точки зрения поставленных целей. Поэтому в эксперименте следует измерять концентрацию того соединения, концентрация которого может быть измерена наиболее простым или же наиболее точным образом. Наиболее простые методы обычно используются для под-

бора условий проведения эксперимента, более точные методы — для получения окончательных результатов.

Если задача исследования заключается в определении кинетических характеристик промежуточных соединений, то нужно стремиться детектировать интермедиаты. В связи с тем, что промежуточные соединения обычно обладают сравнительно небольшим временем превращения (являются нестабильными соединениями), для изучения их концентрации нужны малоинерционные, высокочувствительные методы.

Параметры кинетического эксперимента

Выше уже упоминалось о том, что кинетический эксперимент заключается в измерении концентрации исследуемого вещества (веществ) в зависимости от ряда параметров. При этом под **параметрами кинетического эксперимента** понимают:

1. *Начальную концентрацию* веществ, вступающих в реакцию.
2. *Условия* проведения эксперимента (температура, давление, рН и т.д.).

Для проведения адекватного кинетического эксперимента полагают один параметр *измеряемым*, один параметр — *переменным*, а все остальные параметры — *фиксированными*. *Задачей* кинетического эксперимента является определение характеристик измеряемого параметра в зависимости от значений переменного при неизменных значениях фиксированных параметров.

Так, задачей кинетического эксперимента может быть определение скорости гидролиза вещества X в зависимости от температуры. В подобном эксперименте измеряемым параметром является концентрация вещества X (или же продуктов гидролиза); температура, при которой протекает химическая реакция, является переменным параметром (изменяя значения температуры, например, с помощью термостата, изменяют условия проведения этой реакции); начальная концентрация вещества X , рН и т.д. во всех экспериментах сохраняются одинаковыми, т.е. они являются фиксированными параметрами.

Обычно кинетические эксперименты начинают с изучения изменения концентрации веществ от времени их взаимодействия. Именно этим экспериментам следует уделять особое внимание. Как будет показано в дальнейших главах, недостаточно строгое или недостаточно подробное проведение подобных экспериментов может привести к существенным ошибкам определения механизма химической реакции.

После того как проведены кинетические эксперименты, в которых время химической реакции является переменной величиной, обычно приступают к определению зависимости концентрации изучаемого вещества от концентраций веществ, вступающих в реакцию, и от температуры реакции.

Кинетические кривые. Основные участки кинетических кривых

В результате кинетического эксперимента получают *кинетические кривые*. Кинетические кривые являются наглядным графическим методом представления результатов кинетических экспериментов. Обычно это графики зависимости концентраций изучаемых веществ от времени химической реакции.

Известно множество кинетических кривых, однако среди них можно выделить наиболее характерные для тех или иных химических процессов. Основные виды кинетических кривых приведены на рис. 1.3.

Кинетические кривые *a* и *б* наиболее характерны для случая, когда вещество *X* (концентрацию которого мы определяем) является субстратом реакции. Кинетическая кривая *в* встречается в тех случаях, когда вещество *X* в реакции не участвует или же когда концентрация вещества *X* много больше концентрации всех остальных веществ в реакционной смеси, из-

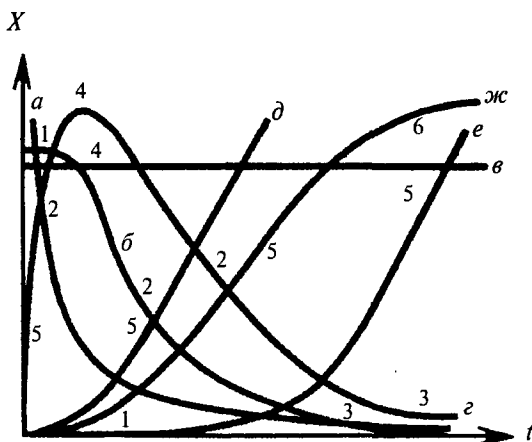


Рис. 1.3. Основные виды кинетических кривых.
1—6 — участки кинетических кривых (комментарии в тексте)

за чего концентрация вещества X сохраняется на практически постоянном уровне. Кинетическая кривая ϵ также может быть начальным участком кинетической кривой δ , если время наблюдения за реакцией недостаточно для существенных изменений концентраций вещества X . Кинетическая кривая ϵ обычно встречается в тех случаях, когда вещество X — промежуточный продукт химической реакции. Кинетические кривые δ , ϵ , ζ характерны для веществ, образующихся в ходе химической реакции.

На рис. 1.3 можно выделить основные участки, наиболее характерные для широкого класса кинетических кривых:

1. *Стадия индукции реакции.* На данной стадии не происходит существенных изменений концентрации вещества X . Стадией индукции реакции может быть только начальная стадия химической реакции; после нее всегда наблюдается изменение концентрации реагирующих веществ. Эти свойства отличают стадию индукции от стадии практически неизменных концентраций (4) и от стадии выхода на плато (6).

2. *Стадия уменьшения концентрации вещества X .* Обычно эта стадия характерна для субстратов и промежуточных соединений реакции.

3. *Стадия прекращения изменения концентрации вещества X* в связи с уменьшением его концентрации практически до нуля.

4. *Стадия практически постоянной концентрации.* Как правило, наблюдается между стадиями увеличения и уменьшения концентрации промежуточных соединений, а также в тех случаях, когда концентрация вещества X практически не меняется в процессе реакции.

5. *Стадия увеличения концентрации вещества X .* Обычно эта стадия характерна для интермедиатов и продуктов реакции.

6. *Стадия выхода на плато.* Эта стадия наблюдается после изменения концентрации вещества X в процессе химической реакции. Для обратимых химических реакций стадия выхода на плато соответствует наступлению равновесия.

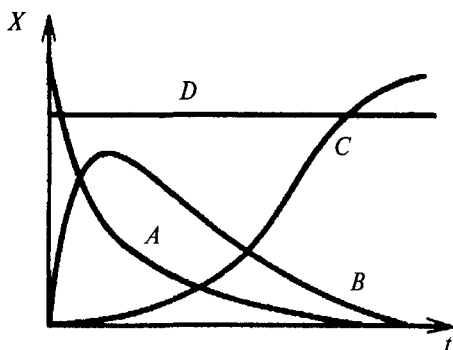


Рис. 1.4. Изменение концентрации различных веществ в процессе двухстадийной реакции.

В качестве примера рассмотрим двухстадийную химическую реакцию $A \rightarrow B \rightarrow C$. На рис. 1.4 приведены изменения концентраций этих веществ от времени реакции. Концентрация вещества A — субстрата реакции — с течением времени уменьшается, проходя стадии 2 и 3. Концентрация промежуточного соединения — вещества B — вначале нарастает, а затем убывает. Концентрация продукта реакции — вещества C — возрастает до тех пор, пока не выйдет на плато. Концентрация вещества D , не участвующего в данной реакции, в процессе реакции не меняется.

Интегральные и дифференциальные кинетические кривые

Кинетические кривые описывают непосредственные результаты кинетических экспериментов. Они отражают качественные изменения концентрации веществ, происходящие в процессе химической реакции. Для количественного описания обычно строят производные кривые, чаще всего интегральные и дифференциальные.

Интегральные кинетические кривые (рис. 1.5) описывают изменение площади под кинетической кривой в процессе химической реакции. Как видно, это неубывающие положительные кривые. Если вещество X является субстратом или интермедиатом химической реакции, то интегральная кинетическая кривая, описывающая поведение данного вещества, выходит на плато (рис. 1.5а). Для интермедиатов также обычно характерно наличие стадии индукции на интегральной кинетической кривой. Если же вещество X является окончательным продуктом реакции, то интегральная кинетическая кривая вещества X неограниченно возрастает (рис. 1.5б). При этом если вещество X образуется в результате ряда последовательных реакций, то на интегральной кинетической кривой наблюдается стадия индукции. Отметим, что наличие стадии индукции на интегральной кинетической кривой не является однозначным свидетельством наличия промежуточных продуктов реакции.

Дифференциальные кинетические кривые (рис. 1.6) описывают изменение производной в каждой точке исходной кинетической кривой (тангенс α угла наклона касательной к каждой точке). Дифференциальные кинетические кривые могут возрастать и убывать, быть положительными и отрицательными. Отрицательные участки дифференциальных кинетических кривых характерны для процессов *распада* веществ

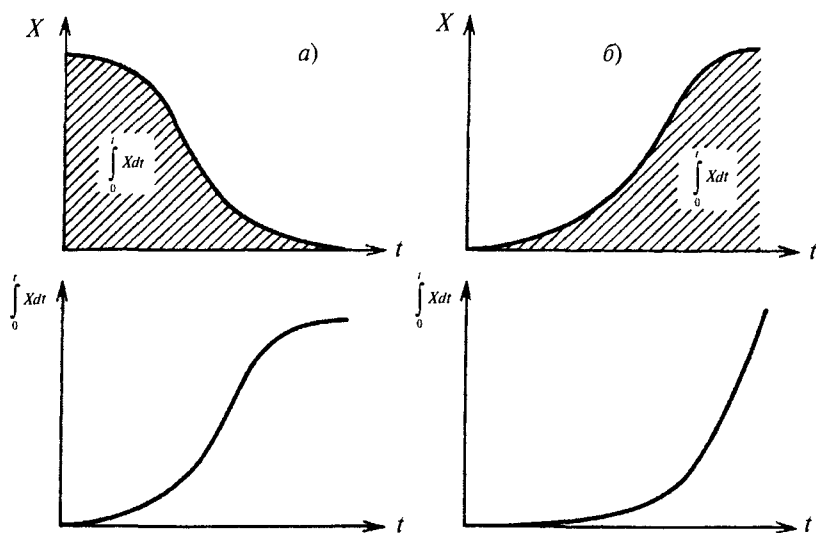


Рис. 1.5. Интегральные кинетические кривые.

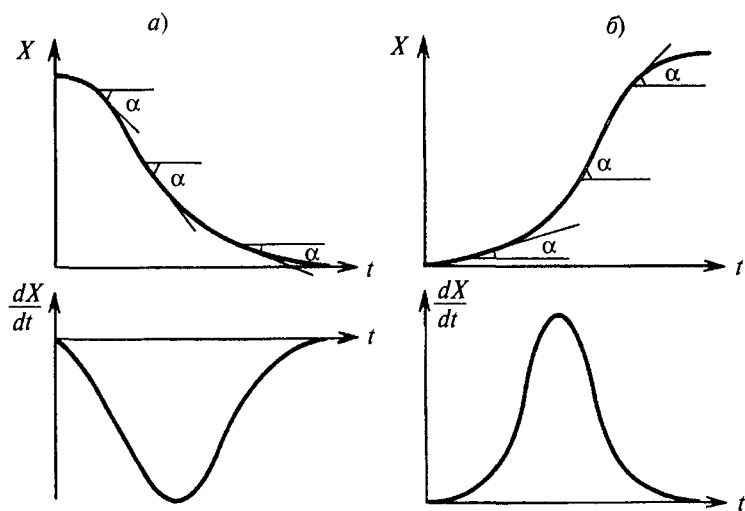


Рис. 1.6. Дифференциальные кинетические кривые.

(рис. 1.6а), положительные участки — для процессов их *образования* (рис. 1.6б).

Скорость химической реакции

Дифференциальная кинетическая кривая описывает скорость химической реакции. Для удобства скорость химической реакции образования и распада веществ описывают отдельно. Тогда

$$v = -\frac{dX}{dt}, \text{ если } X \text{ — субстрат реакции;} \quad (1.1)$$

$$v = \frac{dX}{dt}, \text{ если } X \text{ — продукт реакции.} \quad (1.1')$$

Скорость химической реакции определяется как количество вещества, образующееся (распадающееся) в единицу времени в процессе химической реакции. Размерность скорости химической реакции: концентрация/время. Например: моль/(л·с), М/мин, нМ/ч.

Первые попытки применить понятие «скорость реакции» для описания химических превращений были предприняты еще в XVIII в. Однако лишь во второй половине XIX в. понятие «скорость реакции» стало общепринятым. В 1866 г. Ф. Гаркур и В. Эссон математически определяют «скорость химического превращения» при помощи уравнения (1.1). В 1887 г. Н.А. Меншуткин впервые использует понятие «скорость реакции» для описания ее механизма.

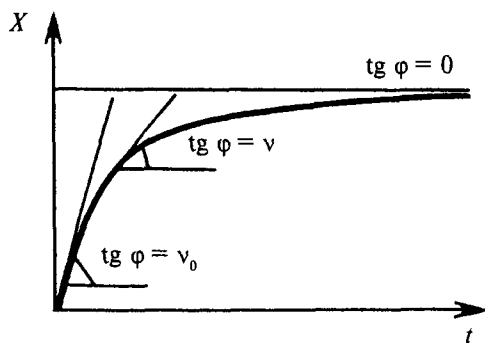


Рис. 1.7. Определение скорости химической реакции и начальной скорости реакции.

Скорость химической реакции, наблюдающаяся в начальный момент времени, когда существенные изменения концентрации реагирующих веществ не успели произойти, называется *начальной скоростью химической реакции* и обозначается v_0 . Скорость химической реакции, наблюдающуюся в любой другой момент времени, называют просто *скоростью* (рис. 1.7).

Закон действующих масс

Проводились многочисленные исследования зависимости скорости химической реакции от концентрации реагирующих веществ. В 1884 г. Я. Вант-Гоффом было показано, что в простейшем случае скорость химической реакции линейным образом зависит от концентрации реагирующих веществ, т.е. (для реакций распада)

$$v = -\frac{dX}{dt} = k_I X,$$

где k — коэффициент пропорциональности.

Реакции, скорость которых линейно зависит от концентрации веществ, вступающих в реакцию, называются реакциями *первого порядка*. Обычно реакции первого порядка изображают в виде схемы $A \rightarrow B$. Реакции первого порядка — самые распространенные в природе. Простые реакции первого порядка являются мономолекулярными. Сложные реакции, описываемые уравнением

$v = -\frac{dX}{dt} = k_I X$, и называются реакциями *псевдопервого порядка*.

В более сложных случаях скорость реакции нелинейным образом зависит от концентрации реагирующих веществ. В случае распада вещества это могут быть зависимости типа:

1. $v = -\frac{dX}{dt} = k_{II} X^2$ — реакции *второго (псевдовторого) порядка*

Простым примером реакции второго порядка может служить следующая схема: $A + B \rightarrow C$.

2. $v = -\frac{dX}{dt} = k_{III} X^3$ — реакции *третьего (псевдотретьего) порядка*.

Реакции третьего порядка встречаются крайне редко.

Простые реакции второго порядка являются бимолекулярными, простые реакции третьего порядка являются тримолекулярными.

Помимо реакций первого, второго и третьего порядков есть реакции *нулевого порядка*, скорость которых не зависит от концентрации вещества, вступающего в реакцию:

$$v = -\frac{dX}{dt} = k_0 X^0 = \text{const.}$$

Обычно это реакции, протекающие при избытке концентрации вещества X (кинетическая кривая 2, см. рис. 1.3).

Обобщая фактический материал, можно показать, что

$$v = -\frac{dX}{dt} = kA^m,$$

где k — коэффициент пропорциональности (константа скорости реакции), m — показатель степени (порядок реакции). В случае, если $m = 0, 1, 2, 3$, говорят о реакциях (псевдо)нулевого, (псевдо)первого, (псевдо)второго или (псевдо)третьего порядков. Заметим, что m принимает дробные значения только для сложных реакций.

Первые попытки связать концентрации нескольких реагирующих веществ и закономерности протекания химических превращений были приняты Л. Вильгельми в 1850 г. В 1862–1863 гг. их развили М. Бертли и Л. Пеан де сен Жиль. В 1883 г. В. Оствальд использовал скорость реакции для описания реакции омыления эфиров уксусной кислоты, выведя частное уравнение закона действующих масс. В 1883–1885 гг. Л. Шваб и Л. Райхер ввели понятие «константа скорости реакции» как коэффициента пропорциональности между скоростью реакции и концентрациями реагирующих веществ. В 1884–1887 гг. К. Гульдберг и П. Вагге сформулировали закон действующих масс. Частные формулировки этого закона можно встретить в работах Ф. Гаркура и В. Эссона (1866), Л. Пфаундлера (1867), А. Горстмана (1871), Я. Вант-Гоффа (1877, 1884), Д.П. Коновалова (1887). В 1879 г. Гульдберг и Вагге наиболее общим образом записали закон действующих масс.

Если в реакцию вступает несколько веществ $X_1, X_2, \dots, X_n$, то формально скорость реакции зависит от их концентраций следующим образом:

$$v = kX_1^{m_1} X_2^{m_2} \dots X_n^{m_n}, \quad (1.2)$$

где k — коэффициент пропорциональности (константа скорости); m_i — степени (порядок реакции).

Уравнение (1.2) называют кинетическим законом действующих масс.

Константа скорости химической реакции

Величину k в уравнении (1.2) называют *константой скорости химической реакции*. Константа скорости реакции тем больше, чем быстрее протекает химическая реакция. Она не меняется при од-

них и тех же условиях проведения эксперимента и не зависит от концентрации веществ, вступающих в реакцию. Константа скорости может изменяться при изменении условий проведения реакции (температура, давление, pH).

Константа скорости химической реакции отражает число активных соударений между молекулами веществ, вступающих в химическую реакцию, приводящих к образованию продуктов реакции. Если субстратом реакции является только одно вещество (например, для реакций распада), то константа скорости отражает вероятность химической трансформации молекул исходного вещества. Поэтому константа скорости реакции является одной из важнейших кинетических характеристик. Определение константы скорости реакции — одна из основных задач кинетического эксперимента.

Размерность константы скорости реакции зависит от порядка реакции. Для реакций первого порядка размерность константы скорости можно найти из уравнения Вант-Гоффа: $v = kX$, которые для левых и правых частей этого уравнения должны совпадать. Размерность скорости — [концентрация/время], концентрации — [концентрация]. Следовательно, размерность константы скорости первого порядка: $[1/\text{время}]$ (с^{-1} , мин^{-1}).

Аналогичным образом можно показать, что для реакций второго порядка размерность константы скорости — произведение обратных концентрации и времени ($\text{М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$, $\text{нМ}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$).

Порядок химической реакции

Величины $m_1, m_2, \dots, m_n$ называют *порядком реакции* по веществу $X_1, X_2, \dots, X_n$. Их сумму называют *[суммарным] порядком* реакции. Порядок реакции является одной из важнейших характеристик механизма протекания химической реакции. При этом величины m могут принимать целочисленные и дробные значения, а могут быть равны нулю. Величины m всегда неотрицательны. Для простых реакций (т.е. для реакций, протекающих без промежуточных соединений) величина m никогда не превышает трех.

Следует особенно отметить, что величина m — порядок реакции — отображает *механизм протекания* химической реакции, в отличие от стехиометрических коэффициентов, отражающих пропорции между реагирующими веществами. Поэтому порядок реакции обычно не равен сумме стехиометрических коэффициентов веществ, вступающих в реакцию.

Для простых реакций порядок отражает число активных со-

ударений между молекулами, вступающими в химическую реакцию. Исходя из пространственных соображений очевидно, что вероятность столкновения более чем трех молекул одновременно близка к нулю. Поэтому элементарные реакции с порядком выше третьего не описаны. Порядок элементарной реакции всегда целочисленный; порядок сложной реакции (содержащей промежуточные соединения) может быть целым и дробным. Следовательно, если порядок реакции дробный, то это сложная реакция; если порядок реакции целочисленный, ничего нельзя сказать о степени сложности механизма химической реакции.

Простые реакции первого порядка являются мономолекулярными, т.е. протекающими вследствие превращений одной молекулы. Простые реакции второго порядка являются бимолекулярными. Они протекают вследствие взаимодействия двух молекул. Простые реакции третьего порядка являются тримолекулярными, т.е. протекающими из-за взаимодействия трех молекул.

Заметим, что исторически Я. Вант-Гоффом (1884) понятия моно-, би- и тримолекулярных реакций было введено формально-математически как реакций, скорость которых описывается уравнением $v = kX^n$, где $n = 1, 2, 3$. Исходя из современных представлений, утверждение Вант-Гоффа верно лишь для простых реакций. Если же сложные реакции подчиняются уравнению Вант-Гоффа, то говорят о реакциях псевдопервого, псевдovторого или псевдотретьего порядков.

Отметим, что на определяемый из кинетического эксперимента порядок реакции может оказывать влияние соотношение концентраций реагирующих веществ. К примеру, порядок простой бимолекулярной реакции, протекающей в условиях избытка одного из реагирующих веществ, ошибочно может быть определен как первый.

Обратимые химические реакции

Помимо химических реакций, которые протекают в одном направлении, встречаются реакции, идущие как в сторону образования продуктов, так и в сторону их распада и образования субстрата реакции. Среди реакций данного класса особое место занимают *обратимые* реакции. Простая реакция (часть обратимой), идущая в сторону образования продуктов реакции, называется *прямой реакцией*, идущая в сторону образования субстратов реакции *обратной*.

Выделение прямой и обратной реакций является чисто условным. В любой момент времени в обратимых реакциях имеет место протекание как прямой, так и обратной реакции. Однако различение прямых и обратных реакций достаточно часто позволяет лучше понять механизм обратимых реакций, облегчает процедуру определения исследуемых кинетических параметров этой реакции.

Порядок прямой и обратной реакции может отличаться. Например, для схемы $A + B \leftrightarrow C$ порядок прямой реакции по веществам A и B — первый, суммарный порядок прямой реакции — второй. Порядок обратной реакции первый. Тогда скорость прямой реакции определяется как

$$v = k[A][B].$$

Скорость обратной реакции

$$v' = k' C.$$

Суммарная скорость реакции

$$v_{\Sigma} = v - v' = k[A][B] - k'[C].$$

Заметим, что размерности констант скоростей прямых и обратных реакций могут отличаться. В приведенном выше примере размерность константы скорости прямой реакции [концентрация/время], константы скорости обратной реакции — [1/время].

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение химической кинетики. 2. Перечислите основные факты из истории химической кинетики. 3. Каковы современные представления о механизмах химических реакций? 4. Какие виды химических реакций вы знаете? 5. Напишите уравнение Вант-Гоффа. 6. Приведите примеры простых и сложных реакций. 7. Дайте определение биокинетики. 8. Что общего и различного между биологической и химической кинетикой? 9. Что такое кинетический эксперимент? 10. Какие основные цели кинетического эксперимента? 11. Дайте определение основных параметров кинетического эксперимента. 12. Какой важнейший параметр кинетического эксперимента вы знаете? 13. От каких факторов зависит выбор метода исследования? 14. Перечислите основные виды и участки кинетических кривых. 15. Для каких целей используются интегральные и дифференциальные кривые? 16. Дайте определение скорости реакции. 17. Дайте определение константы скорости и порядка реакции. 18. Реакция образования сульфида кальция описывается уравнением $\text{Ca}^{++} + \text{S}^{--} \rightarrow \text{CaS}$. Каков порядок данной реакции? 19. Каковы размерности скорости, константы скорости и порядка реакции? 20. Чем отличаются понятия «скорость реакции», «начальная скорость реакции»? 21. Скорость реакции $A + B + C \rightarrow D$ следующим образом зависит от концентраций реагирующих веществ:

$v = -k[A][B]^2[C]^0$. Каков порядок этой реакции? Какую размерность имеет константа скорости? Является ли данная реакция простой? 22. Сформулируйте закон действующих масс. 23. Какие факторы могут привести к изменению константы скорости реакции? 24. Что отражает константа скорости реакции? 25. Равны ли размерности констант скорости прямой и обратной реакции? 26. Какую информацию можно получить из кинетических кривых, приведенных на рис. 1.3? Постройте интегральные и дифференциальные кривые. 27. Составьте план проведения нескольких кинетических экспериментов. 28. Дайте определение субстратам, интермедиатам и продуктам реакции. 29. Запишите закон действующих масс для реакций: а) $A + 2B \rightarrow 3C$; б) $A + B + C \rightarrow D + E$; в) $A + 2B \leftrightarrow C \rightarrow D + F$. 30. Может ли реакция нулевого порядка быть простой? 31. Что можно сказать о механизме реакции (простая она или сложная), если порядок реакции равен: а) 0,5; б) 1; в) -2; г) 4; д) 1,95; е) 2,7? 32. Известно, что некоторая реакция является простой. Определенный экспериментально порядок реакции — второй. Следует ли из этого, что данная реакция является бимолекулярной, мономолекулярной, тримолекулярной? То же, если порядок реакции третий, то же, если реакция сложная?

1.2. Определение константы скорости и порядка реакции

Ибо мы должны не только копить мудрость,
но и извлекать из нее пользу.

Цицерон

В предыдущем параграфе были введены важнейшие кинетические понятия: *скорость реакции*, *константа скорости реакции* и *порядок реакции*. Связь между ними определяется законом действующих масс, предложенного скандинавами К. Гульдбергом

и П. Вааге в 1879 г.: $v = kX_1^{n_1} X_2^{n_2} \dots X_n^{n_n}$.

Определение порядка реакции и константы скорости на основании результатов кинетических экспериментов является одной из важнейших задач химической кинетики. Для того, чтобы определить константу скорости реакции и ее порядок, используют различные методические приемы. Большинство из них основаны на поиске спрямляющих координат, в которых порядок реакции и константа скорости определяются по тангенсу угла наклона экспериментальной прямой или по точке пересечения с одной из осей. Рассмотрим эти методы на конкретных примерах.

Пример 1.1* [1]. Определить константу скорости и порядок реакции термического распада хлористого гидразония в смеси с гидразином при 185°C.

Для решения поставленной задачи определим условия проведения кинетического эксперимента.

Измеряемым параметром является концентрация хлористого гидразония (или продуктов его распада).

Так как связь между константой скорости, концентрациями реагирующих веществ и скоростью реакции определяется при помощи закона действующих масс [уравнение (1.2)], то для того, чтобы определить константу скорости реакции, вначале необходимо найти зависимость скорости реакции от концентрации веществ, вступающих в реакцию.

С другой стороны, как было показано ранее в § 1.1, для того чтобы найти скорость реакции, необходимо определить зависимость измеряемого параметра от времени протекания химической реакции [уравнения (1.1) и (1.1')].

Таким образом, для определения скорости реакции необходимо провести серию экспериментов. В первой серии экспериментов переменным параметром является время реакции распада. Во второй серии экспериментов переменным параметром является концентрация реагирующих веществ. Исследуется зависимость скорости от переменной концентрации реагирующих веществ.

Для корректной постановки кинетического эксперимента данная серия опытов должна проводиться в двух различных вариантах. В первом случае концентрация хлористого гидразония фиксируется, а концентрация гидразина меняется. Во втором случае фиксируется концентрация гидразина, а концентрация хлористого гидразония остается постоянной. Только такая постановка опытов позволит корректно определить порядок реакции по каждому из веществ, вступающих в реакцию. Постоянными параметрами являются температура, давление, влажность и т.д. Результаты серии экспериментов по изучению кинетики гидролиза хлористого гидразония представлены в табл. 1.1.

Для наглядности эти данные удобнее привести в виде графика зависимости скорости реакции от концентрации реагирующих веществ (рис. 1.8). Эти графики являются линейными, т.е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации реагирующих веществ или

* Ряд использованных в гл. 1, 2 примеров взяты из книги [1]. Условия задач переформулированы.

**Зависимость скорости термического распада хлористого гидразония
от концентрации реагентов**

а) концентрация хлористого гидразония равна 17,81 М

$\nu \cdot 10^4, \text{ М/с}$	27,7	27,4	26,1	21,9	10,5	9,86	6,48
$[\text{N}_2\text{H}_4], \text{ М}$	12,7	12,5	11,9	10,0	4,8	4,5	12,96

б) концентрация гидразина равна 1,71 М

$\nu \cdot 10^4, \text{ М/с}$	3,57	3,34	3,30	2,58	2,29	2,24	2,19
$[\text{N}_2\text{H}_5\text{Cl}], \text{ М}$	17,0	15,9	15,7	12,3	10,9	10,6	10,4

$$\nu = kX_1X_2,$$

где ν — скорость реакции; k — константа скорости реакции; X_1 и X_2 — концентрации реагирующих веществ.

Таким образом, данная реакция является реакцией первого порядка по каждому из реагирующих веществ; суммарный порядок реакции — второй.

Исходя из уравнения скорости реакции можно найти константу скорости по тангенсу угла наклона прямой в координатах (ν, X) . Для этого зафиксируем концентрацию какого-либо из веществ. Пусть для определенности это будет концентрация вещества X_1 . Тогда константу скорости реакции можно найти по тангенсу угла наклона прямой, построенной при переменной концентрации вещества

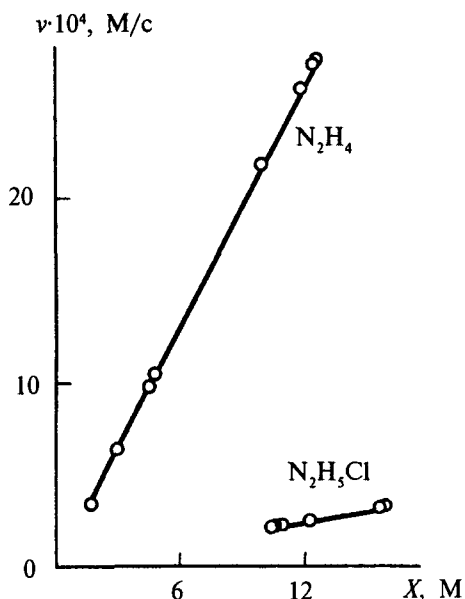


Рис. 1.8. Кинетика термического распада хлористого гидразония

$X_2: k = \operatorname{tg} \alpha / X_1$. Таким образом, $k = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Однако следует заметить, что для более сложных реакций график типа показанного на рис. 1.8 будет нелинейного характера. При этом, как правило, определить количественные характеристики из нелинейных графиков не представляется возможным; нелинейные графики обычно используются для качественной оценки. Таким образом, для определения константы скорости и порядка реакции необходимо найти спрямляющие координаты.

Достаточно часто в кинетике спрямляющими являются логарифмические и полуллогарифмические координаты. В логарифмических координатах по каждой из осей вместо исходной величины берется ее логарифм.

Перебирая координаты ($v, \log X$) [$\log$ — логарифм с произвольным основанием], ($\log v, X$) и ($\log V, \log X$), можно показать, что для реакции любого порядка спрямление достигается лишь в последних координатах (рис. 1.9). При этом вычислить логарифмы можно с помощью калькулятора (компьютера), найти по таблицам или не вычислять логарифмы, построив график на логарифмической бумаге. Логарифмическая бумага специальным образом расчерчена так, что каждое

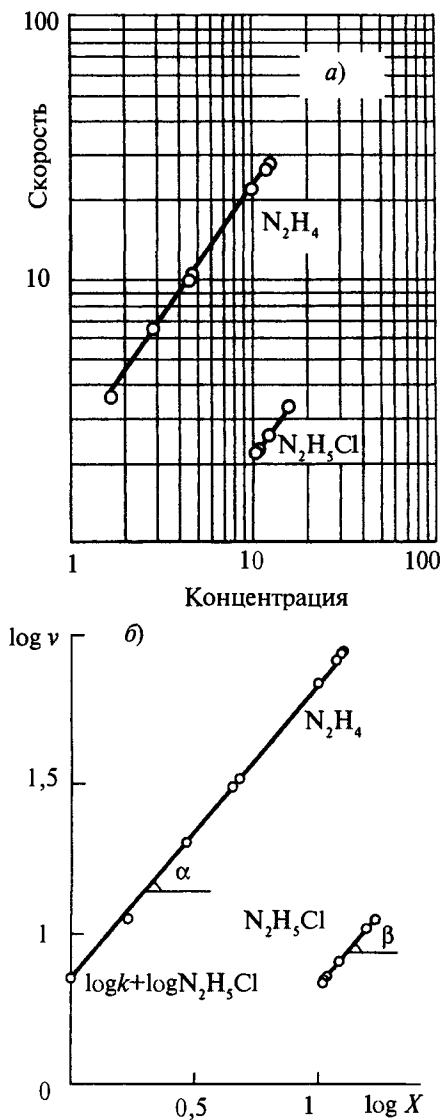


Рис. 1.9. Кинетика термического распада хлористого гидразония, представленная в логарифмических координатах.

a — использование логарифмической бумаги; *b* — непосредственное вычисление логарифмов.

деление представляет собой единицу по логарифмической шкале (рис. 1.9а), поэтому расстояния между делениями отличаются друг от друга.

Чтобы понять механизм спрямления в логарифмических координатах, запишем закон действующих масс (1.2) для реакции распада хлористого гидразона: $v = kX_1^a X_2^b$.

Возьмем логарифм правой и левой части этого уравнения (это аналогично переходу от координат (v , X) к логарифмическим координатам): $\log v = \log k + a \log X_1 + b \log X_2$.

Следовательно, тангенс угла наклона в логарифмических координатах равен порядку реакции, а пересечение с осью ординат (осью Y) равно логарифму константы скорости реакции. Как видно из рис. 1.9б, зависимости скорости реакции от концентрации реагирующих веществ представлены параллельными прямыми с тангенсом угла наклона, равным единице. Этот тангенс угла наклона соответствует порядку реакции. Из рис. 1.9б находим $a = b = 1$, $k = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Универсальный метод определения порядка и константы скорости химической реакции

Для реакций произвольного порядка константу скорости реакции можно найти, логарифмируя уравнение закона действующих масс $v = kX^m$:

$$\log v = \log k + m \log X. \quad (1.3)$$

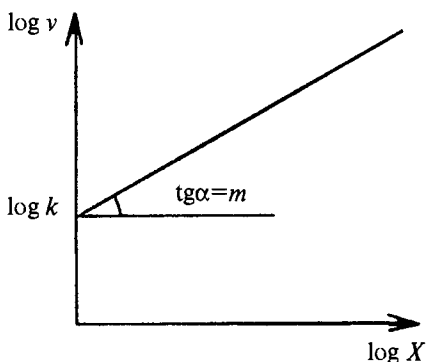


Рис. 1.10. Определение константы скорости и порядка произвольной реакции в логарифмических координатах.

Тангенс угла наклона в логарифмических координатах ($\log v$, $\log X$) равен *порядку* реакции по веществу X , пересечение с осью ординат равно логарифму константы скорости реакции (рис 1.10).

Для того чтобы определять порядок реакции рассмотренным выше способом, необходимо провести серию опытов. Это трудоемкий и длительный процесс. Можно ли избежать его? Оказывается, можно.

В кинетике показано, что наиболее информативным является определение в исследовании начальных скоростей реакции или

Начальные скорости реакции веществ *A* и *B*

$v_0 \cdot 10^7, \text{ М/с}$	4,06	12,10	4,20	36,80
$A_0 \cdot 10^3, \text{ М}$	2,15	6,38	10,00	10,00
$B_0 \cdot 10^3, \text{ М}$	15,10	15,10	3,36	29,40

тех скоростей реакции, которые наблюдаются при начальной концентрации веществ. Для того чтобы показать, как по начальным скоростям определяется порядок реакции, рассмотрим следующий пример.

Пример 1.2 [1]. Определить порядок реакции 2-фенил-4,4-диметил-2-оксазолин-5-она (вещество *A*) с эфиром аланина (вещество *B*) по начальным скоростям реакции.

Аналогично предыдущему примеру измеряемым параметром является концентрация одного из реагирующих веществ или концентрация продукта реакции. Переменными параметрами являются время реакции и концентрации веществ, вступающих в реакцию. При этом, аналогично предыдущему примеру, для определения скорости реакции проводится серия экспериментов.

Результаты определения зависимости начальных скоростей реакции (v_0) от начальных концентраций (X_0) реагирующих веществ приведены в табл. 1.2.

Запишем уравнение (1.3) столько раз, при скольких начальных концентрация вещества *A* измерялась скорость реакции (верхний индекс означает номер опыта): $\log v_0^{(1)} = \log k + m_A \log A_0^{(1)} + m_B \log B_0$; $\log v_0^{(2)} = \log k + m_A \log A_0^{(2)} + m_B \log B_0$, где m_A и m_B — порядок реакции по соответствующим веществам; B_0 — фиксированная концентрация вещества *B* при переменной концентрации вещества *A*.

Найдем, например, порядок реакции по веществу *A*. Чтобы решить поставленную задачу, будем рассуждать следующим образом. Уравнение (1.3) верно при любых скоростях и любых концентрациях. Следовательно, оно верно и при начальных концентрациях веществ, и при начальных скоростях реакции.

Очевидно, что порядок реакции можно найти, вычитая из одного уравнения другое: $\log v_0^{(1)} - \log v_0^{(2)} = 0 + m_A \log A_0^{(1)} - m_A \log A_0^{(2)}$.

$$\text{Или после преобразований} \quad m_A = \frac{\log (v_0^{(1)}/v_0^{(2)})}{\log (A_0^{(1)}/A_0^{(2)})}.$$

Рассуждая аналогичным образом, можно вывести уравнение для определения порядка реакции по веществу *B*.

Подставляя экспериментальные данные, получаем $m_A = m_B \approx 1$, т.е. порядок реакции по каждому из веществ является первым, суммарный порядок реакции — вторым.

Определение порядка реакции по начальным скоростям

Чтобы определить порядок реакции по начальным скоростям реакции, используют следующее уравнение:

$$m = \frac{\log(v_0^{(1)} / v_0^{(2)})}{\log(X_0^{(1)} / X_0^{(2)})}, \quad (1.4)$$

где нижний индекс «0» означает начальные величины для концентрации реагирующих веществ и их скоростей реакции, а верхний индекс — номер опыта.

Заметим, что при вычислении порядка реакции по уравнению (1.4) в расчет принимаются только две точки. Поэтому вероятность ошибки по формуле (1.4) достаточно велика. Следовательно, формула (1.4) может использоваться лишь как оценочная.

Таким образом, для того чтобы точно определять константу скорости и порядок химических реакций описанными выше способами, необходимо провести серию экспериментов и найти зависимость скорости реакции от концентрации реагирующих веществ. Это трудоемкий процесс, требующий большого числа реактивов и больших вычислительных затрат для определения скорости реакции. Поэтому рассмотрим метод определения порядка реакции и константы скорости реакции исходя из данных кинетического эксперимента. Для этого приведем еще два примера.

Пример 1.3 [1]. Определить константу скорости и порядок реакции обесцвечивания профлавина под действием ультрафиолетового света.

Измеряемым параметром является концентрация профлавина или продуктов его обесцвечивания. Так как профлавин является красителем с максимумом поглощения при длине волны $\lambda = 444$ нм, то удобнее всего изме-

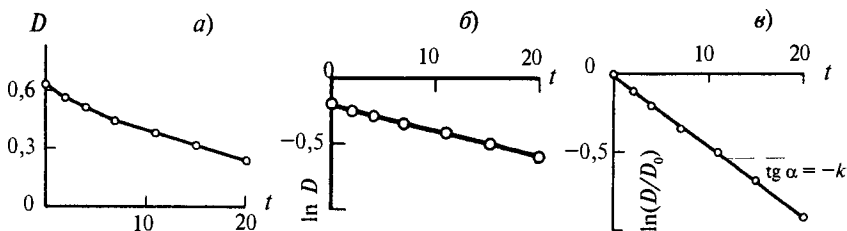


Рис. 1.11. Кинетика обесцвечивания профлавиана под действием ультрафиолетового света.

a — экспериментальные данные; *б* — спрямление экспериментальных данных в полулогарифмических координатах; *в* — определение константы скорости

Таблица 1.3

Обесцвечивание профлавина под действием ультрафиолетового света

Время, мин	0	2	4	7	11	15	20
<i>D</i>	0,63	0,56	0,51	0,44	0,38	0,32	0,25

Таблица 1.4

Образование вещества *C* из веществ *A* и *B*

Время, с	700	1700	2700	3700	4700	5700	6700	7700	8700	9700
$C \cdot 10^3 \text{ М}$	1,59	3,30	4,55	5,52	6,27	6,88	7,36	7,76	8,10	8,36

рять оптическую плотность D раствора профлавина в зависимости от времени обесцвечивания (переменный параметр). Концентрация профлавина линейным образом связана с его оптической плотностью. Эта связь определяется законом Бугера–Ламберта–Бэра:

$$D = \lg I_0/I = X\varepsilon(\lambda)l,$$

где I_0 и I — интенсивность входящего и выходящего из образца света, X — концентрация исследуемого вещества, ε — коэффициент экстинкции, зависящий от длины волны (λ), l — толщина исследуемого образца.

Результаты измерений оптической плотности профлавина приведены в табл. 1.3.

Нетрудно заметить, что график в координатах (D , t) нелинеен (рис. 1.11а). Перебрав различные координаты, можно показать, что результаты кинетических исследований обесцвечивания профлавина линеаризуются в полулогарифмических координатах ($\ln D$, t) (рис. 1.11б). Природу этого спрямления мы рассмотрим позднее, после следующего примера.

Пример 1.4 [1]. Определить константу скорости реакции и порядок по каждому из веществ в реакции между 2-фенил-4,4-диметил-2-оксазолил-5-оном (вещество *A*) и этиловым эфиром DL-аланина (вещество *B*) в четыреххлористом углероде.

В данной реакции наиболее удобным измеряемым параметром является продукт реакции, этиловый эфир-N-(N'-бензоил-α-аминоизобутирил)-DL-аланина (вещество *C*). Переменным параметром является время реакции.

Экспериментальные данные по образованию вещества *C* при 20°C приведены в табл. 1.4. Начальные концентрации веществ *A* и *B* равны $9,96 \cdot 10^3 \text{ М}$ и $2,22 \cdot 10^4 \text{ М}$ соответственно.

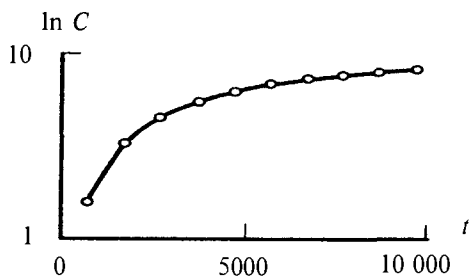


Рис. 1.12. Кинетика образования вещества C из веществ A и B (пример 1.4).

Из рис. 1.12 видно, что в данном случае линейаризация в координатах (C, t) и в координатах $(\ln C, t)$ не достигается.

Определение константы скорости реакции первого порядка

Можно предположить, что рассмотренные реакции отличаются механизмом, а именно порядком реакции. Чтобы объяснить, почему для одних реакций координаты $(\ln X, t)$ являются спрямляющими, а для других нет, проанализируем уравнение, содержащее зависимость скорости реакции от времени. Для простоты рассмотрения ограничимся случаем, когда вещество X является субстратом реакции:

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX^m.$$

Это дифференциальное уравнение является уравнением с разделяющимися переменными. Следовательно, его легко можно решить. Однако решение данного дифференциального уравнения зависит от m — порядка реакции. Действительно, после преобразований получаем

$$-\frac{dX}{X^m} = dt.$$

Из теории дифференциального и интегрального исчисления известно, что:

$$\int \frac{dx}{x^m} = \begin{cases} \ln x, & m = 1 \\ \frac{1-m}{x^{m-1}}, & m \neq 1 \end{cases}.$$

Поэтому для реакций каждого порядка данное уравнение следует решать отдельно.

Для реакций (псевдо)первого порядка:

$$v = -\frac{dX}{dt} = kX; \quad \frac{dX}{X} = -kdt;$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_0^t kdt ;$$

$$\ln X - \ln X_0 = -kt.$$

Следовательно,

$$-kt = \ln \frac{X}{X_0}; kt = \ln \frac{X_0}{X}. \quad (1.5)$$

Таким образом, для реакций (псевдо)первого порядка спрямляющими являются полулогарифмические координаты $(\ln X, t)$. В координатах $(\ln (X_0/X), t)$ тангенс угла наклона равен константе скорости реакции.

Действительно, в примере 1.3 спрямляющими оказались полулогарифмические координаты (см. рис. 1.11б). Следовательно, реакция обесцвечивания профлавина под действием ультрафиолетового света является реакцией первого порядка. В координатах $[\ln (D/D_0), t]$ (см. рис. 1.11в) находим константу скорости реакции, равную $4,6 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$.

Время полупревращения

У реакций (псевдо)первого порядка есть одно интересное свойство: время полупревращения (т.е. то время, за которое субстрат реакции наполовину уменьшит свою концентрацию по сравнению с начальной) в этих реакциях *не* зависит от начальной концентрации субстрата. Действительно, из (1.5) получаем

$$\ln \frac{A_0}{A} = \ln \frac{2}{1} = k\tau_{1/2},$$

где $\tau_{1/2}$ — время полупревращения.

Тогда

$$\tau_{1/2} = 0,693/k. \quad (1.6)$$

Пример 1.5 [1]. Определить порядок и константу скорости реакции обмена 5-Н-пиримидинового кольца на дейтерий при обработке 2',3'-0-изопропиленуридина смесью CH_3ONa и CH_3OD .

В результате нескольких опытов было показано, что время полупревращения

шения не зависит от концентрации веществ, вступающих в реакцию, и равно 2,84 ч. Следовательно, это реакция первого порядка. Константа скорости по формуле (1.6) равна $0,051 \text{ мин}^{-1}$.

Определение константы скорости реакции произвольного порядка

Для того чтобы получить уравнения, аналогичные уравнению (1.5) для реакций более высоких порядков, чем первый, запишем кинетические уравнения закона действующих масс.

Для реакций второго порядка $A + A \rightarrow B$ уравнение закона действующих масс преобразуется следующим образом:

$$-\frac{dX}{dt} = kX^2; \quad -\frac{dX}{X^2} = kdt; \quad \frac{1}{X} - \frac{1}{X_0} = kt.$$

Таким образом, для реакций второго порядка спрямляющими являются координаты $(1/X - 1/X_0, t)$. Тангенс угла наклона в этих координатах равен константе скорости реакции.

Аналогичным образом для реакций второго порядка $A + B \rightarrow C$ при $B \gg A$ спрямляющими являются координаты $[\ln(A/B_0), t]$. Для реакций третьего порядка $A + A + A \rightarrow B$ спрямляющими являются координаты $(1/X_2 - 1/X_0^2, t)$. Для реакций третьего порядка $A + B + C \rightarrow D$ спрямляющие координаты имеют очень сложный вид.

Пример 1.4 (продолжение). Теперь, когда основные методы определения константы скорости рассмотрены, вернемся к решению примера 1.4. Запишем уравнение скорости:

$$\frac{dC}{dt} = kA^a B^b,$$

где a и b — порядок скорости реакции по соответствующим веществам. Решим данное уравнение вначале для самого простого случая, когда $a = b = 1$.

Тогда:

$$\frac{dC}{dt} = k(A_0 - C)(B_0 - C).$$

Откуда

$$kt = \frac{1}{A_0 - B_0} \ln \frac{B_0(A_0 - C)}{A_0(B_0 - C)}.$$

Действительно, в координатах

$(\ln \frac{B_0(A_0 - C)}{A_0(B_0 - C)}, t)$ экспе-

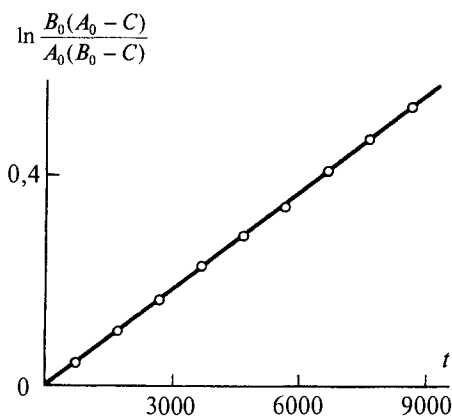


Рис. 1.13. Определение константы скорости второго порядка

риментальные данные спрямляются (рис. 1.13). Следовательно, данная реакция имеет первый порядок по веществам A и B и суммарный порядок, равный двум.

Заметим, что если бы спрямить экспериментальные данные в предположении $a = b = 1$ не удалось, то пришлось бы делать другие предположения относительно величин a и b .

Метод Гуттенгейма

Измерение концентрации реагирующих веществ — сложный и трудоемкий процесс. Достаточно часто в эксперименте вместо концентрации вещества измеряются физические величины, прямо пропорционально связанные с концентрацией исследуемого вещества (оптическая плотность, оптическое вращение, намагничиваемость и т.д.).

В ряде случаев переход от физических величин к концентрациям элементарен. Так, например, связь между оптической плотностью и концентрацией вещества определяется законом Бугера—Ламберта—Бэра. При этом коэффициенты экстинкции (пропорциональности между концентрацией и оптической плотностью) для большинства веществ известны, и их можно найти из справочника. Другие физические величины (намагничиваемость) более сложно связаны с концентрациями, и (или) коэффициенты пропорциональности между этими величинами и концентрациями реагирующих веществ для многих веществ неизвестны или не включены в доступные справочники.

В связи с вышесказанным при кинетических исследованиях достаточно часто возникает вопрос о непосредственном определении порядка реакции и константы скорости исходя из измеренных непосредственно в эксперименте физических величин, без их пересчета в концентрацию реагирующих веществ.

Подобные методы в кинетике разработаны в основном для наиболее распространенных в природе реакций, а именно реакций первого порядка. Рассмотрим только один такой способ, называемый *методом Гуттенгейма*. Чтобы проиллюстрировать метод Гуттенгейма, рассмотрим следующий пример.

Пример 1.6 [1]. Определить константу скорости и порядок реакции обесцвечивания профлавина под действием ультразвука (880 кГц , 2 Вт/см^2)*.

Измеряемым параметром в данном эксперименте является концентрация профлавина или продуктов его обесцвечивания. Так как профлавин — краситель с максимумом поглощения при длине волны $\lambda = 444 \text{ нм}$, то удобнее всего измерять оптическую плотность раствора профлавина в зави-

* Ранее (в примере 1.3) было рассмотрено обесцвечивание профлавина под действием ультрафиолета. Так как факторы, вызывающие обесцвечивание профлавина, в данных задачах различны, то следует ожидать различий в кинетике обесцвечивания.

Кинетика обесцвечивания профлавина под действием ультразвука

Время, мин	0	10	20	30	40	50	60	80	100	120	140	160	180	240
D	0,635	0,525	0,46	0,4	0,37	0,33	0,3	0,24	0,19	0,16	0,15	0,14	0,13	0,13

симости от времени обесцвечивания (переменный параметр). Разумеется, можно, как и ранее (см. пример 1.3), перевести оптическую плотность в концентрацию. Однако если бы это были электропроводимость раствора, степень намагничиваемости и т.п., то такой переход был бы весьма проблематичен.

Результаты экспериментов по обесцвечиванию профлавина приведены в табл. 1.5.

Графически экспериментальные данные представлены на рис. 1.14а. Этот график нелинеен. Кроме того, экспериментальные данные не линеаризуются в полулогарифмических координатах (рис. 1.14б). Следовательно, методы анализа кинетических кривых, рассмотренные ранее, являются неприемлемыми для данного случая.

При анализе кинетики обесцвечивания профлавина под действием ультразвука обращает на себя внимание тот факт, что даже при продолжительном протекании этой реакции 100%-ного обесцвечивания профлавина не происходит. Поэтому можно предположить, что данная реакция сопряжена с накоплением какого-то окрашенного вещества (вещество X). Действительно, при незначительном протекании реакции обесцвечивания профлавина зависимость логарифма оптической плотности от времени реакции имеет линейный характер (рис. 1.14б). Попытаемся нивелировать накопление вещества X с помощью метода Гуттенгейма.

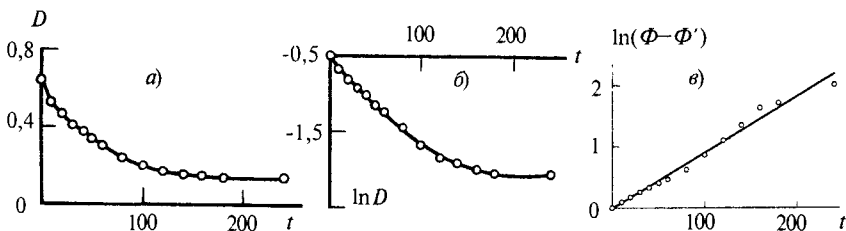


Рис. 1.14. Кинетика обесцвечивания профлавина под действием ультразвука (см. пример 1.6).

a — экспериментальные данные; $б$ — полулогарифмические координаты; $в$ — метод Гуттенгейма.

Чтобы получить описание реакции в данном случае, перепишем уравнение (1.1) следующим образом:

$$\frac{d\Phi}{dt} = -k\Phi,$$

где Φ — измеряемая в эксперименте физическая величина, которая является линейной функцией концентрации изучаемого вещества.

Тогда

$$\frac{d\Phi}{\Phi} = -kdt,$$

$$\Phi = \Phi_0 \exp[-kt].$$

Или, что то же самое (если начальный момент реакции не был зафиксирован)

$$\Phi_t - \Phi_\infty = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-kt],$$

где Φ_∞ — величина Φ , достигаемая при бесконечно большом времени реакции.

Дадим приращение времени реакции, равное Δ . Тогда для произвольных времен t_1 и t_2 получим следующие уравнения:

$$\Phi_1 - \Phi_\infty = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-kt_1];$$

$$\Phi_1' - \Phi_\infty = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-k(t_1 + \Delta)];$$

$$\Phi_2 - \Phi_\infty = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-kt_2];$$

$$\Phi_2' - \Phi_\infty = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-k(t_2 + \Delta)],$$

где Φ' — значение Φ при увеличении времени наблюдения на Δ .

Или:

$$\Phi_1 - \Phi_1' = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-kt_1](1 - \exp[-k\Delta]);$$

$$\Phi_2 - \Phi_2' = (\Phi_0 - \Phi_\infty) \exp[-kt_2](1 - \exp[-k\Delta])$$

В общем случае

$$\Phi_i - \Phi_i' = A \exp[-kt_i],$$

где A — константа.

Тогда:

$$\ln(\Phi - \Phi') = \text{const} - kt.$$

Таким образом, в случае, если изучаемая реакция имеет (псевдо)первый порядок, то график в координатах $[\ln(\Phi - \Phi'), t]$ линейен с тангенсом угла наклона $-k$.

В данном примере экспериментальные данные действительно линеаризуются в координатах $[\ln(\Phi - \Phi'), t]$ (рис. 1.14б). Тем самым метод Гугенгейма за счет использования не самой величины Φ , а разницы $\Phi - \Phi'$

позволил нивелировать накопление вещества X . Из графика находим $k = 2,14 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ (см. рис. 1.14б)*.

Таким образом, метод Гуггенгейма основан на линеаризации экспериментальных данных в координатах $[\ln (\Phi - \Phi'), t]$, где Φ — физическая величина, линейным образом связанная с концентрацией изучаемого вещества; Φ' — эта же физическая величина, измеренная при небольшом увеличении времени протекания химической реакции. Тангенс угла наклона экспериментальной прямой для реакций (псевдо)первого порядка равен $-k$. Для реакций других порядков данный метод неприменим.

Определение порядка обратимых реакций**

Для обратимых реакций $nB \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} C$ порядок можно опреде-

лить исходя из следующих соображений. Пусть k_{+1} — константа скорости прямой реакции, k_{-1} — константа скорости обратной реакции. Их отношение — равновесная константа: $K = k_{-1}/k_{+1}$.

Скорость реакции по веществу B исходя из закона действующих масс (1.2) записывается следующим образом:

$$\frac{dB}{dt} = -k_{+1}B^n + k_{-1}C.$$

График зависимости концентрации вещества C от времени приведен на рис. 1.15. Как видно, с течением времени концентрация вещества C нарастает не до бесконечности, что связано с ограниченностью запасов субстратов реакции. Концентрация вещества C возрастает лишь до асимптоты C_p . Эта асимптота — равновесная концентрация вещества C . Данная концентрация достигается лишь при бесконечно большом времени реакции. Однако при меньших временах реакции концентрация вещества C практически неотличима от равновесной (заштрихованная область рисунка). На практике именно эту концентрацию (C_∞) считают равновесной. Достижение заштрихованной области считают достижением практически полного равновесия химической реакции. Равновесие химической реакции означает, что скорость реакции равна нулю. Тогда $0 = -k_{+1}B_p^n + k_{-1}C_p$.

* В случае обесцвечивания профлавина под действием ультрафиолетового света константа скорости примерно в два раза больше. Таким образом, различные факторы, вызывающие обесцвечивание профлавина, приводят к разной кинетике этого процесса.

** Более подробно вопросы определения констант скоростей и порядков обратимых реакций рассмотрены в главах 2, 3 (кинетика фермент-субстратного и лиганд-рецепторного взаимодействия).

Перенеся члены со знаком «минус» в левую часть уравнения, разделив полученное равенство на константу скорости прямой реакции и на концентрацию вещества B_p и прологарифмировав результат, получим

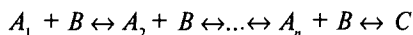
$$\log \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \log \frac{B_p^n}{C_p}.$$

Обозначим отношение констант скоростей k_{-1}/k_{+1} как K и назовем эту величину *константой равновесия для обратимой реакции*. Тогда

$$\log C_p = n \log B_p - \log K. \quad (1.7)$$

Таким образом, для обратимых реакций спрямляющими являются координаты $(\log C_p, \log B_p)$. Тангенс угла наклона в этих координатах равен порядку реакции, а пересечение с осью абсцисс (ось X) — логарифму равновесной константы (рис. 1.16).

Следует отметить, что для реакций типа



координаты $(\log C, \log B)$ в большинстве случаев также являются спрямляющими с тангенсом угла наклона, меньшим или равным n , однако точка пересечения с осью абсцисс отлична от логарифма равновесной константы.

Закключение

Таким образом, константу скорости и порядок реакции находят разными методами.

1. По начальным скоростям реакции порядок реакции равен

$$\frac{\log (v_0^{(1)}/v_0^{(2)})}{\log (X_0^{(1)}/X_0^{(2)})}.$$

2. В координатах $(\log v, \log X)$ порядок реакции — тангенс угла

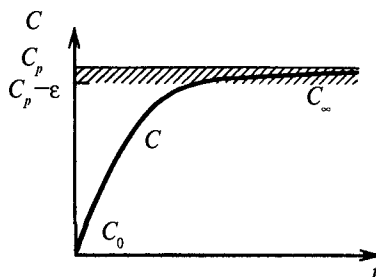


Рис. 1.15. Изменение концентрации вещества C в процессе обратимой реакции $nB \leftrightarrow C$.

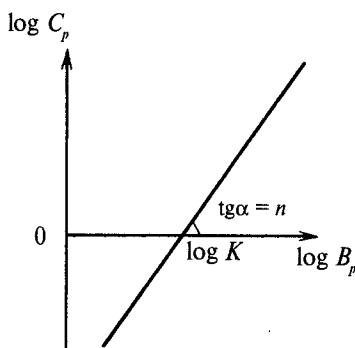


Рис. 1.16. Определение порядка и равновесной константы обратимой реакции.



Семенов Н.Н.
(1896–1986)

Физикохимик. Занимался исследованием цепных реакций. Разработал теорию разветвленных цепных реакций. В 1956 г. ему присуждена Нобелевская премия по химии (вместе с С. Сирилом и Н. Хиншелвудом).

наклона, константа скорости — пересечение графика с осью ординат (ось Y).

3. В спрямляющих координатах для реакций первого порядка ($\log X, t$), для реакций второго порядка ($1/X, t$), для реакций третьего порядка ($1/X^2, t$).

4. Для реакций (псевдо)первого порядка константа скорости реакции равна тангенсу угла наклона в координатах $[\ln (\Phi - \Phi'), t]$, где Φ — измеряемая в эксперименте физическая величина, линейно связанная с концентрацией одного из веществ, участвующих в реакции; Φ' — эта же величина, измеренная при небольшом увеличении времени протекания химической реакции.

5. Для обратимых реакций $nB \leftrightarrow C$ порядок равен тангенсу угла наклона в координатах $(\log C_p, \log B_p)$; точка пересечения с осью абсцисс равна логарифму равновесной константы этой реакции.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение константы скорости и порядка реакции. Почему они являются важнейшими кинетическими параметрами? Какова их размерность? 2. Какое уравнение связывает концентрации реагирующих веществ и скорость реакции? 3. Какие методы определения порядка реакции и константы скорости реакции вы знаете? Какие из них применимы только для: а) простых реакций, б) сложных реакций, в) для простых и для сложных реакций? Какие из этих методов зависят от порядка реакции? 4. Почему для реакций первого порядка разработано наибольшее количество методов определения константы скорости? 5. Выведите основные уравнения данного раздела. Какие из них применимы к реакциям нулевого порядка, к обратимым реакциям? 6. Можно ли по времени полупревращения определить порядок реакции, константу скорости? 7. Существуют ли максимальные и минимальные значения: а) порядков реакции, б) константы скорости реакции? Если существуют, то с чем они связаны?

1.3. Кинетика сложных реакций

В сложившейся практике «сложными» принято называть реакции, параметры которых нельзя определить.

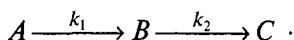
Шарль О'Тан

В § 1.1 было введено понятие сложных реакций. Реакция называется сложной, если химическое превращение в ней от исходных веществ к продуктам осуществляется более чем за один элементарный акт. К сложным реакциям относятся обратимые, циклические, параллельные, последовательные, каскадные и смешанные.

Кинетика обратимых реакций была рассмотрена в § 1.1 и 1.2. Кроме того, обратимые реакции рассмотрены в гл. 2 и 3 применительно к ферментативной кинетике и кинетике лиганд-рецепторного взаимодействия. В настоящем параграфе будут рассмотрены кинетические методы анализа последовательных и параллельных реакций.

Кинетика последовательных реакций

Простейшую схему последовательной реакции можно записать следующим образом:



Дифференциальные уравнения закона действующих масс для данной схемы запишутся следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dA}{dt} = -k_1 A \\ \frac{dB}{dt} = k_1 A - k_2 B \\ \frac{dC}{dt} = k_2 C . \end{cases}$$

Одно из уравнений полученной системы можно исключить, используя закон материального баланса $A = A_0 - B - C$:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_1 A_0 - (k_1 + k_2) B - k_1 C \\ \frac{dC}{dt} = k_2 B . \end{cases}$$



Эмануэль Н.М.

(1915–1984)

Физикохимик. Основные работы посвящены кинетике цепных окислительных процессов. Основатель количественной онкологии.

Полученная система дифференциальных уравнений является линейной. Следовательно, ее можно решить с помощью метода неопределенных коэффициентов или преобразований Лапласа (см. гл. 6).

Преобразования Лапласа позволяют заменить исходное дифференциальное уравнение на алгебраическое, содержащее комплексную переменную s (аналог времени). При этом дифференциалу dx/dt на комплексной плоскости соответствует выражение $sx - x_0$, константе a — член a/s , многочлену $(bx + cy)$ — тот же многочлен.

Тогда на комплексной плоскости полученная система дифференциальных уравнений запишется следующим образом:

$$\begin{cases} sB - B_0 = \frac{k_1 A_0}{s} - (k_1 + k_2)B - k_1 C \\ sC - C_0 = k_2 B \end{cases}$$

Учитывая, что в начальный момент времени реакции концентрации веществ B и C равны нулю, получаем:

$$\begin{cases} sB = \frac{k_1 A_0}{s} - (k_1 + k_2)B - k_1 C \\ sC = k_2 B \end{cases}$$

Следовательно:

$$\begin{cases} C = \frac{k_2 B}{s} \\ sB = \frac{k_1 A_0}{s} - (k_1 + k_2)sB - \frac{k_1 k_2 B}{s} \end{cases}$$

Откуда

$$B \left[s^2 + (k_1 + k_2)s + k_1 k_2 \right] = k_1 A_0$$

$$B = \frac{k_1 A_0}{(s + k_1)(s + k_2)}.$$

Для того чтобы выразить зависимость $B(t)$, воспользуемся обратными преобразованиями Лапласа, позволяющими перейти от комплексной пере-

менной s к действительному времени. Используя таблицу обратных преобразований Лапласа (гл. 6), получаем

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (\exp[-k_1 t] - \exp[-k_2 t]) .$$

Найдем C :

$$C = \frac{k_2 B}{s} = \frac{k_1 k_2 A_0}{s(s + k_1)(s + k_2)} ;$$

$$C = \frac{k_1 k_2 A_0}{k_1 k_2 (k_2 - k_1)} [k_1 - k_2 + k_2 \exp[-k_1 t] - k_1 \exp[-k_2 t]] =$$

$$= \frac{A_0}{k_2 - k_1} [k_1 - k_2 + k_2 \exp[-k_1 t] - k_1 \exp[-k_2 t]] .$$

Таким образом, для простейшей последовательной реакции $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$ концентрации веществ определяются следующими соотношениями:

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (\exp[-k_1 t] - \exp[-k_2 t]) ;$$

$$C = \frac{A_0}{k_2 - k_1} [k_1 - k_2 + k_2 \exp[-k_1 t] - k_1 \exp[-k_2 t]] ;$$

$$A = A_0 - B - C .$$

Можно показать, что в процессе последовательной реакции происходит постепенное расходование вещества A и накопление вещества C . Вещество B в процессе последовательной реакции сперва накапливается, а затем расходуется (рис. 1.17).

В качестве иллюстрации на рис. 1.18 приведены данные по окислению смеси метана воздухом (1:2) в присутствии 1% NO при 610°C [4]. Как видно, в этих условиях метан не сразу окисляется до конечного

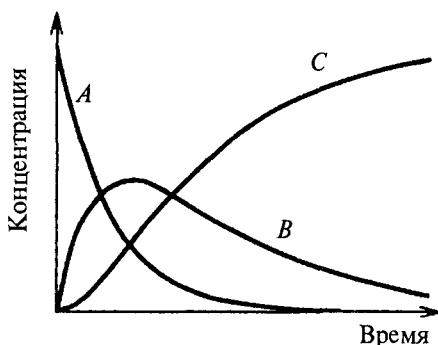


Рис. 1.17. Изменение концентрации веществ в процессе последовательной реакции.

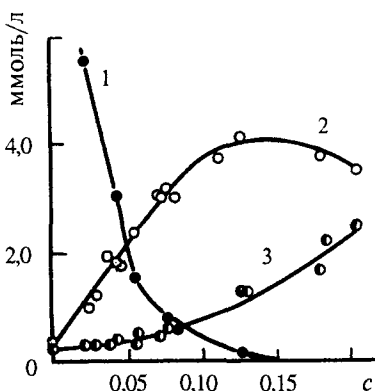
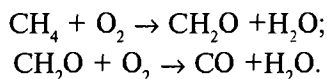


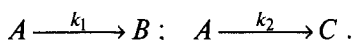
Рис. 1.18. Данные по окислению смеси метана воздухом (1:2) в присутствии 1% NO (610°C) [4].
 1 — изменение концентрации метана; 2 — изменение концентрации CH₂O; 3 — изменение концентрации CO.

продукта CO, а в процессе окисления образуется промежуточное соединение CH₂O. Таким образом, схему данной реакции можно изобразить следующим образом:



Кинетика параллельных реакций

Схема простейшей параллельной реакции записывается следующим образом:



Закон действующих масс для данной схемы можно выразить в виде системы уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dA}{dt} = -(k_1 + k_2)A \\ \frac{dB}{dt} = k_1A \\ \frac{dC}{dt} = k_2A \end{cases}$$

Закон сохранения вещества $A_0 = A + B + C$ позволяет сократить на одно уравнение данную систему дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_1A_0 - k_1B - k_1C \\ \frac{dC}{dt} = k_2A_0 - k_2B - k_2C \end{cases}$$

Точно так же, как в случае последовательных реакций, будем решать

данную систему уравнений с помощью преобразований Лапласа:

$$\begin{cases} sB - 0 = \frac{k_1 A_0}{s} - k_1 B - k_1 C \\ sC - 0 = \frac{k_2 A_0}{s} - k_2 B - k_2 C, \end{cases}$$

или

$$\begin{cases} (s^2 + k_1 s)B + k_1 sC = k_1 A_0 \\ k_2 sB + (s^2 + k_2 s)C = k_2 A_0. \end{cases}$$

Полученная система является системой линейных алгебраических уравнений относительно комплексных концентраций B и C . Разрешим данную систему относительно B и C методом Крамера:

$$\Delta = \begin{vmatrix} s^2 + k_1 s & k_1 s \\ k_2 s & s^2 + k_2 s \end{vmatrix} =$$

$$= s^4 + k_1 s^3 + k_2 s^3 + k_1 k_2 s - k_1 k_2 s ;$$

$$\Delta = s^3(s + k_1 + k_2) ;$$

$$\Delta_1 = \begin{vmatrix} k_1 A_0 & k_1 s \\ k_2 A_0 & k_2 s + s^2 \end{vmatrix} = k_1 k_2 s A_0 + k_1 s^2 A_0 - k_1 k_2 s A_0 = k_1 s^2 A_0 ;$$

$$\Delta_2 = \begin{vmatrix} s^2 + k_1 s & k_1 A_0 \\ k_2 s & k_2 A_0 \end{vmatrix} = s^2 k_2 A_0 + k_1 k_2 s A_0 - k_1 k_2 s A_0 = s^2 k_2 A_0.$$

Следовательно,

$$\begin{cases} B = \frac{\Delta_1}{\Delta} = \frac{k_1 A_0 s^2}{s^3(s + k_1 + k_2)} = \frac{k_1 A_0}{s(s + k_1 + k_2)} \\ C = \frac{\Delta_2}{\Delta} = \frac{k_2 A_0 s^2}{s^3(s + k_1 + k_2)} = \frac{k_2 A_0}{s(s + k_1 + k_2)}. \end{cases}$$



Кнорре Д.Г.

Физикохимик, биохимик, молекулярный биолог. Одним из первых начал использовать методы химической кинетики для решения задач биохимии и молекулярной биологии.

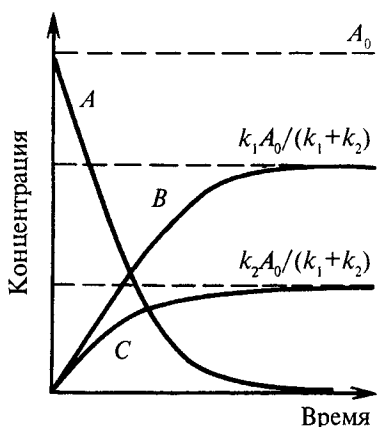
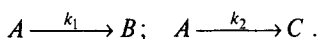


Рис. 1.19. Характерные изменения концентраций веществ в процессе параллельной реакции, протекающей по схеме

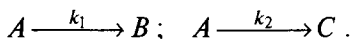


Тогда

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2} (1 - \exp[-(k_1 + k_2)t])$$

$$C = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} (1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]).$$

Таким образом, для реакций



концентрации веществ определяются следующим образом:

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2} (1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]);$$

$$C = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} (1 - \exp[-(k_1 + k_2)t]);$$

$$A = A_0 - B - C.$$

Характерные изменения концентраций веществ в процессе параллельной реакции приведены на рис. 1.19. Как следует из рисунка, концентрация вещества *A* убывает до тех пор, пока не станет равной нулю, а концентрации веществ *B* и *C* возрастают до тех пор, пока не достигнут предельных концентраций:

$$B_{\infty} = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2}; \quad C_{\infty} = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2}.$$

Правильность полученных уравнений подтверждает закон сохранения вещества. Действительно,

$$B_{\infty} + C_{\infty} = A_0.$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение сложных реакций. 2. Какие виды сложных реакций вы знаете? 3. Опишите кинетику последовательной реакции. 4. Опишите кинетику параллельной реакции.

1.4. Влияние различных факторов на скорость химической реакции

Совершенно непонятно: зачем изучать влияние температуры или pH на скорость химической реакции. С тем же самым успехом можно исследовать зависимость скорости от числа разбитой посуды или количества предшествующих праздников.

Шарль О'Тан

Скорость протекания любой химической реакции зависит от условий проведения эксперимента: состава реакционной смеси, температуры, давления, pH и т.д. Модификация условий проведения эксперимента может привести к изменению величины константы скорости реакции или к трансформации механизма протекания химической реакции.

В данном параграфе будет рассмотрено влияние на скорость химической реакции двух наиболее важных факторов — температуры и pH. При этом первый фактор, температура, приводит к изменению константы скорости реакции, и если температура претерпевает незначительные колебания, то механизм реакции не модифицируется. В отличие от первого фактора pH может приводить к изменению механизма протекания химической реакции.

Влияние температуры на скорость химических реакций

Для того чтобы проиллюстрировать влияние температуры на скорость химической реакции, рассмотрим следующий пример.

Пример 1.7 [1]. Определить температурную зависимость константы скорости щелочного гидролиза карбометоксидигидроизокарбостирила (вещество А).

Измеряемым параметром является концентрация вещества А или продуктов его гидролиза. Переменными параметрами являются: а) время реакции — для определения скорости реакции и константы скорости при фиксированной температуре, б) температура реакции — для того, чтобы определить температурную зависимость константы скорости реакции. Все остальные параметры являются фиксированными.

Таким образом, для решения поставленной задачи необходимо провести серию опытов. Результаты приведены в табл. 1.6.

Как следует из таблицы (размерность k), данная реакция является реакцией первого (псевдопервого) порядка.

**Температурная зависимость константы скорости щелочного гидролиза
вещества А (рН = 8,5; 0,1 М КСl, 4% ацетонитрила)**

T, K	298	303	307,5	312	321	330
$k \cdot 10^4, c^{-1}$	40	75	95	148	303	772

Графически зависимость скорости реакции от температуры представлена на рис. 1.20а. Из рисунка видно, что график зависимости $k(T)$ нелинеен. Попробуем спрямить зависимость $k(T)$. Перебирая координаты ($k, \ln T$), ($\ln k, \ln T$), ..., ($\ln k, 1/T$), можно показать, что спрямление достигается только в последних координатах (рис. 1.20б).

Для того чтобы объяснить спрямление экспериментальных данных в координатах ($\ln k, 1/T$), запишем аналитическое уравнение прямой в этих координатах:

$$\ln k = \ln B - A \frac{1}{T},$$

где A и B — некие константы.

Или, что то же самое,

$$\ln k = -\ln(\exp[A/T]) + \ln B; \ln k = \ln \frac{B}{\exp[A/T]};$$

$$k = B \exp[-A/T].$$

Зависимость данного типа в 1889 г. впервые получил С. Аррениус. Большую сыграла опубликованная пятью годами раньше книга Я. Вант-Гоффа «Очерки по химической динамике», в которой он эмпирическим путем

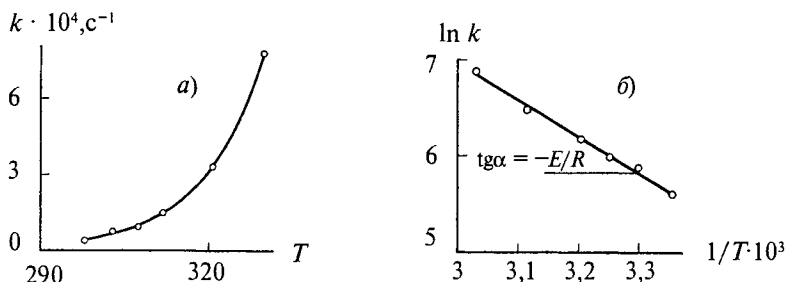


Рис. 1.20. Зависимость константы скорости гидролиза вещества А от температуры (а). Спрямление экспериментальных данных (б).

вывел уравнение для температурной зависимости константы равновесия реакции (уравнение изохоры Вант-Гоффа). Для объяснения полученной зависимости Аррениус исходил примерно из следующих соображений.

Скорость реакции пропорциональна числу столкновений молекул реагирующих веществ. Поэтому разумно предположить, что и константа скорости также пропорциональна этому числу столкновений. Следовательно, $V = PZ$, где P — коэффициент пропорциональности (фактор аддиативности); Z — число столкновений между молекулами.

Если бы любое столкновение между молекулами приводило к образованию продуктов химической реакции, то температура не оказывала бы столь большое влияние на скорость протекания химической реакции. Следовательно, химическая реакция протекает в результате столкновений не любых, а только «активных» молекул. Чем больше число «активных» молекул, тем быстрее протекает химическая реакция. Число таких молекул должно возрастать при увеличении температуры.

Согласно предположению Аррениуса, разница между «активной» и «неактивной» молекулами определяется энергией молекулы. Для каждой химической реакции существует своя критическая величина E , называемая энергией активации. Как только энергия молекулы больше, чем E , она «активна».

Еще до Аррениуса в термодинамике было показано, что доля молекул с энергией больше, чем E , равна $\exp[-E/RT]$, где R — универсальная газовая постоянная. Поэтому разумно предположить, что $A = E/R$. Тогда $k = PZ \exp[-E/RT]$.

Обозначая предэкспоненциальный множитель как k_0 , получаем современный вид уравнения Аррениуса: $k = k_0 \exp[-E/RT]$.

Таким образом, тангенс угла наклона графика в координатах $(\ln k, 1/T)$ равен $-E/R$. Из рис. 1.20 находим $E = 17,5$ ккал/моль.



Аррениус С.
(1852–1927)

Химик, физик. Создатель теории электролитической диссоциации. В 1889 г. вывел уравнение зависимости скорости химической реакции от температуры. Разработал теорию активных соударений. В 1903 г. награжден Нобелевской премией.

Зависимость константы скорости химической реакции от температуры

Зависимость константы скорости реакции от температуры определяется уравнением Аррениуса:

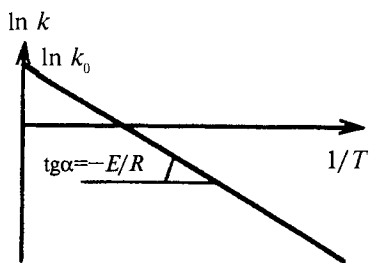


Рис. 1.21. Определение энергии активации исходя из температурной зависимости константы скорости.

чить, подставляя известные экспериментальные значения k_0 , E в уравнение Аррениуса (1.8).

$$k = k_0 \exp[-E/RT]. \quad (1.8)$$

График зависимости константы скорости реакции от температуры представляет собой прямую с тангенсом угла наклона $-E/T$, которая пересекает ось абсцисс в точке $\ln k_0$ (рис. 1.21).

Как показывают многочисленные исследования, скорость обычных реакций, протекающих при нормальной температуре, изменяется в 2–3 раза при увеличении температуры на 10°C . Это соотношение легко полу-

Теория абсолютных скоростей реакции

В конце XIX — начале XX в. идеи Аррениуса получили дальнейшее развитие. В конце 1910-х годов В. Мак-Льюис детально разрабатывает теорию активных соударений молекул. Исходя из этой теории он рассчитывает скорости протекания химических реакций в газовой фазе.

Однако проведенные в 20-е годы XX в. исследования К. Герцфельда, И. Христиансена и М. Поляни показали, что лишь примерно половина реакций в газовой фазе удовлетворительно описываются уравнениями Мак-Льюиса. Были предприняты многочисленные попытки объяснить этот факт, но лишь во второй половине 30-х годов Г. Эйринг, М. Поляни и М. Эванс формулируют теорию абсолютных скоростей реакции, которая объясняет наблюдаемые феномены и позволяет решать вопрос об определении скорости химической реакции.

Теория абсолютных скоростей реакции основана на том же предположении, что и теория соударений (теория Аррениуса и Мак-Льюиса), т.е. для того чтобы произошла химическая реакция, необходимо недистантное взаимодействие молекул реагирующих веществ между собой. В отличие от теории соударений теория абсолютных скоростей постулирует следующие положения:

1. Движение ядер реагирующих веществ аддиабатическое, т.е. потенциальная энергия системы меняется при движении ядер реагирующих молекул.

2. Движение ядер описывается законами классической механики.

Таким образом, теория абсолютных скоростей в отличие от теории соударений рассматривает химическую реакцию как сложный многоступенчатый процесс взаимодействия ядер и их электронных оболочек, а не следствие столкновения двух «шариков».

Согласно теории абсолютных скоростей реакции переход молекул реагирующих веществ в продукты реакции осуществляется через промежуточное состояние, которое называется *активированным комплексом*. Активированный комплекс является критическим соединением для каждой химической реакции. Именно образование активированного комплекса лимитирует скорость протекания любой химической реакции.

Образование и распад активированного комплекса наиболее удобно описывать при помощи величины потенциальной энергии ядер реагирующих молекул.

Рассмотрим простейшую реакцию $A + BC \rightarrow AB + C$. При этом будем предполагать, что A , B , C — атомы, расположенные на одной линии. Изолинии потенциальной энергии для этой системы атомов представлены на рис. 1.22а.

Как видно из рисунка, при уменьшении расстояния между ядрами A и B (r_{AB}) из бесконечности потенциальная энергия системы вначале возрастает, а затем сохраняется примерно на одном уровне, если расстояние между атомами B и C (r_{BC}) растет.



Рис. 1.22. Изменение потенциальной энергии в процессе химической реакции:

а — изолинии потенциальной энергии. Цифрами обозначены относительные значения потенциальной энергии. Отмечена седловая точка. Пунктир — координата реакции; б — сечение вдоль координаты реакции для экзотермического процесса; в — сечение вдоль координаты реакции для эндотермического процесса.

Фактически сохранение постоянного расстояния между атомами *A* и *B* (наиболее выгодного энергетически) означает образование химической связи между ними. Таким образом, процесс изменения расстояния между атомами *A* и *B* отражает процесс протекания химической реакции. Этот процесс обозначен на рис. 1.22а пунктирной линией, называемой *координатой реакции*.

Координата реакции начинается в «долине реагентов», где расстояние между атомами реагирующих веществ бесконечно большое. В «долине реагентов» потенциальная энергия системы атомов относительно невелика. Затем координата реакции проходит через область с повышенной энергией, называемой *потенциальным барьером*. Минимальное значение энергии в области потенциального барьера называется *седловой точкой*. Нахождение атомов *A*, *B* и *C* в области потенциального барьера означает образование активированного комплекса. Вслед за потенциальным барьером координата реакции вновь попадает в область с относительно низкими значениями потенциальной энергии («долина продуктов»).

Достаточно часто для описания протекания химической реакции используют сечение поверхности потенциальной энергии через координату реакции (рис. 1.22б, в). Начальные точки этого сечения обладают относительно малым значением потенциальной энергии. Они соответствуют «долине реагентов». Затем значение энергии в системе ядер реагирующих веществ возрастает. Это возрастание соответствует прохождению координаты реакции через потенциальный барьер. Согласно теории Аррениуса преодоление этого барьера возможно только в том случае, когда энергия реагирующих молекул больше величины потенциального барьера или, на языке теории Аррениуса, больше энергии активации. Вслед за потенциальным барьером энергия системы ядер вновь уменьшается. Это соответствует «долине продуктов».

В зависимости от изменения энергии химические реакции делят на:

Экзотермические. Энергия продуктов экзотермической реакции меньше, чем реагентов (рис. 1.22б). Эти реакции протекают самопроизвольно, с выделением тепла.

Эндотермические. Энергия продуктов эндотермической реакции больше энергии реагентов (рис. 1.22в). Эти реакции протекают с поглощением тепла из окружающей среды.

Следует отметить, что время, за которое происходит элементарное химическое превращение чрезвычайно мало и составляет порядка 10^{-12} – 10^{-13} с. В течение него реагирующие частицы не

успевают получить энергию из вне или же отдать ее своему микроокружению. Поэтому полная энергия системы реагентов, претерпевающих химическое превращение, не изменяется в течение элементарного акта.

Очевидно, что система реагентов не может оказаться в области потенциального барьера, если ее энергия мала, тогда химическая реакция не произойдет. С другой стороны, ряд реагентов может иметь энергию, существенно превышающую энергию потенциального барьера. Но как следует из термодинамики, таких молекул будет тем меньше, чем больше их энергия. Следовательно, большинство молекул реагентов, вступающих в химическую реакцию, будут иметь энергию, близкую по величине к энергии потенциального барьера.

Поэтому практически все реагенты, вступившие в химическую реакцию, пройдут через седловую точку потенциальной поверхности (или вблизи нее). Состояние системы атомов вблизи седловой точки получило название *переходного состояния (активированного комплекса)*.

Система атомов реагентов проходит через переходное состояние. Энергия такого переходного состояния больше, чем средняя энергия исходных соединений, однако она меньше энергии какого-либо другого пути реакции. Важнейшим положением теории переходного состояния, или активированного комплекса, является то, что переходное состояние образует «квазиравновесие» с исходными веществами. Это позволяет применять представления термодинамики для описания кинетики реакций.

Определение термодинамических параметров переходного состояния

Одним из наиболее важных следствий теории абсолютных скоростей химической реакции является определение константы скорости химической реакции как

$$\begin{aligned} k &= \kappa \frac{k_B T}{h} \exp[-\Delta G^\ddagger / RT] = \\ &= \kappa \frac{k_B T}{h} \exp[-\Delta S^\ddagger / R] \exp[-\Delta H^\ddagger / RT], \end{aligned} \quad (1.9)$$

где κ — трансмиссионный коэффициент (во всех случаях, кроме специально оговоренных, он равен единице); $\Delta G^\ddagger$ — стандартная свободная энергия активации; $\Delta S^\ddagger$ — энтропия, $\Delta H^\ddagger$ —

энтальпия реакции активации; k_B — постоянная Больцмана ($1,38 \cdot 10^{16}$ эрг/град); h — постоянная Планка ($6,625 \cdot 10^{-27}$ эрг·с).

Величины $\Delta S^\ddagger$ и $\Delta H^\ddagger$ равны энтропии и энтальпии перехода от реагентов к активированному комплексу.

Из уравнения (1.9) следует, что константа скорости химической реакции определяется изменением энергии системы при переходе в активированное состояние. Следовательно, любой фактор, уменьшающий свободную энергию активации, будет способствовать ускорению протекания химической реакции во времени.

Прологарифмируем выражения (1.8) и (1.9) и продифференцируем их по температуре:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E}{RT^2}; \quad \frac{d \ln k}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta H^\ddagger}{RT^2}.$$

Левые части этих выражений равны. Приравняем их правые части. После некоторых преобразований получим $E = \Delta H^\ddagger + RT$.

Таким образом, связь между энтальпией и энергией активации химической реакции определяется уравнением

$$\Delta H^\ddagger = E - RT. \quad (1.10)$$

Энергия активации и энтальпия активации отличаются на величину RT , которая при 300K равна около 0,6 ккал/моль.

Пример 1.8 [1]. Определить энтальпию и энтропию активации при взаимодействии гидразина с малахитовым зеленым на основании данных табл. 1.7.

Для того чтобы решить данный пример, необходимо провести серию опытов по определению зависимости константы скорости данной реакции от температуры. Эта серия опытов проводится так же, как это рассмотрено в примере 1.7. Результаты исследований приводятся ниже.

Из размерности константы скорости следует, что данная реакция является реакцией второго (псевдоторого) порядка. Запишем уравнение (1.9) для табл. 1.7. при $\kappa = 1$:

$$\frac{k}{T} = \frac{k_B}{h} \exp\left[\frac{\Delta S^\ddagger}{T}\right] \exp\left[-\frac{\Delta H^\ddagger}{T}\right]; \quad \ln \frac{k}{T} = \text{const} - \frac{\Delta H^\ddagger}{T}.$$

Таким образом, график в координатах $(\ln(k/T), 1/T)$ представляет собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным энтальпии активации (рис. 1.23). Из графика находим $\Delta H^\ddagger = 7,96$ ккал/моль. Опреде-

Таблица 1.7

**Температурная зависимость константы скорости реакции гидразина
с малахитовым зеленым**

$T, ^\circ\text{C}$	7	14,8	23,8	30	38,4
$k, \text{M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	1060	1580	2480	3750	4680

Таблица 1.8

**Зависимость константы скорости реакции от температуры для реакции
низкотемпературной полимеризации метилметакрилата**

$1/T, 10^3/\text{K}$	3,40	3,42	3,60	3,67	3,80	3,90	3,95	4,00	4,20	4,30
$\ln(k, \text{с}^{-1})$	2,52	2,58	2,45	2,40	2,35	2,30	2,29	2,28	2,22	2,21

лим величину свободной энергии активации исходя из формулы (1.9) для любой температуры: $\Delta G^\ddagger = RT \ln k_b T / kh$. Из термодинамики известно, что $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$. Следовательно,

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T}$$

Окончательно находим $\Delta S^\ddagger = -24,3$ э.е.

Пример 1.9 [4]. Определить по табл. 1.8 энергию активации низкотемпературной полимеризации метилметакрилата.

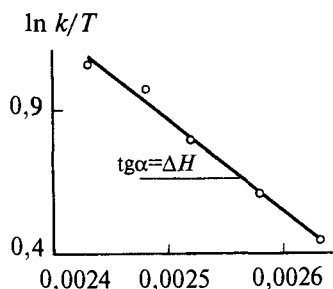


Рис. 1.23. Определение термодинамических параметров реакции гидразина с малахитовым зеленым.

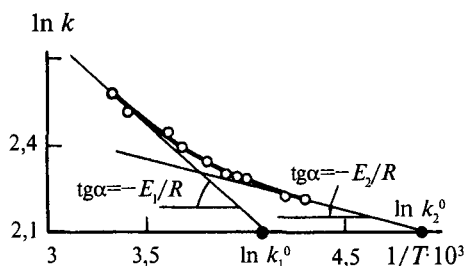
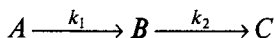


Рис. 1.24. Определение энергии активации для реакции низкотемпературной полимеризации метилметакрилата.

Экспериментальные данные из табл. 1.8 приведены на рис. 1.24. Как видно из рисунка, в координатах $(\ln k, 1/T)$ не наблюдается линеаризация экспериментальных данных по температурной зависимости константы скорости данной реакции.

Если провести асимптоты к начальным и конечным участкам графика, то по тангенсу угла наклона можно определить энергию активации реакции полимеризации метилметакрилата. При 25°C энергия активации $E_1 = 3080$ кал/моль, при -45°C $E_2 = 1180$ кал/моль. Значения предэкспоненциальных множителей k_1^0 и k_2^0 также отличаются.

Объяснить полученную зависимость можно исходя из предположения, что реакция полимеризации метилметакрилата является сложной химической реакцией. Предположим, что данная реакция содержит хотя бы одну последовательную реакцию типа



(кинетика таких реакций рассмотрена в § 1.3).

Температурные зависимости для каждой из констант скорости последовательной реакции запишутся следующим образом:

$$k_1 = k_1^0 \exp[-E_1/RT]; \quad k_2 = k_2^0 \exp[-E_2/RT].$$

Предположим, что при -45°C наиболее медленной реакцией является стадия превращения $A \xrightarrow{k_1} B$ или, что то же самое, $k_1 < k_2$. Увеличение температуры, при которой протекает реакция полимеризации, вызовет уменьшение величин E_1/RT и E_2/RT и приведет к возрастанию k_1 и k_2 . Так как $E_1 > E_2$, то в результате возрастания температуры начиная с некоторой критической температуры $T_{\text{крит}}$ изменится лимитирующая стадия, т.е. окажется, что $k_1 > k_2$. Это означает, что скорость лимитирующей станет стадия $B \xrightarrow{k_2} C$. Изменение лимитирующей стадии приводит к изменению энергии активации. Следовательно, зависимость в координатах $(\ln k, 1/T)$ не будет линейной, что и наблюдается на рис. 1.24.

Изокинетические зависимости

Достаточно часто в химических реакциях встречаются линейные зависимости между стандартной энтропией и энтальпией активации. Обычно зависимости такого рода бывают в тех случаях, когда изменения в структуре реагентов не затрагивают их реакционные центры. Фактически это означает, что

$$\Delta H^\ddagger = A + \beta \Delta S^\ddagger$$

(коэффициент β имеет размерность температуры).

Соотношения такого рода называют *изокинетической* (компенсаторной) зависимостью.

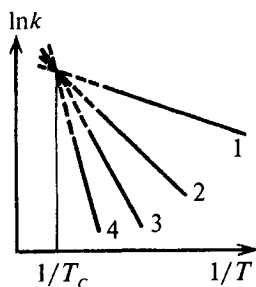


Рис. 1.25. Определение изокинетической температуры для группы веществ 1–4 (теоретический рисунок).

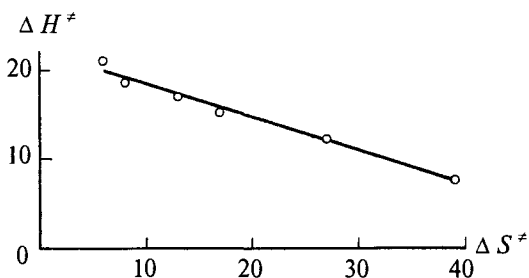


Рис. 1.26. Определение изокинетической температуры (см. пример 1.9).

Из термодинамики известно, что $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$. Следовательно, $\Delta H^\ddagger = \Delta G^\ddagger + T\Delta S^\ddagger$. То есть если в какой-нибудь реакционной серии значения эффективной энергии активации совпадут для всех членов ряда при температуре T_c , то график в координатах $(\Delta H^\ddagger, \Delta S^\ddagger)$ будет иметь тангенс угла наклона, равный T_c . Температура, при которой значения стандартной свободной энергии активации совпадают в пределах данной реакционной серии, называется *изокинетической* (рис. 1.25).

Пример 1.10 [1]. По значениям энтальпии и энтропии активации реакции щелочной денатурации ряда белков (табл. 1.9) найти температуру, при которой все константы скоростей денатурации будут равны по величине.

Таблица 1.9

Энтальпии и энтропии активации реакции денатурации ряда белков

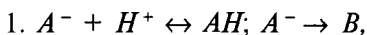
Белок	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta S^\ddagger$, э.е
Оксигемоглобин человека	7,6	–39
Оксигемоглобин крысы	15,1	–17
Гемоглобин крысы	12,2	–27
Оксигемоглобин кролика	18,5	–8
Гемоглобин кролика	16,9	–13
Оксигемоглобин быка	21	–6

Изокинетическую температуру определяем по тангенсу угла наклона в координатах ($\Delta H^\ddagger, \Delta S^\ddagger$) (рис. 1.26). Она равна 100°C.

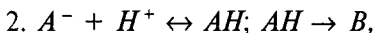
Влияние pH на скорость химических реакций

С точки зрения современных представлений о механизмах протекания химических реакций основным предположением, позволяющим объяснить влияние pH на скорость химических реакций, является предположение о сложном характере химической реакции, протекающей в водном растворе, в которой могут принимать участие ионы водорода или гидроксил-ионы, образуя промежуточные соединения с субстратами реакции.

В простейшем случае влияние pH на скорость реакции типа $A \rightarrow B$ можно объяснить исходя из следующих схем:



т.е. реакционной способностью обладают только депротонизированные формы вещества A;



т.е. реакционной способностью обладают только протонизированные формы вещества A.

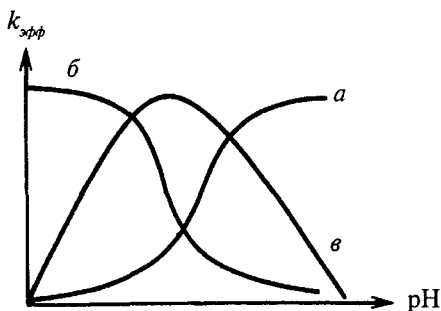


Рис. 1.27. Наиболее типичные pH-зависимости эффективной константы скорости реакции. Реакционной способностью обладает.

a — депротонизированная форма; *б* — протонизированная форма; *в* — промежуточная, частично депротонизированная форма.

Реакции, протекающие по схемам 1 или 2, являются сложными. Однако, как показывают многочисленные кинетические исследования, при фиксированных значениях pH скорость таких реакций можно описывать аналогично закону действующих масс:

$$v = k_{эфф} A_0,$$

где $k_{эфф}$ — эффективная (кажущаяся) константа скорости реакции, т.е. та константа скорости сложной реакции, которая наблюдается при описании ее уравнением простой реакции.

В соответствии с введенными представлениями изменение рН оказывает влияние на скорость реакции через изменение величины $k_{эфф}$. Основные виды рН-зависимостей приведены на рис. 1.27.

Рис. 1.27а соответствует случаю, когда реакционной способностью обладают депротонизированные формы вещества А. В этом случае скорость реакции возрастает при увеличении рН.

Рис. 1.27б соответствует случаю, когда реакционной способностью обладают протонизированные формы вещества А. Скорость таких реакций возрастает при уменьшении рН.

Рис. 1.27в соответствует случаю, когда реакционной способностью обладают промежуточные, частично депротонизированные формы вещества А. При этом зависимость скорости реакции от рН имеет сложный колоколообразный вид.

Рассмотрим влияние рН на нескольких примерах.

Пример 1.11 [1]. Определить рН-зависимость реакции образования лактама при циклизации N-(о-аминофеноксиптил)-глицилглицина (вещество А).

В данном примере измеряемым параметром является концентрация вещества А или концентрация продукта реакции. Кроме того, необходимо при нескольких значениях рН определить скорость реакции и ее константу скорости. Таким образом, для достижения заданной цели следует провести серию опытов; причем в одних опытах переменным параметром будет время реакции, в других — рН. Результаты экспериментов приведены в табл. 1.10. Как видно, данная реакция является реакцией псевдопервого порядка. Скорость этой реакции определяется уравнением $v = k_{эфф}A_0$.

Графически данные образования лактама представлены на рис. 1.28а. Так как график рН-зависимости $k_{эфф}$ от рН нелинеен, то найдем спрямляющие координаты.

Перебирая достаточно большое количество координат, можно показать, что спрямление достигается в координатах $(k_{эфф}/H^+, k_{эфф})$ (рис. 1.28б). Попытаемся объяснить это спрямление с точки зрения механизма реакции образования лактама.

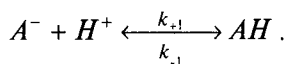
Как видно из рис. 1.28а, константа скорости образования лактама тем больше, чем меньше рН среды. Следовательно, можно предположить, что только протонизированные формы вещества А могут вступать в реакцию

Таблица 1.10

Влияние рН на константу скорости образования лактама

рН	2	2,8	3,2	3,6	3,8	4,1	4,3	4,4	4,7	5
$k_{эфф} \cdot 10^5, \text{с}^{-1}$	15,5	14,5	13,6	12,1	9,6	6,5	5,04	4,18	2,7	1,42

образования лактама. Образование протонизированных форм вещества A можно описать при помощи схемы



Из закона сохранения вещества следует:

$$\frac{d[AH]}{dt} = k_{+1}[A^-][H^+] - k_{-1}[AH].$$

После наступления равновесия химической реакции (см. § 1.2) левая часть этого уравнения равна нулю. Следовательно,

$$K = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}.$$

Из этого уравнения следует, что

$$[AH] = \frac{[A^-][H^+]}{K}.$$

Исходя из предположения, что только протонизированные формы вещества A могут участвовать в образовании лактама, скорость реакции образования этого вещества равна:

$$v = k[AH] = k_{эфф}[AH]_0.$$

Запишем уравнение материального баланса: $[AH] + [A^-] = [AH]_0$,

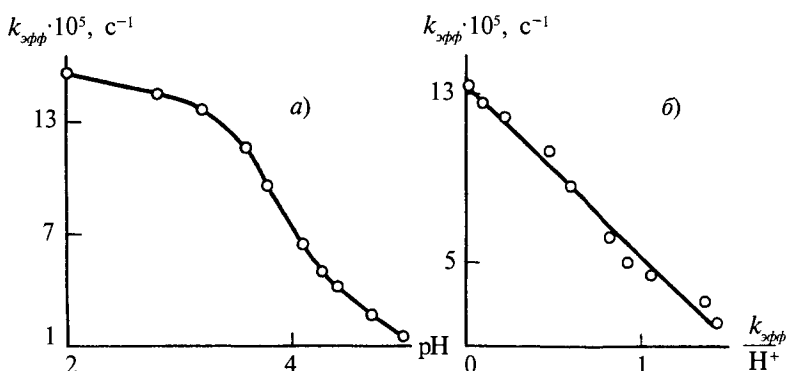


Рис. 1.28. pH-зависимость образования лактама (а); спрямление экспериментальных данных (б)

$$[AH]_0 = [A^-] - \frac{[A^-][H^+]}{K}; [A^-] = \frac{[AH]_0 K}{[H^+] + K};$$

$$[AH] = [A_0] - \frac{[AH]_0 K}{[H^+] + K} = \frac{[AH]_0 [H^+]}{[H^+] + K}.$$

Поэтому $v = k[AH^+] = k \frac{[AH]_0 [H^+]}{[H^+] + K} = k_{эфф} [AH]_0.$

Следовательно, $k_{эфф} = \frac{k[H^+]}{1 + [H^+]},$

или $k_{эфф} = k - \frac{k_{эфф} K}{[H^+]}$.

Последнее уравнение описывает спрямляющие координаты (см. рис. 1.28б). Точка пересечения графика с осью ординат дает истинное значение константы скорости: $k = 15,6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. Из тангенса угла наклона находим $K = 10^{-4} \text{ М}$.

Пример 1.12 [1]. Определить параметры рН-зависимости реакции N-ацетилцикloserина (вещество *A*) с нитрофенилнитроацетатом (вещество *B*) при избытке первого реагента.

Аналогично предыдущему примеру для определения параметров рН-зависимостей необходимо провести серию опытов. Измеряемые и переменные параметры этих опытов также аналогичны предыдущему примеру. Результаты опытов приведены в табл. 1.11.

Как следует из табл. 1.11, данная реакция является реакцией псевдо-первого порядка.

Графически экспериментальные данные представлены на рис. 1.29. Из рисунка видно, что графическая зависимость $k_{эфф}$ от рН для веществ *A* и *B* отличается от таковой для образования лактама. Кроме того, линейаризация экспериментальных данных наблюдается в координатах $(k_{эфф} H^+, k_{эфф})$ (рис. 1.30).

Исходя из вида рН-зависимости реакции веществ *A* и *B* (см. рис. 1.27), можно предположить, что только депротонизированные формы вещества *B* могут вступать в реакцию, т.е. данная реакция протекает по схеме:

Таблица 1.11

рН-зависимость реакции веществ *A* и *B*

рН	5	5,35	5,9	6,4	7
$k_{эфф}, \text{ с}^{-1}$	1,45	2,5	4,33	5,33	6,00

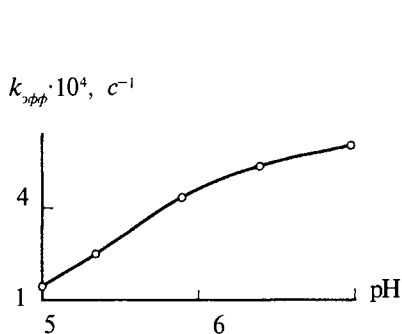


Рис. 1.29. pH-зависимость реакции веществ *A* и *B*.

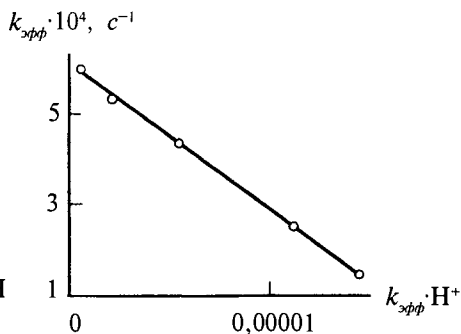
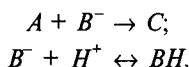


Рис. 1.30. Спрямление экспериментальных данных по определению pH-зависимости реакции веществ *A* и *B*.



Тогда скорость данной реакции определяется по формуле $v = k[A][B^-] = k_{эфф}[A][B_0]$.

Из закона действующих масс для обратимых реакций получаем

$$K = \frac{[B^-][H^+]}{[BH]}; [B^-] = \frac{K[BH]}{[H^+]}$$

С другой стороны, $[B_0] = [B^-] + [BH]$.

Следовательно,

$$[B_0] = \frac{K[BH]}{[H^+]} + [BH]; [BH] = \frac{[B_0][H^+]}{K + [H^+]}$$

$$[B^-] = [B_0] - [BH] = \frac{[B_0]K}{K + [H^+]}$$

$$\text{Тогда } v = k \frac{[B_0][A]K}{[H^+] + K} = k_{эфф}[A][B_0].$$

$$\text{Откуда } k_{эфф} = \frac{kK}{[H^+] + K}, \quad \text{или } k_{эфф} = k - \frac{k_{эфф}[H^+]}{K}.$$

Таким образом, график в координатах $(k_{эфф}, k_{эфф}H^+)$ имеет вид прямой линии с тангенсом угла наклона, равным $1/K$. Из рис. 1.30 получаем $k = 6,1 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $K = 3,12 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Определение параметров рН-зависимостей

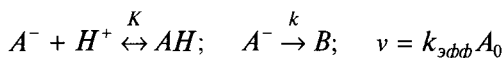
Итак, для реакций типа



связь между k и $k_{эфф}$ определяется формулой $k_{эфф} = k - \frac{k_{эфф} K}{[H^+]}$.

В данном случае активной формой соединения является его протонированная форма. При этом спрямляющими координатами будут координаты $(k_{эфф}, k_{эфф}/H^+)$ с тангенсом угла наклона, равным K (рис. 1.31а).

Для реакций типа



связь между величинами k и $k_{эфф}$ определяется формулой

$$k_{эфф} = k - \frac{k_{эфф} [H^+]}{K}.$$

В этом случае реакционной формой вещества является его депротонированная форма, спрямляющими являются координаты $(k_{эфф}, k_{эфф}/H^+)$ с тангенсом угла наклона, равным $1/K$ (рис. 1.31б).

Из последнего выражения в кислой области рН, где $K \ll [H^+]$, можно найти $\log k_{эфф} = \log k - \log K + pH$.

Таким образом, в кислой области график в полулогарифмических координатах ($\log k_{эфф}$, рН) имеет вид прямой линии с тангенсом угла наклона, равным единице. В щелочной области рН, где $K \gg [H^+]$, выполняется следующее равенство: $\log k_{эфф} = \log k$.

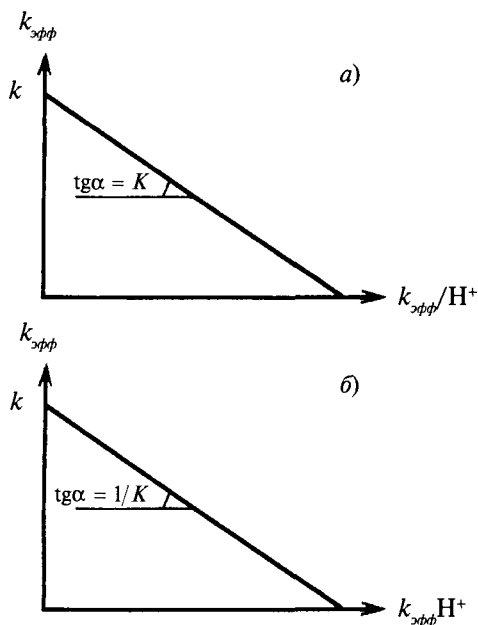


Рис. 1.31. Линеаризация результатов экспериментов и определение параметров рН-зависимостей в случаях, если основная форма реагирующего соединения является протонированной (а) и депротонированной (б).

Следовательно, графики рН-зависимостей, представленные в полулогарифмических координатах, должны иметь сигмовидную форму.

В сложных реакциях, в которых могут принимать участие несколько веществ, способных взаимодействовать с ионами водорода, уравнение скорости реакции включает скорости для каждой ионной формы реагента. Для вычисления доли каждой ионной формы удобно использовать полуэмпирическое уравнение Хендерсона—Хассельблаха:

$$\text{pH} = \log Ka + \log \frac{1-y}{y}, \quad (1.11)$$

где y — доля реагента в кислой форме.

Величину $\log Ka$ принято обозначать как $\text{p}Ka$.

Наиболее удобно проводить анализ уравнения Хендерсона—Хассельблаха в координатах Бьеррума (pH , y) или (pH , $\log y$).

Пример 1.13 [1]. Определить рН-зависимость реакции образования сульфон- β -(2-окси-3,5-динитрофенил)этансульфоновой кислоты (вещество B) при циклизации соответствующего сульфонилимидазольного производного (вещество A).

Как и в ранее рассматриваемых задачах настоящего раздела, измеряемым параметром является концентрация веществ A или B . Для решения поставленной задачи необходимо провести серию опытов, в которых переменными параметрами будут или время реакции, или рН. Результаты этой серии опытов приводятся в табл. 1.12.

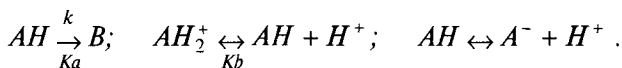
Графически эти данные представлены на рис. 1.32. Как видно из рисунка, рН-зависимость эффективной константы образования вещества B имеет колоколообразный вид.

Таблица 1.12

Влияние рН на эффективную константу скорости образования вещества B

рН	$k_{\text{эфф}}, \text{с}^{-1}$	рН	$k_{\text{эфф}}, \text{с}^{-1}$	рН	$k_{\text{эфф}}, \text{с}^{-1}$
0,8	0,16	2,0	1,52	3,8	1,00
1,4	0,57	2,4	2,48	4,1	0,57
1,4	0,69	2,8	2,82	4,3	0,50
1,5	0,74	3,1	2,52	4,7	0,18
1,6	0,79	3,1	2,80	4,9	0,15
2,0	1,42	3,6	1,60	5,0	0,09

Можно предположить, что колоколообразная кривая рН-зависимости не что иное, как наложение двух «типичных» рН-зависимостей (см., например, рис 1.27; пример 1.10, образование лактама). Тогда схема образования вещества *B* должна складываться из двух схем, аналогичных образованию лактама. Простейшую схему такого рода можно представить, например, следующим образом:



Скорость данной реакции определяется уравнением $v = k[AH] = k_{эфф}[A_0]$. Из уравнения материального баланса следует, что $[A_0] = [AH] + [A^-] + [AH_2^+]$.

С другой стороны:

$$K_a = \frac{[AH][H^+]}{[AH_2^+]}; \quad K_b = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}.$$

Следовательно,

$$k_{эфф} = \frac{k}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}.$$

Как видно из рис. 1.32, экспериментальная зависимость $k_{эфф}$ от рН имеет острый максимум. Следовательно, значения K_a и K_b близки. Поэтому отдельно проанализируем левую и правую ветви параболы в соответствии с ранее рассмотренными методами. Из левой ветви кривой определим приблизительное значение K_a и k , из правой — значения K_b и k . За истинное значение k примем среднее арифметическое значение константы скорости реакции, найденное по левой и правой частям параболы. За-

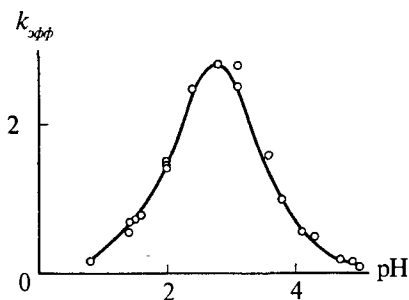


Рис. 1.32. рН-зависимость образования вещества *B*.

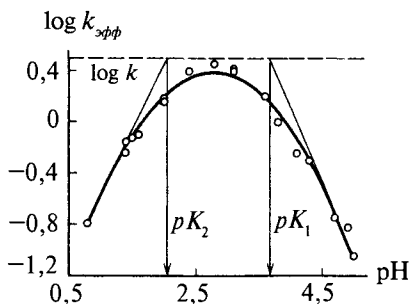


Рис. 1.33. Определение параметров рН-зависимости образования вещества *B*.

тем в координатах (pH , $\log k_{\text{эфф}}$) проведем две асимптоты по начальному участку левой ветви параболы и по конечному участку правой ветви. Абсцисса пересечения этих асимптот с горизонтальной линией $y = \log k$ даст значения для pK_1 и pK_2 (рис. 1.33). Находим: $k = 4,25 \text{ с}^{-1}$; $K_1 = 4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $K_2 = 6 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; $pK_1 = 3,4$; $pK_2 = 2,2$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие условия могут оказывать влияние на скорость химической реакции? 2. Может ли привести изменение условий проведения опыта к изменению механизма химической реакции? 3. Как скорость реакции зависит от температуры? 4. Опишите уравнение Аррениуса. 5. Сравните теорию активных соударений и абсолютных скоростей реакции. 6. Как изменяется потенциальная энергия в процессе химической реакции? 7. Что такое координата реакции? 8. Что такое «активированный комплекс»? 9. Дайте определение экзо- и эндотермическим реакциям. 10. Какие факторы способны увеличить скорость химической реакции? 11. Дайте определение изокINETической зависимости. Когда она наблюдается? 12. Какие основные виды pH-зависимостей вы знаете? 13. В каких координатах следует спрямлять pH-зависимости константы скорости? Почему? 14. Запишите уравнение Хендерсона–Хассельблаха.

1.5. Регистрация, ошибки и первичная обработка данных* в кинетическом эксперименте**

Экспериментальные данные — все то, что было получено Вами или Вашими коллегами и опубликовано шефом.

П. Лут

В первом разделе настоящей главы было определено, что кинетический эксперимент заключается в измерении концентрации веществ в первую очередь, в зависимости от времени протекания химической реакции. Для определения концентрации веществ могут быть использованы любые методы. Наиболее часто в биокинетических исследованиях используют титрование, измерение оптических свойств (спектрофотометрия, флуорометрия) и различные модификации метода меченых атомов. При этом регистрация концентрации веществ может проводиться автома-

* Статистические методы обработки экспериментальных данных будут рассмотрены позднее (гл. 6).

** Данный раздел посвящен специальным вопросам. Поэтому он может быть опущен при первом чтении без ущерба для понимания книги.

тически (например, с помощью самописца или компьютера) или вручную. Любые погрешности измерения концентрации и (или) времени протекания химической реакции приводят к ошибкам в кинетическом эксперименте.

Основные виды ошибок кинетического эксперимента

Истину нельзя объяснить так, чтобы ее поняли; надо, чтобы в нее поверили.

У. Блейк

Все ошибки кинетического эксперимента можно разделить на несколько видов (рис. 1.34):

1. Ошибки *планирования эксперимента*. Возникновение этих ошибок связано с недостаточно полной проработкой условий проведения опыта, неадекватным выбором метода.

2. Ошибки *проведения эксперимента*, которые связаны с недостаточной точностью задания величин фиксированных и переменных параметров или с недостаточной точностью регистрации измеряемых параметров.

3. Ошибки *интерпретации результатов* кинетических экспериментов. Эти ошибки появляются после непосредственного проведения эксперимента и связаны с выбором неадекватной модели кинетического эксперимента, а также с арифметическими ошибками.

Рассмотрим подробнее некоторые виды ошибок.

На стадии планирования эксперимента происходит выбор параметра исследования и метода исследования этого параметра, который наилучшим образом позволил бы достичь задач исследования. При выборе наилучшего метода исследования в расчет принимается множество факторов, в том числе относительно высокая стоимость (т.е. стоимость данного метода по сравнению с другими аналогичными методами) и доступность метода. Однако прежде чем сделать окончательный выбор метода, необходимо установить:

1. Диапазон изменения изучаемого параметра (т.е. установить наименьшее и наибольшее значение параметров, при которых будут проводиться исследования).

Так, например, при изучении pH-зависимости в примере 1.13 был использован широкий диапазон значений pH (от 0,8 до 5,0). При этом был показан сложный колоколообразный вид pH-зависимости, связанный с наличием как протонизированных, так и депротонизированных форм вещества, участвующих в реакции. Если бы исследования велись в более



Рис. 1.34. Основные ошибки кинетического эксперимента

узком диапазоне значений рН (например, от 0,8 до 2,8 или от 2,8 до 5,0), то был бы обнаружен более простой вид рН-зависимости.

2. Точность измерения изучаемого параметра.

К примеру, достаточно очевидно, что взвешивать мешки с картошкой на аналитических весах незачем. С другой стороны, использовать обычные весы для получения 0,5 г NaOH столь же глупо. Для взвешивания 0,5 г NaOH следует выбрать аналитические весы. Выбор также будет зависеть от имеющегося в лаборатории оборудования и требуемой точности взвешивания.

Взвешивание 0,5 г NaOH на обычных весах напоминает известный в свое время анекдот.

Приходит студент в магазин:

— Взвесьте мне, пожалуйста, полграмма сыра.

— Вы что, издеваетесь?

— Если бы я издевался, то попросил бы нарезать.

После того как выбраны диапазон изменения изучаемого параметра и точность регистрации этих изменений, выбирается метод регистрации. Данный метод должен обладать следующими свойствами:

1. Позволять измерять изучаемый параметр.

Действительно, спектрофотометр может быть применен для определения толщины пластины, сделанной из слюды, а не из железа.

2. Охватывать весь диапазон изменения изучаемого параметра.

3. Позволять изучать заданный параметр с необходимой степенью точности.

Следует помнить, что ошибки, связанные с измерениями, равным образом могут возникнуть как при изучении измеряемого параметра, так и при задании значений изменяемого параметра или при определении фиксированного параметра. К ним относятся:

1. *Приборные.*

2. *Ошибки метода.*

3. *Случайные ошибки.*

Рассмотрим отдельно каждый вид.

Возникновение приборных ошибок связано с недостаточной точностью измерений, проводимых с помощью приборов, и (или) с неисправностью приборов. Кроме того, большинство приборов имеет нелинейный вид зависимости между числом поступивших сигналов на прибор и показаниями на шкале приборов (число регистраций). При этом у одних приборов наблюдается выход на плато числа регистраций при увеличении числа поступающих сигналов (рис. 1.35а), а у других — в этой же ситу-

Число
регистраций

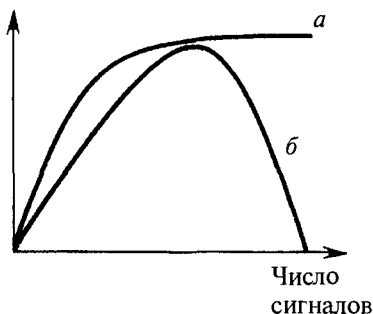


Рис. 1.35. Различные виды зависимостей между числом сигналов, поступающих на прибор, и числом сигналов, зарегистрированных прибором. *а* — с выходом на плато; *б* — с угнетением числа регистраций

ации наблюдается угнетение числа регистраций (рис. 1.35б).

Однако у всех приборов характер зависимости между числом сигналов и числом регистраций линеен при малом числе сигналов. Поэтому при отработке условий проведения опыта необходимо убедиться в том, что исследования проводятся на линейном участке зависимости «число сигналов — число регистраций», для чего исследуемую величину уменьшают (например, разведением) и увеличивают (например, используя большие начальные концентрации веществ) в 2, 5 и 10 раз.

Кроме того, при работе с приборами или аналитическими методами следует учитывать, что любой прибор (метод) инерционен, т.е. для того чтобы произошла та или иная регистрация, необходимо некоторое время. Может случиться так, что это время окажется большим, чем время, за которое в наблюдаемой системе произойдут существенные изменения.

Также при работе с приборами (методами) следует учитывать точность измерений, которую можно реально получить с помощью данного метода (прибора). Точность зависит от самого прибора (метода), объекта исследования и диапазона изменения изучаемого параметра.

Например, погрешность радиоиммунологических методов составляет 1–5% в зависимости от изучаемого объекта. Точность взвешивания на аналитических весах составляет: доли процента для веществ массой более 0,01 г, менее 1% — для веществ массой от 0,001 до 0,01 г и более 1% — для веществ с меньшей массой.

Помимо приборных и методических ошибок, на стадии проведения эксперимента могут быть и *случайные ошибки (шумы)*, связанные с не очень аккуратным и тщательным проведением опыта и (или) с учетом не всех параметров. Большинство случайных ошибок удастся обнаружить на стадии интерпретации экспериментальных данных при помощи статистических методов

(см. § 6.1 «Обнаружение выбросов»). Однако для того чтобы можно было применить статистические методы, необходимо проводить все опыты в *параллелях* (*параллельное проведение опытов*), т.е. ставить несколько опытов при одних и тех же условиях.

На стадии интерпретации результатов экспериментов могут быть ошибки *неадекватного выбора модели* (например, выбор для примера 1.13 модели существования только активных протеонизированных форм), которые связаны с выбором слишком простой или слишком сложной модели или же с выбором модели, которая не отвечает условиям проведения эксперимента и (или) не позволяет описывать экспериментальные данные.

Ошибки интерпретации могут быть также связаны с учетом не всех параметров, изучаемых в кинетическом эксперименте, что приводит к извлечению не всей информации, содержащейся в результатах кинетического эксперимента, или к выбору неадекватной модели.

И наконец, на стадии интерпретации результатов экспериментов могут быть *арифметические* ошибки (ошибки вычислений, например, при неисправном микрокалькуляторе или при ошибочном вводе экспериментальных данных в компьютер или задании ошибочной формулы для вычисления).

Непрерывные и дискретные кинетические кривые

До сих пор анализ результатов кинетических экспериментов проводился исходя из предположения о непрерывном характере кинетической кривой. Однако в реальном эксперименте получаемые данные могут носить непрерывный и дискретный характер (рис. 1.36).

Непрерывные кинетические кривые могут быть получены лишь при автоматической записи результатов кинетических экспериментов, например, с помощью самописцев (рис. 1.36а). Во всех остальных случаях происходит регистрация изучаемого параметра лишь в определенные (дискретные) промежутки времени, в результате чего кинетическая кривая носит дискретный характер, т.е. представляют собой совокупность отдельных точек (рис. 1.36б).

Для получения дифференциальных и интегральных кинетических кривых, а также в ряде других случаев требуется перейти от дискретных кинетических кривых к непрерывным. В простейшем случае такой переход может быть осуществлен путем соединения всех экспериментальных точек отрезками (рис. 1.37а). Однако при этом производная кинетической кривой в каждой эк-

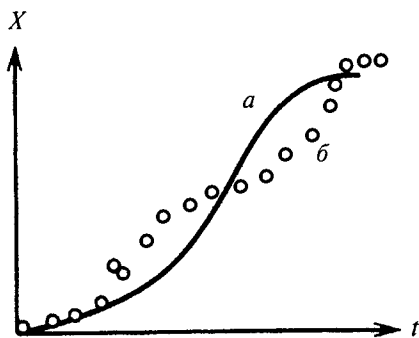


Рис. 1.36. Непрерывная (а) и дискретная (б) кинетические кривые.

спериментальной точке будет испытывать разрыв. Поэтому данный метод следует признать неприемлемым по крайней мере для случая вычисления скоростей реакции.

Другой метод перехода от дискретных кинетических кривых к непрерывным получил название *сплайн-интерполяции* (рис. 1.37б). Данный метод позволяет проводить наиболее гладкую кривую через заданные точки. При этом коэффициен-

ты сплайнового многочлена, описывающего сплайн-интерполяцию, равны производным в заданных точках. Поэтому метод сплайн-интерполяции может существенным образом сократить объем вычислений. Однако данный метод неприменим, если экспериментальная ошибка достаточно велика, так как сплайновый многочлен при этом приобретает волнообразный вид и его поведение не соответствует истинному поведению непрерывной кинетической кривой. Также метод сплайновой интерполяции неприменим при малом числе (менее десяти) экспериментальных точек, так как относительная ошибка метода сплайн-интерполяции при этом велика.

И, наконец, самым сложным (но и самым точным) методом перехода от дискретных кинетических кривых к непрерывным является *регрессионный метод** (рис. 1.37в). Данный метод позволяет строить кривую, удовлетворяющую заданному заранее уравнению, так, чтобы расстояния от этой кривой до экспериментальных точек были бы минимальны. Метод применим, когда известен характер зависимости между изучаемыми параметрами. Если характер зависимости между параметрами указан неверно, то применение регрессионной процедуры приведет к ошибке интерпретации, связанной с выбором неадекватной [регрессионной] модели.

* Следует различать интерполяционные, экстраполяционные и регрессионные методы. Интерполяционные методы позволяют провести кривую через заданные точки. Экстраполяционными методами предсказывают поведение кривой вне заданных точек. Регрессионными методами строят кривую заданного вида, используя экспериментальные точки, но не обязательно проходящую через них.

Все рассмотренные методы требуют, как правило, больших и громоздких вычислений. Повсеместное использование вычислительной техники делает эту проблему все менее и менее актуальной. Однако необходимость использования приближенных методов анализа результатов кинетических экспериментов до сих пор еще достаточно часто возникает у исследователя.

Рассмотрим некоторые упрощенные методы анализа кинетических кривых.

1. *Переход от дискретных кинетических кривых к непрерывным* может быть сделан на глаз, при помощи карандаша, линейки и лекала. Для этого на миллиметровую бумагу наносят экспериментальные точки и проводят наиболее простую кривую так, чтобы расстояния от этой кривой до экспериментальных точек были минимальны. Показано, что при простом характере зависимости человеческий глаз позволяет строить кривые с ошибкой не более 1–2% по сравнению с регрессионными методами.

Как-то на кафедре физики в рамках лабораторной работы по изучению спектра паров йода студенту надо было провести одну прямую через множество точек, произвольно разбросанных по плоскости.

Студент упростил задание и провел зловольную прямую на глаз и был «засечен» за сим неблагородным занятием преподавателем, который устроил «разборку»: как же студент решал задачу регрессии вручную, без компьютера.

Когда после долгих мучений были введены все экспериментальные данные и регрессионная линия была прочерчена ЭВМ, оказалось, что она почти совпала с той, которую провели на глаз.

2. *Простейшим образом дифференциальную кинетическую кривую* можно построить по тангенсу угла наклона исходной кривой. Для этого к наиболее характерным точкам исходной кривой проводятся касательные. Тангенс угла наклона касательной равен значению дифференциальной кинетической кривой в этой же точке.

3. *Простейшим образом интегральную кинетическую кривую* можно построить, используя ножницы и миллиметровую бумагу. Для этого с помощью ножниц исходная кинетическая кривая аккуратно вырезается, а затем взвешивается. Также вырезается и взвешивается 1 см² из миллиметровой бумаги. Исходя из соотношений весов вычисляется площадь под кинетической кривой, т.е. значение интегральной кривой.

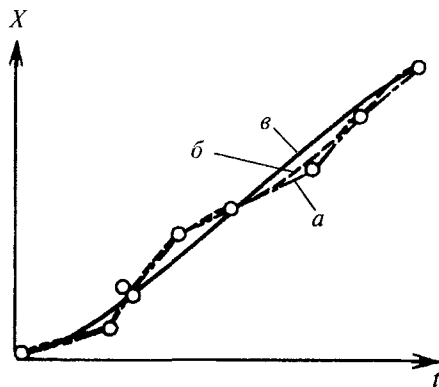


Рис. 1.37. Переход от дискретных кинетических кривых к непрерывным:

а — соединение точек отрезками; *б* — метод сплайн-интерполяции; *в* — регрессионные методы.

Применение вычислительной техники в кинетическом эксперименте

Механикис — профессиональное заболевание тех, кто верит, что ответ математической задачи, которую он не может ни решить, ни даже сформулировать, легко будет найти, если найти доступ к достаточно дорогой вычислительной технике.

Б. Купман

Анализ кинетических кривых существенным образом упрощается при условии использования вычислительной техники. Вычислительная техника может быть использована на стадии регистрации экспериментальных данных и на стадии обработки информации.

Во многих случаях вычислительная техника может облегчить труд исследователя, избавить его от рутинной, нудной и однообразной работы.

Применение вычислительной техники на стадии интерпретации результатов кинетических экспериментов получило сегодня, пожалуй, самое большое распространение. С помощью компьютера можно легко и быстро обработать экспериментальные данные, построить простые и наглядные графики и, наконец, можно просто использовать компьютер в качестве печатной машинки.

На стадии планирования экспериментов в настоящее время компьютеры применяются только в учебных целях, позволяя моделировать проведение трудоемких и дорогостоящих экспериментов.

Однако не следует думать, что вычислительные машины могут заменить человеческий интеллект и решить все задачи за исследователя и что стоит только ввести все данные в компьютер, нажать заветную кнопку, — и... чуда не будет. Для правильной интерпретации экспериментальных данных, для понимания полученных результатов необходимо иметь хотя бы самые общие представления о методах, которые использует вычислительная техника (так называемые «численные методы»), и о том, какие методы использованы в конкретной программе. Именно исходя из этих соображений многие из этих методов вынесены в отдельную главу (гл. 6).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные ошибки кинетического эксперимента и причины их возникновения. 2. Какие простейшие вычислительные методы вы знаете? 3. Какие существуют способы перехода от дискретных к непрерывным кинетическим кривым? 4. Приведите пример использования вычислительной техники в кинетическом эксперименте.

1.6. Краткое содержание главы

Сестра моя — краткость.

Н. Перова (Клыкова)

Химическая кинетика занимается изучением механизмов химических реакций, а также закономерностей протекания химических реакций во времени. Для изучения химических реакций проводят кинетический эксперимент, в котором (в простейшем случае) изучают зависимость концентрации вещества от времени химической реакции. На основании кинетического эксперимента строят кинетические кривые.

Кинетическая кривая описывает зависимость скорости химической реакции от времени ее протекания. Аналитически эта зависимость описывается законом действующих масс:

$$v = kX_1^{m_1} X_2^{m_2} \dots X_n^{m_n}.$$

Величину k называют константой скорости химической реакции. Она тем больше, чем быстрее протекает химическая реакция. Константа скорости не меняется при одних и тех же условиях проведения эксперимента и не зависит от концентраций веществ, вступающих в реакцию. Она может изменяться при изменении условий проведения реакции (температура, давление, pH и т.д.).

Величины $m_1, m_2, \dots, m_n$ называют порядком реакции по веществам $X_1, X_2, \dots, X_n$. Их сумму называют [суммарным] порядком реакции. Величины m могут принимать целочисленные и дробные значения, могут быть равны нулю. Величины m всегда неотрицательны. Для простых реакций величина m является целым числом и никогда не превышает трех.

Существует достаточно много способов определения константы скорости реакции и порядка реакции. Они рассматриваются в § 1.2 и суммарной табл. 1.13. Выбор конкретного способа зависит от того, измеряется ли непосредственно концентрация вещества или физическая величина, зависящая от концентрации, каков механизм изучаемой реакции (в частности, порядок исследуемой реакции), а также от метода постановки конкретного эксперимента.

В § 1.3 рассмотрены основы кинетики сложных реакций. Исследованы зависимости концентраций реагентов, интермедиатов и продуктов реакции от времени протекания последовательных и параллельных реакций.

Следует учитывать, что на константу скорости реакции могут существенным образом повлиять температура и pH. Анализ зави-

Определение константы скорости и порядка реакции

Порядок	Нулевой	Первый	Второй	Третий
Определение порядка реакции				
Зависимость скорости от концентрации реагирующих веществ	Нет (константа)	Линейная	Квадратичная	Кубическая
Зависимость полупревращения от начальной концентрации реагентов	Нет	Есть	Нет	Нет
Значение $\frac{\log(v_0^{(1)} / v_0^{(2)})}{\log(X_0^{(1)} / X_0^{(2)})}$	0	1	2	3
Тангенс угла наклона в координатах ($\log v$, $\log X$)	0	1	2	3
Спрямяющие координаты	(X , t)	($\log X$, t)	($1/X$, t)	($1/X^2$, t)
Определение константы скорости				
Размерность константы скорости	М/с	1/с	1/(М·с)	1/(М ² ·с)
Точка пересечения графика с осью ординат в координатах ($\log v$, $\log X$)	$\log k$	$\log k$	$\log k$	$\log k$

симостей константы скорости от этих параметров приведен в § 1.4. При этом изучение температурной зависимости следует начинать с построения графика ($\log k$, $1/T$), а изучение рН-зависимости — с построения графика зависимости ($k_{эфф}$, рН).

1.7. Логика кинетического исследования

Когда бы грек увидел наши игры...

О. Мандельштам

Кинетику химического или биологического процесса изучают обычно в двух целях:

1. Предсказать, что произойдет с системой в будущем. Если известен кинетический закон развития системы (как правило, формально известно дифференциальное уравнение, описывающее динамику процесса) и начальные условия (т.е. состояние системы в начальный момент времени), можно предсказать, что

будет с системой в каждый момент времени в будущем. К этому классу задач относятся также оптимизационные задачи, т.е. задачи, позволяющие перейти из одного состояния в другое за максимально малые или большие промежутки времени, достичь максимального выхода и т.п.

2. Понять механизм процесса, т.е. представить отдельные элементы и стадии, обеспечивающие именно такое протекание процесса во времени. Любое представление о механизме процесса модельно. Основной задачей химической и биохимической кинетики является изучение механизмов реакции. Под механизмом реакции в рамках химико-кинетического подхода обычно понимают последовательность молекулярных трансформаций исходных веществ в конечные продукты. Как правило, механизмы химических и биохимических реакций достаточно сложны и включают в себя образование лабильных и высокореакционно-способных промежуточных соединений. Установление наличия, изучение строения и свойств этих промежуточных соединений, обнаружение корреляций между строением и их реакционной способностью составляют сущность исследования механизма процесса.

Значение кинетического подхода для изучения механизмов химических и биохимических реакций трудно переоценить. Часто простейшее кинетическое наблюдение открывает целую эпоху в исследовательской работе.

Экспериментальное изучение

Кинетическое исследование, как правило, начинается с эксперимента. При изучении зависимости концентраций продуктов реакции P , исходных реагентов S или каких-либо промежуточных соединений X от времени используются самые разнообразные химические и физические методы определения концентраций веществ. Экспериментатор для облегчения интерпретации результатов должен стремиться поддерживать ряд параметров системы постоянными.

Обычно биохимические эксперименты проводят в изотермических условиях, при постоянном значении рН, ионной силы раствора, фиксируют концентрации каких-либо реагентов, создавая большой их избыток по сравнению с компонентами, концентрации которых изменяются во времени. В результате экспериментального исследования устанавливаются зависимости концентраций веществ от времени при различных внешних фиксированных параметрах.

Если реакция протекает при небольшой глубине превращения субстрата, удобна переменная, определяемая из исходных экспериментальных данных, — начальная стационарная скорость реакции v_0 . Для кинетического анализа непосредственно можно использовать другие переменные, например, такие, как текущая концентрация компонента: исходного субстрата $S(t)$, продукта $P(t)$, промежуточного вещества $X(t)$ или время жизни τ какого-либо интермедиата.

Кинетические модели (кинетические схемы)

Для объяснения полученных экспериментальных данных на основе законов химической кинетики создаются кинетические модели, согласно которым «элементарные» стадии трансформации молекул в сложном механизме реакции представляют собой:

1. Мономолекулярные $A \rightarrow B$,
2. Бимолекулярные $A + B \rightarrow C$,
3. В очень редких случаях тримолекулярные процессы $A + B + C \rightarrow D$.

Методологически оправданным представляется построение простейших моделей, включающих наименьшее число стадий; в дальнейшем возможно усложнение моделей по мере сравнения их с экспериментом при несоответствии выводов, следуемых из модели, экспериментальным результатам.

При построении кинетической модели используются данные о стехиометрии реакции и о природе промежуточных частиц, принимающих участие в механизме реакции. При химико-кинетическом исследовании наибольшая неопределенность — возможность вариантов — связана с построением кинетической схемы процесса. На этой стадии исследования большую роль играет интуиция исследователя.

После построения моделей последующие операции и выводы в значительной степени детерминированы. Предлагаемая кинетическая схема записывается либо в виде последовательности стадий реакции, либо в виде графа реакции, характеризующего взаимный переход компонентов процесса. Кинетическая схема реакции при использовании законов химической кинетики однозначно приводит к системе дифференциальных и (или) алгебраических уравнений.

Как правило, полученная схема уравнений представляет собой систему дифференциальных уравнений первого порядка с постоянными коэффициентами. При известных начальных или

граничных (для макрокинетических задач) условиях система уравнений может быть решена, и это решение будет единственным. Получение и анализ решения требуют известной техники работы с дифференциальными уравнениями, которую можно приобрести при изучении курса математического анализа в институтах и университетах.

Исследователи, как правило, стремятся максимально упростить математическое описание системы и поиск решения. С этой целью экспериментально создаются условия, в которых система дифференциальных уравнений имеет линейный характер. Например, создается большой

избыток одного из компонентов реакции, концентрация которого не изменяется во времени и может входить в дифференциальное уравнение в виде константы. При этом скорость бимолекулярных реакций с участием этого компонента становится линейно зависимой лишь от одного переменного, и уравнение скорости становится линейным. Это существенно упрощает решение системы дифференциальных уравнений, поскольку линейные уравнения имеют общее решение, которое детально исследовано в литературе.

Большое развитие при исследовании ферментативных реакций получил метод стационарных приближений А.Н. Тихонова, рассмотренный в гл. 6. Использование условий стационарности промежуточных соединений переводит систему дифференциальных уравнений в систему алгебраических уравнений.

В ряде случаев решение системы дифференциальных уравнений не может быть получено в аналитической форме, и тогда используются приближенные численные методы. Этот подход в последние годы широко развивается в связи с появлением и активным применением в химической кинетике ЭВМ, которые позволяют исследователям решать задачи, ранее неразрешимые ввиду математических сложностей.

Однако в методологическом плане химико-кинетическое ис-



Шилов А.Е.

Физико-химик. Специалист по катализу, работает в области кинетики и механизмов действия ферментов и металлокомплексных катализаторов.

следование сохраняет свою логику и при использовании ЭВМ. Отличие заключается лишь в том, что в случае ЭВМ решение получается не в виде уравнения, а в виде функции, заданной таблицей или графиком.

При исследовании решений весьма удобно использовать различные асимптотические приближения, позволяющие проанализировать поведение системы при экстремально высоких и низких значениях кинетических параметров или концентраций.

Дискриминация моделей и сопоставление с экспериментальными данными

В химико-кинетическом исследовании очень важным моментом является сопоставление выводов, следуемых из кинетической модели, с экспериментальными результатами. Если выводы кинетической модели описывают экспериментальные данные, говорят, что предложенная схема реакции соответствует экспериментальным результатам. При несоответствии результатов анализа экспериментальным данным удастся исключить из дальнейшего рассмотрения какой-либо механизм или группу механизмов.

Рассмотрение большого числа кинетических моделей позволяет по тем или иным причинам, приводящим к расхождению выводов с экспериментальными результатами, отвергнуть некоторые механизмы и выбрать механизм (или группу механизмов), соответствующий опытным данным.

Соответствие следствий кинетической модели экспериментальным данным не может служить однозначным доказательством справедливости предлагаемого механизма реакции, поскольку ниоткуда не следует, что другая модель или схема процесса не приведет к тем же самым уравнениям.

Зачастую лучше сказать: «Не знаю», чем настаивать на однозначности решения. Однако важной чертой кинетического подхода является возможность демонстрации, что тот или иной механизм не соответствует экспериментальным данным и поэтому может быть исключен. Исследователь, проводя кинетический анализ, должен рассмотреть группу возможных механизмов, дискриминировать схемы и выбрать из них те кинетические модели, которые удовлетворяют экспериментальным данным.

Часто для получения удовлетворительного результата необходимо усложнить первичную простейшую модель. В принципе

различные кинетические схемы приводят к разным системам уравнений и различающимся решениям. Соответственно кинетические схемы можно различить или, как иногда говорят, *дискриминировать*. Однако кинетические модели могут приводить, в силу используемых упрощений, к уравнениям, не отличающимся по зависимости от времени или от известных концентраций варьируемых компонентов процесса. В этом случае необходимо проводить специальный теоретический и экспериментальный анализы, направленные на разграничение и дальнейшую дискриминацию механизмов.

Определение численных значений параметров кинетической модели

Если предложенная схема (кинетическая модель) соответствует экспериментальным данным, важно определить численное значение параметров, входящих в уравнение, описывающее изменение концентрации компонента (*решение обратной задачи*). Из экспериментальных данных с помощью анаморфоз, приводящих к линейным зависимостям, или численного подбора на ЭВМ определяются константы скорости или равновесия элементарных стадий процесса.

Иногда, особенно для достаточно сложных механизмов, определить элементарные константы практически невозможно, и из экспериментальных данных определяют некоторые функции элементарных констант — эффективные константы. В дальнейшем, используя различные зависимости наблюдаемых эффективных констант, получают информацию о константах скорости элементарных процессов.

Молекулярная модель

Биокинетическое исследование завершается построением молекулярной модели. Используя независимые данные о структуре исходных, конечных, промежуточных соединений, можно представить картину процессов, проходящих на молекулярном уровне. Зачастую построение такого рода молекулярных моделей сопряжено с известной степенью риска, и часто молекулярные модели имеют гипотетический характер.

Однако создание представлений о молекулярных изменениях в процессе реакции в высшей степени стимулирует развитие исследования процесса и представляется необходимым на том или ином этапе работы.

Список основной литературы

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
2. Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Биокинетика. М., 1979.
3. Брей Дж., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М., 1959.
4. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М., 1982.
5. Эйринг Г., Лин С.Г., Лин С.М. Основы химической кинетики. М., 1983.
6. Эммануэль Н.М., Кнорре Д.Г. Курс химической кинетики. М., 1962.

Дополнительная литература

7. Вант-Гофф Я. Избранные труды по химии. М., 1984.
8. Всеобщая история химии. История учения о химическом процессе. М., 1981.
9. Денисов Е.Т. Кинетика гомогенных химических реакций. М., 1988.
10. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., 1985.
11. Леенсон И.А. Чет или нечет? М., 1987.
12. Манолов К. Великие химики мира. М., 1976.
13. Химическая энциклопедия. В 5 т. М., 1988–1998.

Глава 2

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ

Правила этой Игры нельзя выучить иначе чем обычным, предписанным путем, на который уходят годы, да ведь никто из посвященных и не заинтересован в том, чтобы правила эти можно было выучить с большой легкостью.

Г. Гессе

2.1. Кинетические схемы и механизм ферментативной реакции

Эти правила представляют собой некую разновидность высокоразвитого тайного языка, в котором участвуют самые разные науки и искусства, но прежде всего математика и музыка и который способен выразить и соотнести содержание и выводы чуть ли не всех наук.

Г. Гессе

Термином «механизм» определяют часто совершенно разные понятия. В молекулярном смысле под механизмом понимают молекулярные события, приводящие к превращению одних молекул в другие. Как правило, эти гипотетические или реальные события выстраиваются во временной ряд, создавая тем самым детальную картину превращений.

Например, одним из фундаментальных представлений о механизмах ферментативной реакции является представление о фермент-субстратном комплексе, образующемся на пути трансформации субстрата в продукт под действием фермента.

Считается, что механизмы ферментативных реакций выглядят следующим образом: субстрат образует комплекс с активным

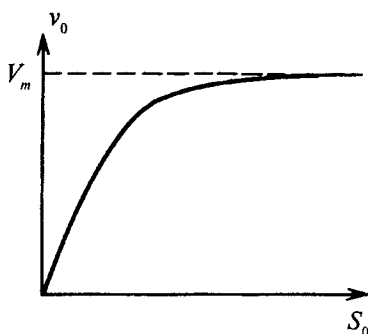


Рис. 2.1. Зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата.

центром фермента, в комплексе происходят фермент-субстратные изменения, образуются продукты реакции, которые уходят из активного центра, освобождая его для взаимодействия с новой молекулой субстрата.

Что же послужило основой для этих представлений? Что доказывает, что фермент-субстратный комплекс существует и механизм реакции выглядит именно таким?

Доказательства следуют из изучения кинетики реакций, катализируемых ферментами.

Фермент-субстратный комплекс.

Последовательный и параллельный маршрут реакции.

Возможно ли различить эти схемы?

Рассмотрим одну «классическую» задачу, имеющую историческую значимость. Биокинетика начала развиваться в начале



Михаэлис Л.
(1875–1949)

Биохимик, химик-органик, основоположник ферментативной кинетики. В 1913 г. получил уравнение зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата.

XX в., когда несколькими исследователями была изучена скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата (Brown, 1892; Brown, 1902; Henri, 1902; Henri, 1903; Michaelis, Menten, 1913). Исследовалась реакция гидролиза сахарозы, катализируемая дрожжевой инвертазой. Эксперименты были поставлены в условиях существенного избытка субстрата по сравнению с концентрацией фермента. Оказалось, что зависимость начальной скорости от концентрации субстрата описывается гиперболической функцией (рис. 2.1):

$$v_0 = \frac{V_m S_0}{K_m + S_0}, \quad (2.1)$$

при этом параметр V_m линейно увеличивается с ростом количества фермента, вводимого в реакцию:

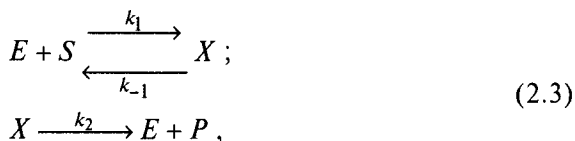
$$V_m = k_{\text{кат}} E_0, \quad (2.2)$$

где E_0 — начальная концентрация фермента в произвольных единицах.

Для объяснения эксперимен-

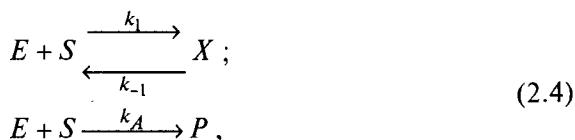
тально наблюдаемых зависимостей существуют по крайней мере два механизма, различающихся по физической картине явления.

1. Согласно первой модели (схема Михаэлиса) в процессе каталитического действия активный центр фермента с субстратом образуют промежуточный фермент-субстратный комплекс, внутримолекулярное превращение которого приводит к образованию продуктов с регенерацией активного центра:



где k_1 , k_{-1} — константы скорости образования и диссоциации фермент-субстратного комплекса; k_2 — константа скорости мономолекулярного превращения комплекса.

2. Другой механизм (схема Анри) также включает образование комплекса «фермент—субстрат», однако комплекс неакционноспособен, а ферментативная реакция протекает бимолекулярно при взаимодействии субстрата с активным центром фермента:



где k_A — константа скорости второго порядка взаимодействия активного центра фермента с субстратом.

Обе предложенные схемы описывают экспериментально наблюдаемую зависимость начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата и фермента. Схема Михаэлиса—Ментен при избытке субстрата приводит к следующей системе уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= k_1 E \times S_0 - (k_{-1} + k_2) X; \\ v_0 &= \frac{dP}{dt} = k_2 X; \\ E_0 &= E + X. \end{aligned} \quad (2.5)$$

В условиях стационарности по промежуточному соединению ($dX/dt = 0$) уравнение начальной стационарной скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0}, \quad (2.6)$$

где

$$Km = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$

Соответственно вторая кинетическая схема (схема Анри) описывается отличающейся от (2.5) системой уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= k_1 E \times S - k_{-1} X; \\ v_0 &= \frac{dP}{dt} = k_A E \times S_0; \\ E_0 &= E + X.\end{aligned}$$

Для нее в стационарном состоянии уравнение скорости имеет вид

$$v_0 = \frac{k_A K_A E_0 S_0}{K_A + S_0}, \quad (2.7)$$

где $K_A = k_{-1}/k_1$

На основе экспериментальных данных в стационарном режиме схемы (2.3) и (2.4) неотличимы, поскольку приводят к одному и тому же уравнению скорости. Дискриминировать эти механизмы из данных по стационарной кинетике реакции невозможно. Существовало мнение, что кинетические методы в этом случае бессильны и вообще невозможно доказать справедливость того или иного механизма реакции.

Мнение было ошибочным. Действительно, системы уравнений, описывающих кинетическое поведение реакции для двух обсуждаемых механизмов, различны, следовательно, должны наблюдаться различия и в уравнениях, представляющих решение этих систем. В самом деле, для схемы с промежуточным реакционноспособным комплексом (схема Михаэлиса) концентрация промежуточного соединения при начальных условиях $t = 0$: $X = 0$ дана уравнением

$$X = \frac{E_0 S_0}{K_m + S_0} \left[1 - e^{-(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)t} \right], \quad (2.8)$$

концентрация продукта

$$P(t) = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0} t + \frac{k_2 E_0 S_0}{(K_m + S_0)(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)} \left(e^{[-k_1(S_0 + K_m)t]} - 1 \right). \quad (2.9)$$

Для схемы с нереакционноспособным комплексом (схема Анри) соответствующие функции времени представлены уравнениями:

$$X(t) = \frac{S_0 E_0}{K_A + S_0} \left(1 - e^{[-k_1(S_0 + K_A)t]} \right); \quad (2.10)$$

$$P(t) = \frac{K_A k_A E_0 S_0}{K_A + S_0} t - \frac{k_A E_0 S_0^2}{(K_A + S_0) k_1} \left(e^{[-k_1(S_0 + K_A)t]} - 1 \right). \quad (2.11)$$

Сравнение (2.9) и (2.11) показывает, что протекание реакций по схемам Михаэлиса и Анри существенно различается на начальном этапе процесса. Образование реакционноспособного промежуточного соединения в соответствии со схемой Михаэлиса (2.3) должно приводить к появлению периода индукции на кинетической кривой продукт — время реакции (рис. 2.2, кривая 1):

$$\tau = [k_1(S_0 + K_m)]^{-1},$$

в то время как образование нереакционноспособного комплекса сказывается на реакции, приводя к уменьшению скорости процесса (рис. 2.2, кривая 2). Для схемы Анри (2.4) отрезок, отсекаемый асимптотической прямой, соответствующий стационарной скорости процесса, отрицателен:

$$\tau = - \frac{S_0}{k_1 K_A (K_A + S_0)}.$$

Таким образом, эти механизмы могут быть дискриминированы при изучении протекания реакции во времени, в режиме, предшествующем образованию стационарного состояния.

Рассмотренные механизмы имеют лишь историческое значение. В настоящее время неизвестны ферменты, которые действовали бы по простой схеме (2.3) или (2.4). Как правило, реальные механизмы включают большое число промежуточных соединений фермента с субстратом, их идентификация, исследование структуры, скоростей образования и расхода и составляют предмет изучения механизмов ферментативных реакций.

Несмотря на то что схема и уравнение Михаэлиса

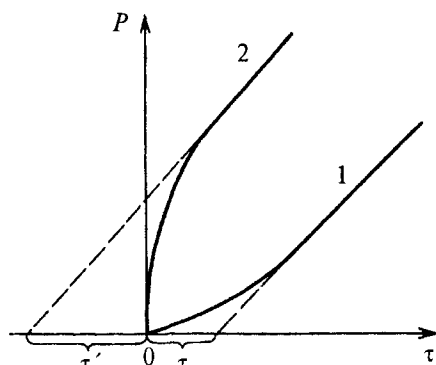


Рис. 2.2. Кинетические кривые образования продукта для реакции, протекающей по механизму Михаэлиса (кривая 1) и Анри (кривая 2).

не соответствует на молекулярном уровне ни одному механизму реакции, использование этого уравнения получило большое распространение. Это одно из фундаментальных уравнений ферментативной кинетики. Уравнение Михаэлиса феноменологически описывает практически все ферментативные реакции, а наблюдаемые отклонения, как правило, связаны с усложнением простейшей схемы. Дело в том, что уравнение Михаэлиса отражает фундаментальную особенность ферментативных реакций — участие в механизме процессов лабильных промежуточных соединений субстрата и активного центра фермента.

Все кинетические схемы, включающие стадии образования и расхода промежуточных соединений, приводят к зависимости скорости от концентрации субстрата типа уравнения Михаэлиса.

Насколько схема Михаэлиса единственна?

Может быть, существуют и другие кинетические схемы к той же самой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата?

Число кинетических схем, приводящих к зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, неограниченно велико. В табл. 2.1 даны

Таблица 2.1

Некоторые кинетические схемы, приводящие к уравнению стационарной скорости, эквивалентному уравнению Михаэлиса

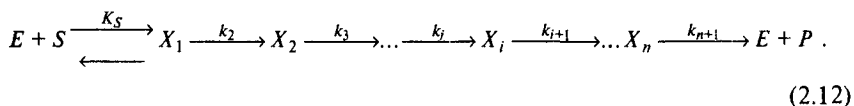
Схема	$k_{\text{кат}}$	K_m
$E + S \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} E + P$	k_2	k_2/k_1
$E + S \xrightleftharpoons{K_S} X \xrightarrow{k_2} E + P$	k_2	K_S
$E + S \xrightleftharpoons{K_A} X; E + S \xrightarrow{k_A} E + P$	$k_A K_A$	K_A
$E + S \xrightleftharpoons{K_S} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} E + P$	$\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$	$\frac{K_S k_3}{k_2 + k_3}$
$E + S_1 \xrightarrow{k_1} X + P_1$ $X + S_2 \xrightarrow{k_2} E + P_2$	$k_2 [S_2]_0$	$\frac{k_2 [S_2]_0}{k_1}$

некоторые простейшие кинетические схемы, приводящие к уравнению начальной стационарной скорости, формально эквивалентному уравнению Михаэлиса.

Несмотря на кажущуюся сложность реакции, вне зависимости от числа и природы интермедиатов, принимающих участие в механизме реакции, стационарная кинетика процесса будет описываться уравнением Михаэлиса. Для характеристики ферментативных реакций обычно определяют оба параметра, входящие в уравнение Михаэлиса–Ментен: максимальную скорость V_m и константу Михаэлиса K_m .

Важно отметить, что без детального знания механизма реакции интерпретация $k_{\text{кам}}$ и K_m как констант связывания фермента субстратом и константы скорости превращения фермент-субстратного комплекса неправильна, поскольку для разных кинетических схем константы $k_{\text{кам}}$ и K_m могут отражать совершенно различные процессы (см. табл. 2.1), тем не менее эти характеристики легко определяются экспериментально и в ряде случаев несут весьма важную информацию о свойствах каталитической реакции.

В качестве иллюстрации положения о существовании множества кинетических схем, приводящих к уравнению Михаэлиса рассмотрим стационарную кинетику фермент-субстратного превращения в более общем случае — для системы с участием произвольного числа — n -промежуточных соединений



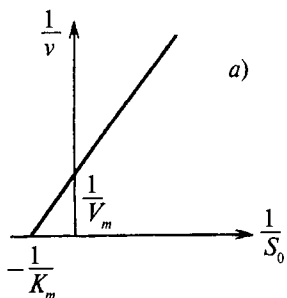
В стационарном состоянии по промежуточным соединениям ($dX_i/dt = 0, i = 2, n$) и при избытке субстрата ($S_0 \gg E_0$) кинетику процесса описывает система уравнений:

$$\begin{aligned} v_0 &= \left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{cm}} = k_{n+1} X_n = k_2 X_1; \\ E_0 &= E + \sum_{i=1}^n X_i; \\ X_i &= X_{i-1} (k_i / k_{i+1}) = X_1 (k_2 / k_{i+1}), \quad i = 2, \dots, n; \\ X_1 &= E \times S_0 / K_S. \end{aligned} \quad (2.13)$$

Для реакции (2.12) зависимость начальной стационарной скорости процесса от концентрации субстрата будет иметь вид уравнения Михаэлиса:

$$v_0 = \frac{k_{\text{кам}} E_0 S_0}{K_m + S_0}, \quad (2.14)$$

где значения $k_{\text{кам}}$ и K_m имеют эффективный характер и заданы уравнениями



$$k_{\text{кам}} = 1 / \sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i} ;$$

$$K_m = \frac{K_S}{k_2} \times 1 / \sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i} .$$

Определение параметров V_m и K_m из экспериментальных данных

Как правило, из данных по стационарной кинетике величины V_m ($k_{\text{каж}}$) и K_m определяют на основе линеаризации уравнения Михаэлиса в рамках одной из его известных модификаций:

1) *метод двойных обратных координат* (рис. 2.3а)

Рис. 2.3. Определение параметров V_m и K_m .

а — метод двойных обратных координат; б — метод Скэтчарда.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S_0} , \quad (2.15)$$

2) *метод Скэтчарда (Иди-Хофсти)* (рис. 2.3б)

$$\frac{v}{S_0} = \frac{1}{K_m} V_m - \frac{1}{K_m} v . \quad (2.16)$$

Пример 2.1 [1]. Определить значения параметров ферментативного гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-валина, катализируемого α -химотрипсином, на основании данных табл. 2.2.

Таблица 2.2

Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата для примера 2.2

S_0 , М	V_0 , М·с ⁻¹ ·10 ⁻⁶
0,200	4,57
0,124	3,83
0,091	3,31
0,071	2,97
0,060	2,74

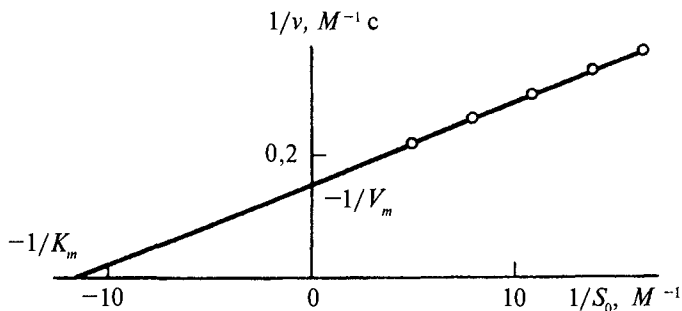


Рис. 2.4. Определение максимальной скорости и константы Михаэлиса для примера 2.2.

Графически экспериментальные данные представлены на рис. 2.4. Из рисунка находим $V_m = 6,6 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $K_m = 8,8 \cdot 10^{-2} \text{ М}$.

Метод графов при анализе кинетических схем

Анализ кинетических схем может быть существенно упрощен за счет применения теории графов. Данный подход был предложен М.В. Волькенштейном во второй половине 60-х гг. и развит в работах Б.Н. Гольдштейна, Е. Кинга, К.А. Альтмана, Х.Дж. Фромма и др. В настоящее время разработаны методы теории графов как для анализа стационарной скорости ферментативной реакции, так и для анализа нестационарной кинетики. В настоящей книге ограничимся рассмотрением применением теории графов только для анализа стационарной скорости ферментативной реакции.

Теория графов рассматривается в курсе топологии. Центральным понятием этой теории является граф.

Граф — совокупность точек (вершин) и соединяющих их линий. Если линии имеют направления (ориентированы), то их называют дугами (ветвями); если линии не ориентированы, то их называют ребрами. Графы многовариантны при их изображении: прямые ветви можно заменять на дуги и наоборот. Можно менять расположение вершин относительно друг друга. Одинаковые графы, отличающиеся только изображением, называются *изоморфными*. Граф называется *связанным*, если каждая его вершина соединена хотя бы с одной другой вершиной. *Путь графа* — непрерывная совокупность ветвей в каком-либо направлении, при котором ни одна из вершин не встречается более одного раза. В замкнутых графах путь начинают и оканчивают на одной и той же произвольно выбранной вершине. Такой путь называют *циклом*, а граф — *циклическим*.

Совокупность нескольких вершин, соединенных ветвями, называется *деревом*.

Теория графов широко используется в современной химии. С помощью теории графов анализируют структуры органических соединений, устанавливают возможное число изомеров. Теория графов используется для оптимизации расчетов целого ряда математических моделей химической кинетики, статистического анализа многопараметрических физико-химических процессов.

В химической кинетике каждой ветви графа приписывается численное значение. Данное численное значение является аналогом константы скорости при написании обыкновенных кинетических схем. С точки зрения теории графов это число характеризует *вес ветви*. Чем больше вес ветви, тем интенсивней идет химическое превращение вдоль данной ветви.

Для анализа кинетических схем с помощью теории графов выбирают одну из вершин графа в качестве *базовой (базы)*. Выбор базы во многом является произвольным. Правильный выбор базы определяется опытом и интуицией исследователя, тем самым облегчая вычисления скорости химической реакции с помощью теории графов.

Базовым деревом называется совокупность всех ветвей, проходящих через все вершины графа и направленных к базе. Обычно в качестве базовой вершины выбирают ту, которая образует наиболее большое базовое дерево. Рассматриваемые ниже подходы требуют, чтобы базовое дерево не содержало циклов. Сумма величин всех базовых деревьев, направленных к данной базе, называется *определителем базы (базовым определителем графа)*. На практике для определения уравнения стационарной скорости ферментативной реакции требуются вычисления всех базовых определителей графа.

Вычисление базового определителя существенно упрощается за счет следующих свойств графа:

1. Кратные ветви складываются: граф $A \begin{matrix} \xrightarrow{a} \\ \xrightarrow{b} \end{matrix} B$ эквивалентен графу $A \xrightarrow{a+b} B$, т.е. путь $(A \rightarrow B)$ равен $a + b$.

2. Ветви, направленные к одной базе, перемножаются: для графа $A \xrightarrow{a} B \xleftarrow{b} C$, т.е. путь $(A, C \rightarrow B)$ равен ab .

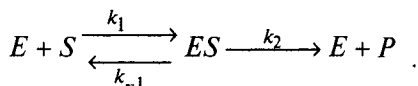
3. Путь графа равен произведению величин всех ветвей этого пути: для графа $A \xrightarrow{a} B \xrightarrow{b} C$ путь $(A \rightarrow B)$ равен ab .

Стационарная скорость ферментативной реакции с помощью метода графов определяется следующим образом:

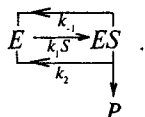
$$v = \frac{\sum_r k_r D_r}{\sum_s D_s} E_0, \quad (2.17)$$

где D_s — базовые определители всех состояний фермента; D_r — базовые определители состояний фермента, приводящие к образованию продукта; k_r — константы скоростей стадий, приводящих к образованию продукта.

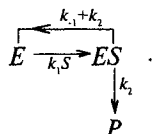
Пример 2.2 [1]. С помощью метода графов рассчитать стационарную скорость реакции для схемы



Для дальнейшего анализа данную схему удобно представить следующим образом:



Так как параллельные ветви графа складываются, то данный граф эквивалентен следующему:



В этом случае базовый определитель, приводящий к образованию продукта, равен $D_r = D_{es} = k_1 S$.

Константа скорости образования продукта равна: $k_r = k_2$.

Кроме того, у данного графа есть и дугой базовый определитель: $D_s = k_{-1} + k_2$.

Тогда стационарная скорость ферментативной реакции определяется следующим образом:

$$v = \frac{k_r D_{ES}}{D_{ES} + D_S} E_0 = \frac{k_1 k_2 S E_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 S} = \frac{k_2 S E_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S}, \quad (2.18)$$

что соответствует уравнению Михаэлиса-Ментен (уравнение (2.6)).

Определение концентраций активных центров

Максимальная скорость реакции определяется произведением каталитической константы (величина, обратная числу оборотов), отражающей скорость лимитирующей стадии и абсолютной молекулярной концентрации активных центров:

$$V_m = k_{\text{кат}} E_0.$$

Для определения концентрации активных центров фермента известно несколько подходов.

1. *Определение по содержанию белка.* Если известно, что фермент содержит один активный центр на молекулу белка и раствор гомогенен по данному белку, т.е. в растворе присутствует лишь один белок, концентрацию активных центров можно определить исходя из содержания белка в растворе:

$$E_0 = \frac{P}{m},$$

где P — концентрация белка, г/л;
 m — молекулярная масса белка, г/моль.

Метод применим лишь для гомогенных растворов белка с известной молекулярной массой.

2. *Определение по протестической группе.* Для некоторых ферментов «меткой» активного центра является протестическая группа. Например, для ферментов, образующих прочный комплекс с гемом, определение концентрации активных центров сводится к определению в растворе гема или его производных.

3. *Определение путем необратимого ингибирования.* Если для фермента известен необратимый ингибитор, блокирующий активный центр, то удобный метод определения концентрации активных центров может быть основан на измерении остаточной активности



Скэтчард Дж.
(1892—1973)

Физикохимик. Основные работы посвящены термодинамике растворов. В 1949 г. предложил координаты для интерпретации равновесных данных в ферментативной и рецепторной кинетике.

фермента после инкубации с различными концентрациями ингибитора

$$v_{нач} = k_{нач}(E_0 - I_0) \quad (2.20)$$

при $I_0 = E_0$: $v_{нач} = 0$

Как правило, на график наносят зависимость наблюдаемой скорости от концентрации ингибитора. Точка пересечения с осью абсцисс дает значение концентрации активных центров (рис. 2.5). На рисунке приведены данные по «титрованию» активных центров с помощью необратимого ингибитора, иллюстрирующие этот подход.

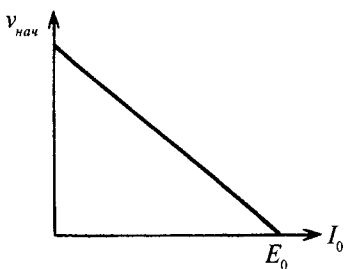
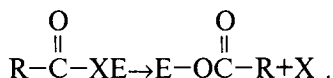


Рис. 2.5. Определение концентрации активных центров путем необратимого ингибирования.

4. *Использование субстратов, стехиометрически образующих малореакционноспособный интермедиат.* Если реакция фермента с субстратом связана со стехиометрическим образованием промежуточного соединения и «выбросом» первого продукта, концентрация активных центров может быть проведена по определению концентрации этого продукта. Так, гидролиз *n*-нитрофениловых эфиров и имидазольных производных алифатических и ароматических кислот под действием сериновых протеаз сопряжен с образованием ацилфермента и стехиометрическим образованием *n*-нитрофенола или имидазола:



Дальнейший гидролиз ацилфермента протекает относительно медленно. Определив концентрацию *X*, например спектрофотометрически, можно определить концентрацию E_0 .

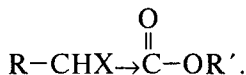
Скоростьопределяющие стадии

Большинство экспериментальных кинетических исследований ферментов выполнено в режиме стационарной кинетики в условиях, когда скорость изменения концентраций лабильных интермедиатов существенно ниже скоростей образования продуктов или расхода субстратов. Как правило, постановка экспериментов в стационарном кинетическом режиме не вызывает сложностей. При этом из данных стационарной кинетики получают принципиально важную информацию о скоростях лимитирующих стадий ферментативных реакций.

Максимальная скорость ферментативной реакции характеризует самый медленный кинетический процесс (или группу самых медленных процессов), протекающий в активном центре катализатора. Действительно, из рассмотренной выше кинетической схемы реакции с участием произвольного числа n лабильных интермедиатов следует, что если существует какая-либо реакция, характеризующая наименьшим значением константы скорости k_i [см. схему (2.12) и уравнение (2.14)], то эта константа будет определять величину максимальной скорости реакции. Если $k_i \ll k_j$, $j = 2, \dots, n, j \neq i$, то $k_{\text{кат}} = k_i$. Поскольку лимитирующие процессы представляют наибольший интерес, информацию, получаемую методами стационарной кинетики, трудно переоценить.

С другой стороны, существуют достаточно большие сложности в интерпретации стационарно-кинетических данных. Идентификация лимитирующих стадий реакции — одна из наиболее сложных задач в исследовании механизмов действия ферментов. Рассмотрим несколько подходов для определения лимитирующей стадии реакции.

1. *Использование субстратов с различной структурой и различной реакционной способностью.* Если заметно различающиеся субстраты характеризуются одним и тем же значением $k_{\text{кат}}$ с высокой степенью достоверности, можно утверждать, что реакция включает образование промежуточного соединения, структура которого является общей для всех исследованных субстратов, и превращение этого интермедиата лимитирует скорость каталитического процесса. Например, изучение гидролиза протеолитическими ферментами различных эфиров общей формулы



где структура R была постоянной, а варьировалась природа уходящей группы R', показало, что определяемое из данных стационарной кинетики значение $V_m(k_{\text{кат}})$ практически не зависит от структуры радикала R, в то время как реакционная способность эфиров в реакции щелочного гидролиза различается очень сильно [Дженкс, 1972]. Это позволило авторам предположить, что в реакции гидролиза α -химотрипсином и папаином сложноэфирных субстратов образуется промежуточное ацилферментное соединение; гидролиз этого интермедиата является скоростьюопределяющей стадией.

В дальнейшем это предположение было проверено независимыми экспериментами: 1) исследовалась кинетика реакции в присутствии добавленных низкомолекулярных реагентов, ускоряющих гидролиз ацилфермента; 2) некоторые ацилферментные проме-

жуточные соединения, относительно стабильные при кислых значениях pH, были выделены в индивидуальном виде и идентифицированы; 3) была исследована предстационарная кинетика реакции и детально изучена кинетическая схема процесса методами быстрокинетических измерений, позволяющих детектировать кинетику образования и расхода ацилфермента.

2. *Нестационарная кинетика.* Этот подход является общим для идентификации механизма реакции и определения лимитирующей стадии процесса. Его особенности рассмотрены ниже.

Проанализируем численные значения каталитических констант скоростей и констант Михаэлиса различных ферментов, с тем чтобы представить «средние» скорости реакций в биохимических системах. Был проведен статистический анализ констант $k_{кат}$ и K_m ферментных систем, для которых измерены к настоящему времени значения $k_{кат}$ и найдены плотности распределения ферментов по значениям каталитических констант. С этой целью ферменты были разбиты на группы приблизительно с одинаковыми (в пределах одного порядка) константами процесса, определялось число ферментов в группе и полученные значения нормировались к общему числу ферментов в выборке.

На рис. 2.6 приведены плотности распределения ферментов по величине $k_{кат}$ и K_m . Кривые, представленные на этом рисунке, отражают вероятность того, что каждый случайно выбранный фермент будет характеризоваться заданным значением параметра. Так, вероятность того, что какой-либо неизвестный фермент имеет значение $k_{кат} = 10^2 \text{ с}^{-1}$, весьма высока $\approx 0,5$. Путем интегрирования плотности распределения могут быть вычислены вероятности того, что выбранный наугад фермент будет обладать кинетическими характеристиками в заданном диапазоне. Из рис.

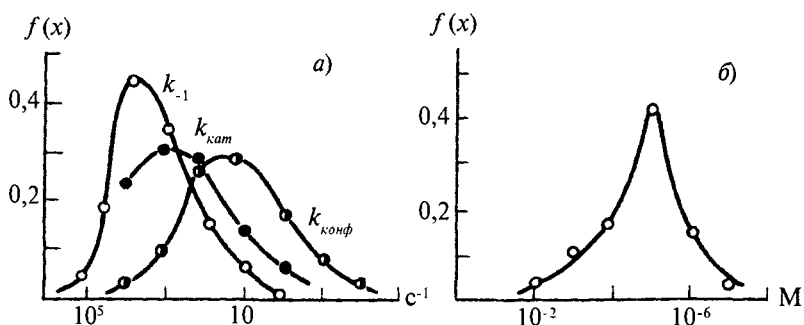
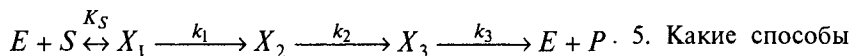


Рис. 2.6. Плотности распределения ферментов по кинетическим (а) и равновесным (б) параметрам.

2.6 видно, что наиболее распространены ферменты, у которых константы скорости лимитирующих стадий реакций имеют порядок 10^2 с^{-1} , $K_m \sim 10^{-4} \text{ М}$. Ферменты весьма унифицированы по каталитическим характеристикам. Энергетический барьер 8–15 ккал/моль, проявляющийся на лимитирующих стадиях ферментативных реакций и приводящий к «числу оборотов» активных центров $\sim 10^2 \text{ с}^{-1}$, обусловлен, по-видимому, рядом физико-химических эффектов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как зависит скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата? Какие схемы предложены для объяснения этой зависимости? 2. Можно ли дискриминировать схемы Михаэлиса и Анри? 3. Является ли схема Михаэлиса единственной? 4. Получите уравнение начальной стационарной скорости реакции, протекающей по схеме



5. Какие способы определения кинетических и равновесных параметров ферментативной реакции вы знаете? 6. Какие методы определения концентрации активных центров вы знаете? 7. Какие существуют методы определения скоростопределяющих стадий?

2.2. Типичные зависимости начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата

Что для одного ошибки, для другого — исходные данные.

Правило Бермана

В § 2.1 была приведена наиболее распространенная зависимость начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата. Эта зависимость описывается уравнением Михаэлиса

$$v_0 = \frac{k_{\text{кам}} E_0 S_0}{K_m + S_0}$$

и является отражением участия интермедиатов в процессе конверсии субстрата в активном центре фермента. При низких концентрациях субстрата ($S_0 \ll K_m$) скорость реакции имеет первый порядок по каждому из реагирующих веществ и суммарный второй порядок

$$v_0(S_m \ll K_m) = \frac{k_{кат}}{K_m} E_0 S_0$$

и отражает стадию взаимодействия субстрата с активным центром фермента. Наблюдаемая константа скорости имеет вид

$$k_{набл}(S_0 \ll K_m) = k_{кат}/K_m.$$

При больших «насыщающих» концентрациях субстрата скорость отражает какой-либо мономолекулярный процесс, протекающий в активном центре фермента после взаимодействия с субстратом:

$$v_0(S_0 \gg K_m) = k_{кат} E_0.$$

Графически зависимость $v_0(S_0)$ для «классического» случая приведена на рис. 2.1 и 2.7 (кривая *а*).

Известны также и другие зависимости. Экспериментально наблюдаются зависимости скорости реакции от концентрации субстрата с экстремумом (рис. 2.7, кривая *б*) или с ускорением на начальном этапе (рис. 2.7, кривая *в*). За каждым из этих случаев стоит соответствующий механизм, который приводит к тому или иному типу зависимости. Для этих реакций уравнение Михаэлиса–Ментен не описывает экспериментально наблюдаемой зависимости скорости от концентрации субстрата. Эти случаи связаны со значительными изменениями в механизме реакции и, как правило, вызывают интерес исследователей, поскольку эффекты такого рода имеют большое регуляторное значение. Известно несколько механизмов, приводящих к «немихаэлисовым» зависимостям скорости реакции. Все эти механизмы связаны с взаимодействием с ферментом нескольких молекул субстрата. Отклонения могут быть вызваны ингибированием или активацией реакции избытком субстрата, а также аллостерическими эффектами.

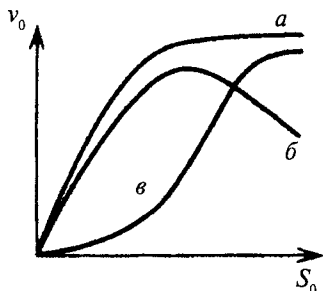


Рис. 2.7. Различные виды зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Ингибирование и активация избытком субстрата.

Кривые с максимумом

Ингибирование субстратом приводит к экстремальной зависимости скорости от концентрации субстрата (рис. 2.8, кривые *а* и *б*). Экспериментально активация субстратом проявляется в увеличении скорости реакции при повышенных концентрациях субстрата (рис. 2.8, кривые *в* и *г*).

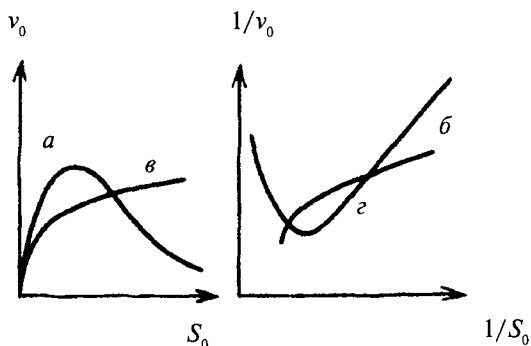
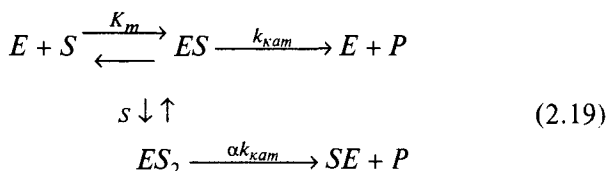


Рис. 2.8. Зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата для случаев ингибирования (*а, б*) и активации (*в, г*) фермента избытком субстрата.

Оба этих эффекта обычно объясняют образованием тройного комплекса фермент–субстрат–субстрат, отличающегося по реакционной способности от фермент–субстратного комплекса:



С учетом дополнительного равновесия, характеризуемого константой диссоциации

$$K_S^i = \frac{ES \times S_0}{ES_2},$$

уравнение начальной стационарной скорости будет иметь вид

$$v = \frac{\left(k_{\text{кам}} + \frac{\alpha k_{\text{кам}} S_0}{K_S^i} \right) E_0 S_0}{K_m + S_0 + \frac{S_0^2}{K_S^i}}. \quad (2.20)$$

Если $\alpha > 1$, уравнение (2.20) объясняет эффект активации субстратом, если $\alpha < 1$ — эффект ингибирования субстратом.

Если тройной комплекс ES_2 полностью нереакционноспособен ($\alpha = 0$), уравнение скорости будет дано функцией

$$v = \frac{k_{kam} E_0 S_0}{K_m + S_0 \left(1 + \frac{S_0^2}{K_S^i} \right)} . \quad (2.21)$$

Это трехпараметрическое уравнение. Такого типа уравнения достаточно часто встречаются в стационарной кинетике ферментативного катализа. Помимо субстратного торможения трехпараметрическое уравнение описывает рН-зависимости ферментативных реакций, активацию и ингибирование ионами металлов и некоторые другие задачи. При определении численных параметров в случае, если параметры K_m и $K_m / K_S^i \leq 0,1$, с достаточной степенью точности можно использовать асимптотические приближения.

При относительно низких концентрациях субстрата, когда $S_0 \ll K_S^i$, уравнение (2.20) трансформируется к следующему виду:

$$v = \frac{k_{kam} E_0 S_0}{K_m + S_0} ,$$

т.е. представляет собой уравнение Михаэлиса, из которого определяют параметры V_m и K_m .

Высокие концентрации субстрата выводят систему в режим $S_0 \gg K_m$, в этих условиях скорость реакции описывается уравнением

$$v = \frac{k_{kam} E_0}{1 + \frac{S_0}{K_S^i}} . \quad (2.22)$$

Из этого уравнения при использовании анаморфозы

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{V_m K_S^i} S_0 \quad (2.23)$$

можно найти параметры V_m и K_S^i .

В качестве иллюстрации этого метода на рис. 2.9 приведена зависимость от концентрации формиата активности формиатгидрогеназы, трансформирующей муравьиную кислоту в водород и CO_2 . Реакция ингибируется избытком субстрата, и скорость выделения водорода при высоких концентрациях формиата близка к нулю.

Параметры реакции V_m , K_m и K_S^i определены при использовании асимптотических приближений в соответствии с уравнениями (2.22) и (2.23): $V_m = 16,6 \text{ ед. D/}(\text{мин} \cdot \text{мг})$, $K_S^i = 6 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, $K_m = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$.

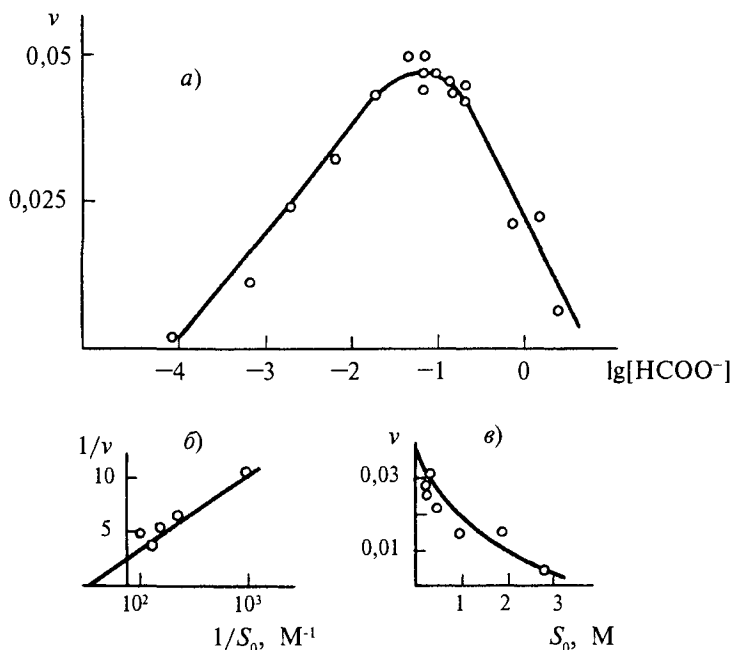
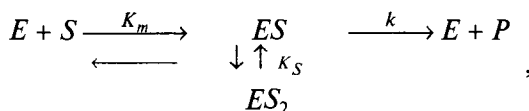


Рис. 2.9. Зависимость активности форматгидрогениазы от концентрации формата и определение параметров в соответствии с уравнениями (2.22) и (2.23) (экспериментальные данные С.С. Зацепина, И.Н. Курочкина, С.В. Зайцева).
 Размерность скорости реакции: (мкл H_2)/(мг белка·мин).

Пример 2.3 [1]. На основании данных табл. 2.3 определить параметры реакции трансметилирования 3,4-дихлорфенилэтаноламина, катализируемой фенилэтаноламин-N-метилтрансферазой.

Представим экспериментальные данные в координатах (v , $\log S$) (рис. 2.10). Как видно, наблюдается процесс ингибирования скорости реакции высокими концентрациями субстрата. Данный процесс можно описать следующей кинетической схемой:



а скорость реакции определяется уравнением

$$v = \frac{V_m S_0}{K_m + S_0 + \frac{S_0^2}{K_S}} .$$

При малых концентрациях субстрата данное уравнение сводится к уравнению Михаэлиса: $v(S_0 \ll K_S^i) = V_m / (K_m + S_0)$.

Тогда в двойных обратных координатах найдем V_m и K_m (рис. 2.11а): $V_m = 7,15 \cdot 10^{-10} \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$, $K_m = 8 \cdot 10^{-7} \text{ М}$.

При больших концентрациях субстрата уравнение скорости для реакции ингибирования избытком субстрата запишется следующим образом:

$$v(S_0 \gg K_m) = \frac{V_m S_0}{S_0 + \frac{S_0^2}{K_S^i}} = \frac{V_m}{1 + \frac{S_0}{K_S^i}}.$$

Тогда

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{S_0}{K_S^i}}{V_m} = \frac{1}{V_m} + \frac{S_0}{K_S^i V_m}.$$

В координатах $(1/v, S_0)$ находим $K_S^i = 3,25 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ (рис. 2.11б).

Разностный метод определения параметров K_m и K_S^i

Если величины констант K_m и K_S^i соизмеримы, использование указанных приближений приводит к большим ошибкам. В этом случае целесообразно использовать разностный метод, развитый Полтораком и сотрудниками [Полторако, Пряхин, Чухрай, 1976].

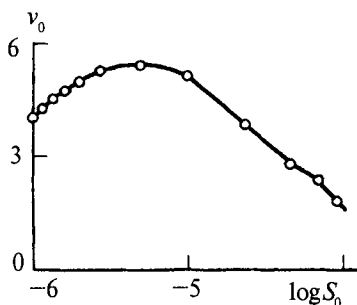


Рис. 2.10. Зависимость скорости реакции трансметилирования от концентрации субстрата (пример 2.3).

Таблица 2.3

Зависимость скорости реакции трансметилирования от начальной концентрации субстрата для примера 2.3

$S_0 \cdot 10^{-6}, \text{ М}$	$v \cdot 10^{10}, \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$	$S_0 \cdot 10^{-6}, \text{ М}$	$v \cdot 10^{10}, \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$
1,00	4,00	10,0	5,16
1,14	4,25	25,0	3,85
1,33	4,55	50,0	2,82
1,60	4,76	75,0	2,33
2,00	5,00	100,0	1,79
2,67	5,26	125,0	1,47
5,00	5,45	150,0	1,28

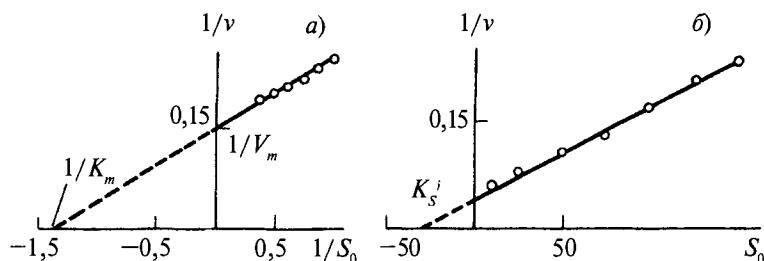


Рис. 2.11. Определение кинетических параметров реакции трансметирирования (пример 2.3).

Сущность метода заключается в следующем. Уравнение (2.21) можно преобразовать к виду

$$y = ax^2 + bx + c,$$

где a , b и c — постоянные, а переменные y и x — некоторые функции экспериментально определяемых переменных величин.

Полученное уравнение можно представить в другом виде:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} S + \frac{1}{V_m K_S^i} S^2. \quad (2.24)$$

Соответственно $y = S/v$, $x = S$.

Если взять разность между двумя точками x_i и x_m , то эти разности будут удовлетворять уравнению

$$\Delta y = a\Delta x(x_i + x_m) + b\Delta x,$$

которое можно представить как линейное соотношение «разностных» функций $\Delta y/\Delta x$ и $x_i + x_m$:

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = a(x_i + x_m) + b.$$

Из зависимости $\Delta y/\Delta x$ от $x_i + x_m$ можно найти параметры a и b .

Проиллюстрируем разностный подход на примере исследования зависимости начальной скорости фосфоглюкомутазной реакции от концентрации ионов Mg^{2+} (рис. 2.12). Если зависимость скорости содержит k экспериментальных точек, то на их основе можно построить $k(k-1)/2$ зна-

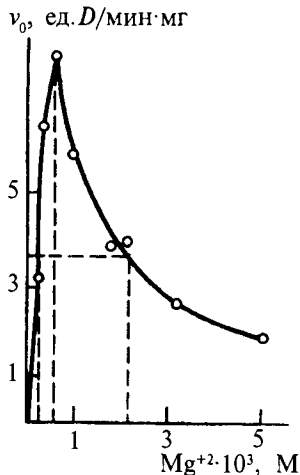


Рис. 2.12. Зависимость начальной скорости фосфоглюкомутазной реакции в условиях насыщения от концентрации ионов магния (Полтораки и др., 1976).

чений разностных отношений к сумме ($x_i + x_m$). В случае фосфоглюкоматазы ион магния выступает в качестве активатора и ингибитора реакции при его избытке:

$$v = \frac{V_m \text{Mg}^{2+}}{K + \text{Mg}^{2+} + (\text{Mg}^{2+})^2 / K_i}.$$

Соответственно разностное уравнение включает в качестве переменной величины концентрацию ионов магния

$$\frac{\Delta \text{Mg}^{2+}}{\frac{v}{\Delta \text{Mg}^{2+}}} = \frac{1}{V_m} + \frac{1}{V_m K_i} \left[(\text{Mg}^{2+})_i + (\text{Mg}^{2+})_m \right], \quad (2.25)$$

где K_i — константа ингибирования реакции избытком ионов магния.

На рис. 2.13а построен график зависимости $v(\text{Mg}^{2+})$ в координатах уравнения (2.25), из которого определены величины $V_m = 16,6$ ед. $D/(\text{мин} \cdot \text{мг})$; $K_i = 0,6 \cdot 10^{-3}$ М.

Для нахождения величины K можно воспользоваться преобразованием

$$\frac{1}{v \text{Mg}^{2+}} = \frac{K}{V_m} \frac{1}{(\text{Mg}^{2+})^2} + \frac{1}{V_m} \frac{1}{\text{Mg}^{2+}} + \frac{1}{K_i}$$

и использовать переменные $y = 1/v \text{Mg}^{2+}$, $x = 1/\text{Mg}^{2+}$. В этом случае разностное уравнение запишется в виде

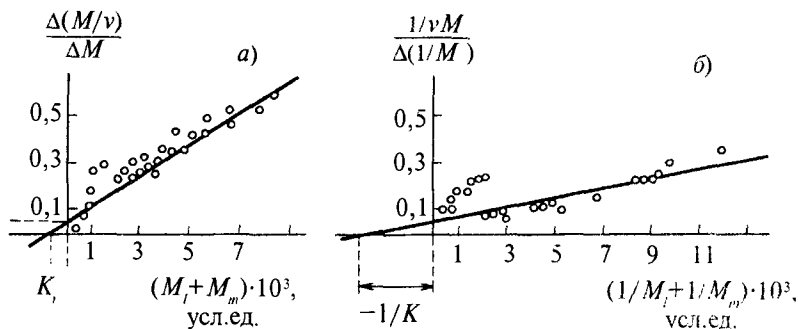


Рис. 2.13. Определение констант трехпараметрического уравнения, описывающего зависимость скорости фосфоглюкоматазной реакции от концентрации ионов магния (M).

a — определение констант ингибирования [уравнение (2.25)]; *б* — определение констант активации [уравнение 2.26)].

$$\frac{\Delta\left(\frac{1}{\text{Mg}^{2+}_v}\right)}{\Delta\left(\frac{1}{\text{Mg}^{2+}}\right)} = \frac{1}{V_m} + \frac{K}{V_m} \left[\frac{1}{(\text{Mg}^{2+})_i} + \frac{1}{(\text{Mg}^{2+})_m} \right]. \quad (2.26)$$

График зависимости (2.26) представлен на рис. 2.13б. На основе этих данных определяются величины V_m и K .

Разностные методы — достаточно удобный инструмент при анализе многопараметрических уравнений. При определении параметров многократно используются экспериментальные точки. Однако применять разностные методы следует с известной осторожностью, например они не пригодны для экспериментальных данных, полученных с большой случайной погрешностью. В этом случае разностные функции дают значительный разброс точек, что приводит к высокой неопределенности в искомых параметрах. Кроме того, при построении разностных функций необходимо использовать достаточно большие значения Δy и Δx так, чтобы они существенно превосходили случайную ошибку эксперимента. При этом целесообразно для вычисления разностей использовать значения функций на различных («восходящих» и «нисходящих») участках экспериментальной зависимости.

Аллостерические эффекты. Уравнение Хилла. Модель Моно—Уаймена—Шанжё

Большое внимание исследователей привлекали достаточно часто наблюдаемые отклонения от уравнения Михаэлиса, приводящие к сигмоидальной зависимости скорости реакции (степени насыщения) от концентрации субстрата. Впервые модель, приводящая к сигмоидальной кривой, была рассмотрена в 1909 г. Хиллом при интерпретации зависимости «насыщения» гемоглобина кислородом от парциального давления кислорода. На рис. 2.14 приведена типичная экспериментально наблюдаемая зависимость. По своей физической сущности функции степени насыщения гемоглобина кислородом и насыщения фермента субстратом полностью эквивалентны и могут рассматриваться в рамках одного подхода.

Для объяснения экспериментально наблюдаемой зависимости было предположено, что в молекуле гемоглобина существует n центров связывания и процесс образования комплекса представляет собой кооперативное взаимодействие нескольких частей:

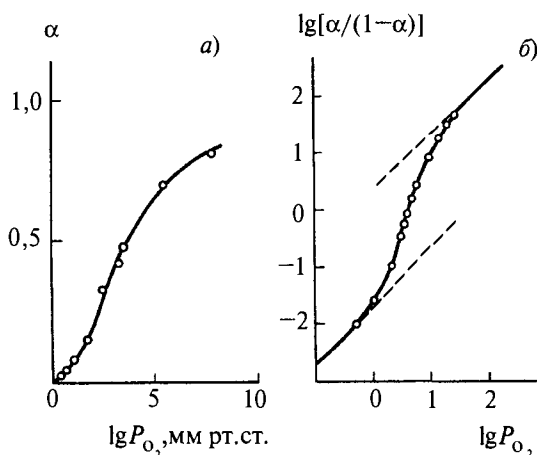


Рис. 2.14. Зависимость степени насыщения гемоглобина кислородом (а) и представление этих данных в координатах Хилла (б) [Wyman, 1968].



где P — молекула белка.

Соответственно данный процесс может быть описан системой уравнений:

$$Ka = \frac{P(O_2)_n}{P(O_2)^n};$$

$$P_0 = P + P(O_2)_n. \quad (2.28)$$

где P_0 — общая концентрация белка.

Если ввести безразмерный параметр «степень насыщения»

$$\alpha = \frac{P(O_2)_n}{P_0}, \quad (2.29)$$

то из уравнений (2.28) следует:

$$\alpha = \frac{Ka(O_2)^n}{1 + Ka(O_2)^n}. \quad (2.30)$$

При очень низких концентрациях (парциальных давлениях) кислорода степень насыщения должна описываться степенной функцией концентрации кислорода:

$$Ka(O_2)^n \ll 1; \quad \alpha = Ka(O_2)^n. \quad (2.31)$$

В соответствии с уравнением Хилла (2.30) эксперименталь-



Полторак О.М.

Физикохимик. Основоположник физической химии ферментного катализа.

ные данные должны линеаризоваться в координатах $\lg(\alpha/1 - \alpha)$ от $\lg O_2$, при этом тангенс угла наклона определяется числом молекул лиганда, связывающихся с белком:

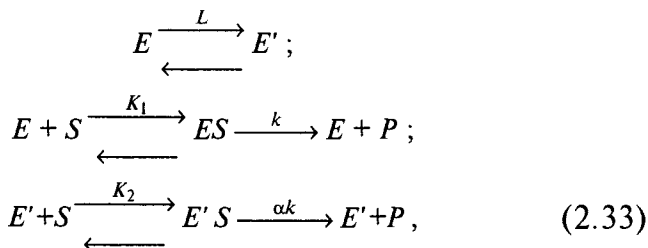
$$\lg\left(\frac{\alpha}{1 - \alpha}\right) = \lg K_a + n \lg O_2. \quad (2.32)$$

Тщательная проверка уравнения Хилла при использовании уравнения (2.32) показала, что модель Хилла недостаточно адекватно описывает экспериментальные данные. Во-первых, данные большинства работ не линеаризуются в координатах простого уравнения (2.32) (см. рис. 2.14). Во-вторых, максимальный наклон участка кривых в координатах уравнения (2.32) не превышает 2,8, в то время как из независимых экспериментальных данных

известно, что одна молекула гемоглобина связывает четыре молекулы кислорода. В соответствии с этим модель Хилла потребовала дальнейшей детализации, усовершенствования и развития.

Принципиальным для объяснения сигмоидальной кинетики является предположение о кооперативном взаимодействии нескольких частиц, приводящих к образованию реакционноспособного состояния активного центра. Для этого необходимо предположить наличие некоего механизма влияния частиц друг на друга. Простейшим является предположение о существовании конформеров фермента, обладающих разными свойствами в зависимости от наличия или отсутствия молекулы субстрата на связывающем центре. Важно подчеркнуть, что сигмоидальность появляется, если в системе имеется несколько центров связывания, приводящих к образованию комплексов $E(S)_n$.

Проиллюстрируем это простым примером. Рассмотрим кинетическую модель, включающую два состояния фермента E и E' , каждое из которых взаимодействует с одной молекулой субстрата:



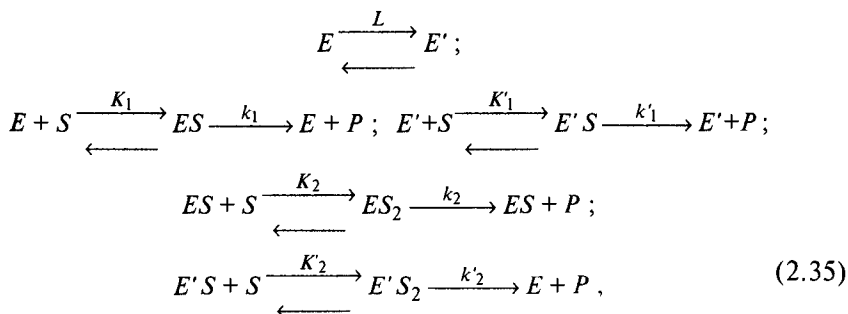
где L — константа равновесия между двумя конформерами; K_1 , K_2 — константы диссоциации фермент-субстратных комплексов; k и αk — каталитические константы для форм E и E' соответственно.

Для данной кинетической схемы сигмоидальность на зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата отсутствует. Уравнение скорости имеет вид обычного уравнения Михаэлиса, где определяемые каталитическая константа и константа Михаэлиса соответственно равны

$$k_{\text{кат}} = \frac{k \left(\frac{1}{K_1} + \frac{\alpha L}{K_2} \right)}{\frac{1}{K_1} + \frac{L}{K_2}}; \quad K_m = \frac{1 + L}{\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2}}. \quad (2.34)$$

В реакции не образуются комплексы фермента с несколькими молекулами субстрата, нет взаимодействия между центрами и, как следствие, кинетика процесса описывается «классическим» уравнением Михаэлиса.

Простейшая кинетическая схема, приводящая к сигмоидальной кинетике, имеет вид:



где L — константа равновесия конформеров, получившая название аллостерической константы.

Для простоты предположим, что реакционной способностью обладает лишь форма $E'S_2$. В этом случае уравнение начальной стационарной скорости будет иметь вид

$$v_0 = \frac{k'_2 E_0 \frac{S^2}{K'_1 K'_2}}{1 + \frac{S}{K_1} + \frac{S^2}{K_1 K_2} + L \left(1 + \frac{S}{K'_1} + \frac{S^2}{K'_1 K'_2} \right)} \quad (2.36)$$

Если эффективность связывания субстрата формами E и E' приблизительно одинаковы ($K_1 = K'_1$, $K_2 = K'_2$), уравнение скорости можно представить функцией

$$v = \frac{k'_2 E_0 L \frac{S^2}{K'_1 K'_2}}{(1 + L) \left(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{S^2}{K_1 K_2} \right)} \quad (2.37)$$

При высоких «насыщающих» концентрациях субстрата система переходит в режим максимальной скорости

$$V_m = k'_2 E_0 \frac{L}{1+L} \quad (2.38)$$

При низких концентрациях субстрата $S \ll K_1$, $S \ll K_2$ скорость представляет собой квадратичную функцию концентрации субстрата:

$$v = V_m \frac{S^2}{K'_1 K'_2} \quad (2.39)$$

На рис. 2.15 приведены экспериментальные зависимости скорости реакции декарбоксилирования, катализируемой дрожжевой пируватдекарбоксилазой от концентрации пирувата. При очень низких концентрациях субстрата скорость реакции является нелинейной функцией его концентрации (рис. 2.15б).

Очевидно, что схему (2.35) можно обобщить и для случая произвольного числа n взаимодействующих центров. В условиях справедливости изложенных выше предположений (положительная кооперативность, т.е. реакционноспособная частица $E(S)_n$) константы связывания субстрата для обоих конформеров близки:

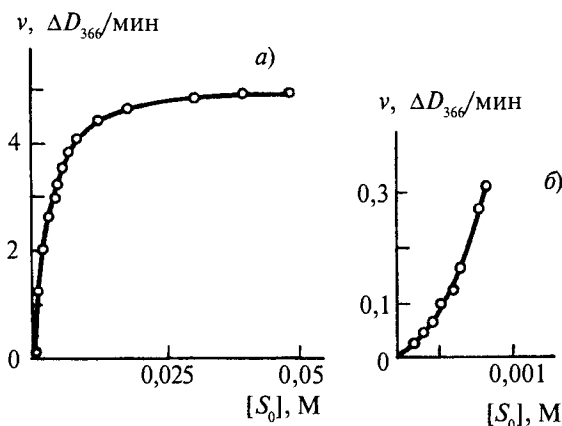


Рис. 2.15. Зависимость скорости от концентрации субстрата для дрожжевой пируватдекарбоксилазы (а) и начальный участок этой зависимости (б) (Ullrich, Doriner, 1970).

$K_1 = K_1' \dots K_n = K_n'$) рассмотрение, аналогичное проведенному выше, приводит к уравнению:

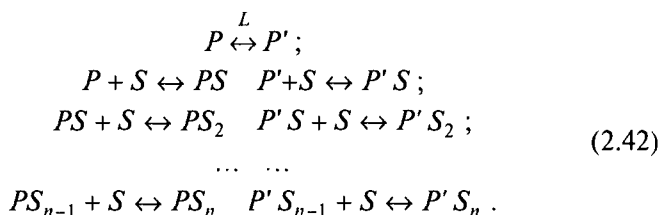
$$v = \frac{k_2' E_0 L \frac{S^n}{K_1' \dots K_n'}}{(1 + L) \left(1 + \frac{S}{K_1} + \dots + \frac{S^n}{K_1' \dots K_n'} \right)}. \quad (2.40)$$

Соответственно число связывающих центров можно определить из анализа зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при низких концентрациях, когда справедливо уравнение

$$\lg v = \lg V_m - \lg(K_1 \dots K_m) + n \lg S. \quad (2.41)$$

Для экспериментальных данных, приведенных на рис. 2.15, степень функциональной зависимости близка к двум, т. е. в этой реакции происходит взаимодействие на одной молекуле белка по крайней мере двух молекул субстрата.

Для описания более сложных аллостерических эффектов детальная кинетическая модель была разработана Моно, Уайменом и Шанжэ [Mono, Wyman, Changeux, 1965]. Рассматривалась система четырех взаимодействующих центров, для которых с учетом существования конформационного равновесия белка схему процесса можно представить в виде



Степень «насыщения» белка субстратом, которая определяется как отношение суммы концентраций форм, содержащих субстрат, к общей концентрации белка, для схемы (2.42) при $n = 4$ будет дана уравнением

$$\alpha = \frac{\frac{S}{K_R} \left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^3 + L \frac{S}{K_T} \left(1 + \frac{S}{K_T}\right)^3}{\left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^4 + L \left(1 + \frac{S}{K_T}\right)^4}, \tag{2.43}$$

где K_R и K_T — эффективные константы связывания, являющиеся функциями элементарных констант равновесия реакций в схеме (2.42).

В более общем виде для системы n центров связывания степень насыщения дается уравнением

$$\alpha = \frac{\frac{S}{K_R} \left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^{n-1} + L \frac{S}{K_T} \left(1 + \frac{S}{K_T}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^n + L \left(1 + \frac{S}{K_T}\right)^n}. \tag{2.44}$$

Из уравнения (2.44) следует, что экспериментально аллостерический эффект, проявляющийся в сигмоидальной зависимости скорости от концентрации субстрата, при указанном приближении наиболее легко обнаруживается, если в равновесном состоянии концентрации конформеров соизмеримы ($L \approx 1$). Действительно, если аллостерическая константа близка к нулю, уравнение (2.44) редуцируется в обычную гиперболическую зависимость

$$\alpha = \frac{S/K_R}{1 + \frac{S}{K_R}}. \tag{2.45}$$

То же самое уравнение имеет место, если L очень велико.

Аллостерические эффекты имеют большое регуляторное значение [Ньюсхолм, Старт, 1977]*. Наличие сигмоидальной зависимости делает систему существенно более чувствительной к изменению концентрации субстрата. Проиллюстрируем это вслед за Ньюсхолмом и Стартом численным расчетом. Если предположить, что субстрат связывается лишь с формой E , т. е. значения K_T очень велики и в сумме членами S/K_T можно пренебречь по сравнению с единицей, уравнение (2.43) редуцируется в форму

$$\alpha = \frac{\frac{S}{K_R} \left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^3}{L + \left(1 + \frac{S}{K_R}\right)^4} \quad (2.46)$$



Курганов Б.И.

Физикохимик, биохимик. Создал теорию аллостерических эффектов при действии диссоциирующих олигомерных ферментов.

В этих условиях изменение концентрации субстрата, необходимое для увеличения степени насыщения, зависит от величины аллостерической константы. В табл. 2.4 приведены расчетные данные по изменению концентрации субстрата, обеспечивающей степень насыщения 0,1 и 0,9 и относительные изменения концентраций, необходимые для увеличения степени насыщения от 0,1 до 0,9. Видно, что для простой гиперболической зависимости, полученной из уравнения Михаэлиса ($L = 0$), для изменения степени насыщения от 0,1 до 0,9 необходимо в 80 раз изменить концентрацию субстрата. С другой стороны, в случае аллостерического механизма с аллостерической константой 10^4 это изменение достигается увеличением концентрации в 4 раза.

Таким образом, регуляторное значение сигмоидальности заключается в повышении чувствительности системы к concentra-

* В молекулярных механизмах проведения и усиления рецепторного сигнала аллостерические эффекты также играют большую роль (см. § 3.2).

**Изменение концентрации регулятора, необходимое для увеличения степени насыщения аллостерического фермента от 0,1 до 0,9
[Ньюсхолм, Старт, 1977] (рассчитано по модели Моно-Уаймена-Шанжё при $n = 4$)**

Аллостерическая константа	Относительная концентрация регулятора, обеспечивающая степень насыщения		Относительное увеличение концентрации регулятора, необходимое для увеличения степени насыщения от 0,1 до 0,9
	0,1	0,9	
0 (гиперболическая зависимость Михаэлиса-Ментен)	0,11	9,0	81
1	0,18	8,0	44,4
100	1,20	9,8	9,2
500	2,0	11,5	5,7
10^3	2,6	12,6	4,8
10^4	5,0	19,6	3,9
10^6	9,60	32,6	3,4

ции субстрата и сведения к минимуму изменений концентраций, необходимых для существенного повышения или понижения активности фермента.

Кинетическая теория аллостерических взаимодействий получила большое развитие благодаря работам Б.И. Курганова. Помимо эффектов взаимодействия центров на одной молекуле белка сигмоидальная кинетика может наблюдаться и для диссоциирующих ферментных систем (Курганов Б.И. Аллостерические ферменты. М., 1978).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

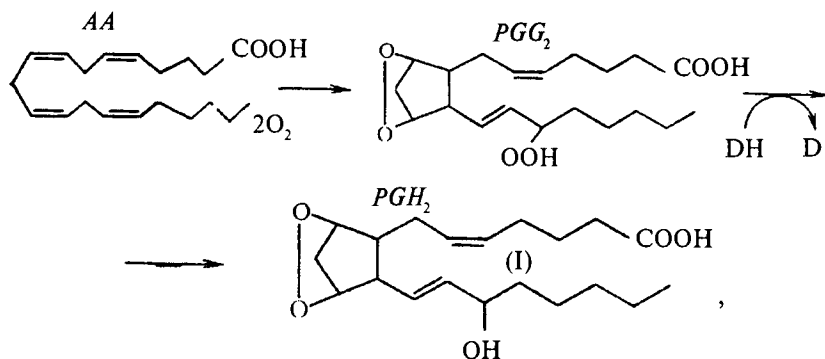
1. Какие факторы могут привести к отклонению кинетики ферментативной реакции от уравнения Михаэлиса? 2. Опишите случай ингибирования (активации) ферментативной реакции избытком субстрата. Приведите примеры. 3. Какие модели аллостерического взаимодействия ферментов с субстратами вы знаете? 4. Почему схема Хилла неудовлетворительно описывает аллостерические эффекты? 5. Почему схема (2.33) не описывает аллостерические эффекты? 6. Напишите основные уравнения модели Моно-Уаймена-Шанжё. 7. Какое значение имеют аллостерические эффекты в регуляции биологических процессов?

2.3. Многосубстратные реакции

Число гипотез, объясняющих данное явление, обратно пропорционально объему знаний о нем.

Теория Эдингтона

Ферменты, как правило, катализируют реакции с участием двух или нескольких субстратов. Односубстратные реакции в большинстве случаев являются частным случаем многосубстратных, протекающих в режиме большого избытка одного из компонентов реакции. Например, гидролитические реакции протекают при большом постоянном избытке воды, и в силу этого реакции имеют кажущийся односубстратный характер. Известны случаи, когда механизм каталитического действия включает взаимные реакции большого числа субстратов. Так, первая реакция образования простагландинов под действием эндопероксидпростагландинсинтетазы (циклооксигеназа) из ненасыщенных тетраеновых кислот представляет собой двойное окисление с внедрением двух молекул кислорода, сопровождающееся последующим восстановлением перекисной группы в 15-м положении:



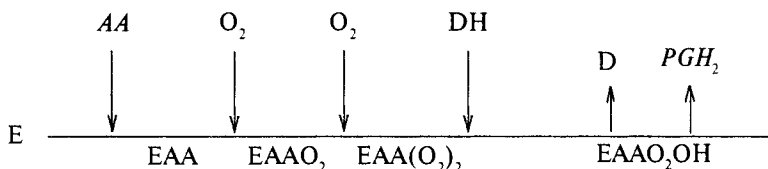
где AA — арахидоновая кислота; D — донор электронов; DH — восстановленная форма донора; PGH₂ — продукт реакции, простагландин H₂; PGG₂ — циклоперекись.

Первым относительно стабильным продуктом реакции, обнаруживаемым в растворе, является циклоперекись. Однако реакция циклооксигенирования ненасыщенных кислот не протекает в отсутствие четвертой молекулы субстрата — донора электронов, который принимает участие в восстановлении перекисной группы в 15-м положении.

Для изображения двусубстратных реакций Келланд предло-

жил использовать схемы, в которых обозначены промежуточная стадия и стадии ввода субстратов и вывода продуктов. Рассмотрим два примера.

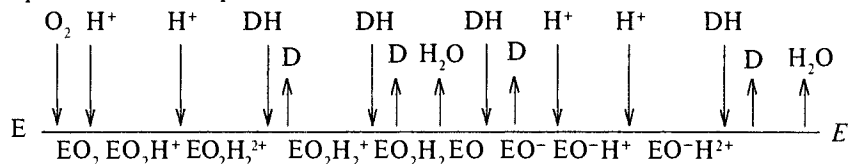
Пример 2.4. Изобразить схему Келланда для циклооксигеназной реакции. Для циклооксидазной реакции в механизме простагландинсинтетазы схему реакции в первом приближении можно представить в виде



Здесь AA — арахидоновая кислота; D — донор электронов; DH — восстановленная форма донора; PGH_2 — продукт реакции, простагландин H_2 ; E — фермент. Механизм реакции включает по крайней мере четыре стадии взаимодействия активного центра (или промежуточных соединений) с субстратами и две стадии образования продуктов.

Пример 2.5. Изобразить с помощью схемы Келланда реакцию восстановления кислорода до воды с помощью голубых медьсодержащих оксидаз.

Реакция восстановления кислорода до воды с помощью голубых медьсодержащих оксидаз является многостадийной и многосубстратной. Реакция включает процесс присоединения кислорода и перенос на кислород четырех электронов и четырех протонов. Если окисляемое вещество — субстрат реакции — представляет собой одноэлектронный донор, то схему процесса можно представить в виде



Здесь $EO_2, \dots, EO-H^{2+}$ — возможные промежуточные состояния активного центра. Механизм реакции включает стадии присоединения кислорода, переноса четырех протонов, четыре стадии взаимодействия с донорами и отщепление двух молекул воды.

Задача кинетического анализа заключается в идентификации промежуточных соединений и изучении последовательности их взаимопревращений.

Очевидно, что из данных стационарной кинетики получить полную информацию о механизме таких сложных реакций нельзя, однако кинетический анализ в стационарных условиях позволяет строго выявить механизмы и последовательности стадий, которые гарантированно не имеют места в механизме реакции. Кроме

того, важным представляется количественная характеристика отдельных стадий и определение констант скоростей элементарных реакций. При анализе механизмов многосубстратных реакций большую информацию дает исследование зависимостей скорости реакции от концентрации всех субстратов. Эти зависимости позволяют дискриминировать механизмы и получить определенную информацию о возможной последовательности стадий. В современном виде теория многосубстратных реакций представлена в работах П.В. Вржеша и С.Д. Варфоломеева.

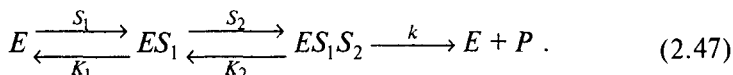


Вржеш П.В.

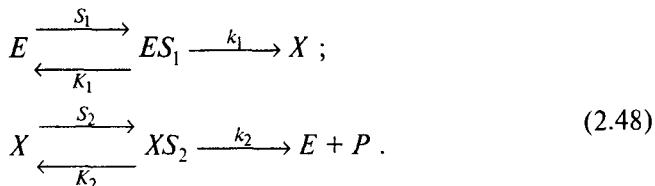
Участников событий в реакции с двумя субстратами три: активный центр E , субстрат S_1 и субстрат S_2 . Возможны два принципиально различных сценария развития событий.

1. Активный центр фермента последовательно образует комплексы с одним и вторым субстратом, лимитирующая реакция протекает в *тройном комплексе*

Физикохимик, биохимик. Совместно с С.Д. Варфоломеевым разработал теорию ферментативных реакций, разработал теорию ферментативных реакций с субстратиндуцируемой инактивацией ферментов.



2. Стадии взаимодействия субстратов с активным центром фермента разделены каким-либо необратимым химическим превращением (*пинг-понг механизм*). Например, имеет место следующая цепь событий:



Происходит образование комплекса активного центра с первым субстратом S_1 , за этим следует его химическая трансформация

ция с образованием интермедиата X . Второй субстрат S_2 реагирует уже с необратимо трансформированным фермент-субстратным комплексом.

Может ли кинетика дать ответ, какой из этих механизмов проявляется в каком-либо конкретном случае? Попробуем ответить на этот вопрос. С этой целью получим уравнение начальной стационарной скорости для двух записанных выше кинетических схем и сравним решения.

Механизм образования тройного комплекса

Стационарная скорость реакции для схемы (2.47) запишется следующим образом:

$$\left(\frac{dP}{dt} \right)_0 = v_{cm} = kES_1S_2.$$

Уравнение материального баланса $E_0 = ES + ES_1S_2$.

Тогда

$$ES_1 = \frac{E \times S_{1,0}}{K_1}; \quad ES_1S_2 = \frac{E \times S_{1,0} \times S_{2,0}}{K_1K_2};$$

$$E_0 = E \left(1 + \frac{S_{1,0}}{K_1} + \frac{S_{1,0} \times S_{2,0}}{K_1K_2} \right).$$

Следовательно,

$$v_{cm} = \frac{kE_0 \frac{S_{1,0} \times S_{2,0}}{K_1K_2}}{1 + \frac{S_{1,0}}{K_1} + \frac{S_{1,0} \times S_{2,0}}{K_1K_2}};$$

$$v_{cm} = \frac{kE_0}{1 + \frac{S_{1,0}}{K_1} + \frac{S_{1,0} \times S_{2,0}}{K_1K_2}}, \quad (2.49)$$

где $S_{1,0}$, $S_{2,0}$ — начальные концентрации субстратов S_1 и S_2 ; E_0 — общая концентрация активных центров.

Необратимая стадия между реакциями взаимодействия с субстратами (пинг-понг механизм)

В этом случае соответствующие уравнения запишутся следующим образом:

$$\begin{aligned}\left(\frac{dP}{dt}\right)_{cm} &= v_0 = k_1 ES_1; \\ E_0 &= E + ES_1 + X + XS_2; \\ \frac{dx}{dt} &= k_1 ES_1 - k_2 ES_2 = 0.\end{aligned}$$

Из условия стационарности по X и XS_2 следует уравнение $k_1 ES_1 = k_2 XS_2$. Тогда

$$\begin{aligned}ES_1 &= \frac{E \times S_{1,0}}{K_1}; \quad XS_2 = \frac{X \times S_{2,0}}{K_2}; \\ E_0 &= E \left(1 + \frac{S_{1,0}}{K_1} + \frac{k_1}{k_2} \frac{S_{1,0}}{K_1} + \frac{k_1}{k_2} \frac{K_1}{K_2} \frac{S_{1,0}}{S_{2,0}} \right).\end{aligned}$$

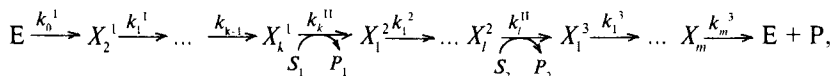
Соответственно

$$\begin{aligned}v_0 &= \frac{k_1 ES_{1,0}}{K_1}; \\ v_0 &= \frac{k_1 E_0}{1 + \frac{K_1}{S_{1,0}} + \frac{k_1}{k_2} \left(1 + \frac{K_2}{S_{2,0}} \right)}.\end{aligned}\tag{2.50}$$

Сравнение механизма образования тройного комплекса и пинг-понг механизма

Различие между механизмом двусубстратной реакции с образованием тройного комплекса и пинг-понг механизмом очевидно. В первом случае уравнение скорости содержит член — произведение переменных $1/(S_{1,0}S_{2,0})$. Во втором случае такого члена нет.

Рассмотрим кинетику двусубстратной ферментативной реакции в несколько более общем виде. Представим, что активный центр участвует в трансформации субстратов через ряд промежуточных стадий, а взаимодействие субстратов с тем или иным интермедиатом бимолекулярно:



В стационарном режиме при избытке субстратов $S_{10} \gg E_0$, $S_{20} \gg E_0$ скорости изменения концентраций промежуточных соединений близки к нулю:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dX_1^1}{dt} &= k_0^1 E - k_1^1 X_1^1 = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_k^1}{dt} &= k_{k-1}^1 X_{k-1}^1 - k_k^{II} S_{10} X_k^1 = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_k^2}{dt} &= k_{l-1}^2 X_{l-1}^2 - k_l^{II} S_{20} X_l^2 = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_m^3}{dt} &= k_{m-1}^3 X_{m-1}^3 - k_m^3 X_m^3 = 0 \end{aligned} \right. \quad (2.51)$$

$$E_0 = E + \sum_1^k X_k^1 + \sum_1^l X_k^2 + \sum_1^m X_m^3$$

Стационарная скорость реакции

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{cm} = k_0^1 E = k_m^3 X_m^3$$

122

$$v_0 = \frac{E_0}{\sum_0^{k-1} \frac{1}{k_i^1} + \sum_0^{l-1} \frac{1}{k_i^2} + \sum_0^m \frac{1}{k_i^3} + \frac{1}{k_k^{II} S_{10}} + \frac{1}{k_l^{II} S_{20}}} \quad (2.52)$$

или

$$\frac{E_0}{v_0} = \sum_0^{k-1} \frac{1}{k_i^1} + \sum_0^{l-1} \frac{1}{k_i^2} + \sum_0^m \frac{1}{k_i^3} + \frac{1}{k_k^{II} S_{10}} + \frac{1}{k_l^{II} S_{20}}. \quad (2.52')$$

Видно, что уравнение скорости включает в себя концентрационно независимые члены и члены, величины которых можно варьировать изменением концентрации субстратов. Сумма концентрационно независимых членов уравнения (2.52') отражает вклад в уравнение скорости наиболее медленной стадии трансформации интермедиатов на любом участке превращения:

$$\frac{1}{k_{эфф}} = \sum_0^{k-1} \frac{1}{k_i^1} + \sum_0^{l-1} \frac{1}{k_i^2} + \sum_0^m \frac{1}{k_i^3}.$$

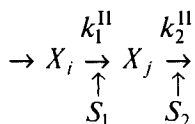
Действительно, если существует мономолекулярная стадия, для которой константа скорости k_{lim} существенно меньше, чем для всех остальных, то $k_{эфф} = k_{lim}$. Проводя экспериментальное изучение зависимости скорости реакции от концентрации субстратов, можно найти значения $k_{эфф}$, k_k^{II} и k_l^{II} .

Уравнение (2.52) является очень удобной формой представления результатов. Все концентрационно независимые члены могут быть объединены в одну эффективную константу $1/k_{эфф}$, уравнение скорости может быть записано в виде

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_k^{II} S_{10}} + \frac{1}{k_l^{II} S_{20}}.$$

Основные схемы многосубстратных реакций

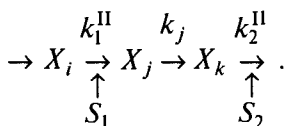
Предположим, что обсуждаемая схема, включает две бимолекулярные стадии взаимодействия субстратов с активным центром фермента. Ее можно представить в виде



и обозначить как *bb-механизм*. Для *bb-механизма* имеем

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_1^{\text{II}} S_{10}} + \frac{1}{k_2^{\text{II}} S_{20}} . \quad (2.53)$$

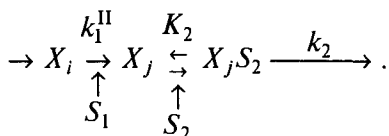
Представим, что стадии ввода субстратов разделены мономолекулярной стадией (*механизм bmb*)



Для этого случая имеем

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_j} + \frac{1}{k_1^{\text{II}} S_{10}} + \frac{1}{k_2^{\text{II}} S_{20}} .$$

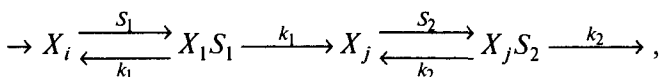
Представим, что на некоторых стадиях ввода субстратов в каталитический цикл реакции обратимы (*eq-стадии*) и протекают практически в равновесном режиме. Равновесный режим означает, что комплексообразование субстрата с активным центром имеет место существенно быстрее, чем его последующая трансформация. Например, в *eqm-механизм*:



После ввода в каталитический цикл первого субстрата присоединение второго протекает быстро и равновесно. Уравнение скорости имеет вид

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_1^{\text{II}} S_{10}} + \frac{1}{k_2^{\text{II}} S_{20}} . \quad (2.54)$$

Если стадии присоединения субстратов разделены какой-либо необратимой стадией (*механизм eq и eqm*)



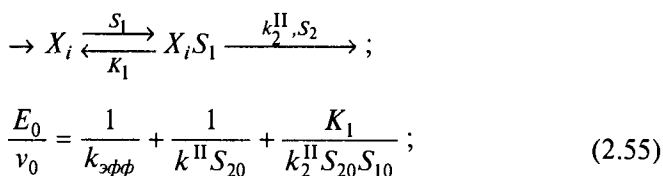
то имеем

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} + \frac{K_1}{k_1 S_{10}} + \frac{K_2}{k_2 S_{20}} . \quad (2.54')$$

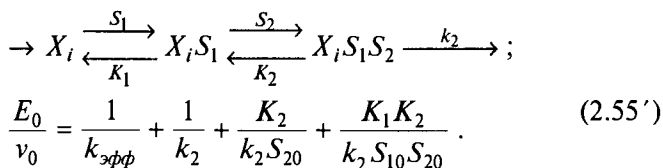
Во всех известных механизмах в уравнении скорости субстраты не мультиплицируют.

Однако есть по крайней мере два механизма с совершенно отличным поведением уравнений скорости:

1) *eqb*-механизм:



2) *eqeqt*-механизм (механизм тройного комплекса)



Заключение

Итак, для двусубстратных реакций существуют по крайней мере две группы зависимостей скорости реакций от концентраций субстратов.

Группа 1

$$v_{cm} = \frac{E_0}{a + \frac{b}{S_{20}} + \frac{c}{S_{10}}} , \quad (2.55'')$$

где a, b, c — комбинации констант скоростей элементарных стадий.

Этим уравнением описывается зависимость скорости от концентрации субстратов для механизмов *bb, bmb, beqt, eqtb, eqteqt, bteqt*. Механизмы реакций, описываемые этим уравнением, носят название «пинг-понг-механизмов».

Группа 2

Уравнение скорости для механизмов *eqb* и *eqeqt* можно представить в виде

$$v_{cm} = \frac{E_0}{a + \frac{b}{S_{20}} + \frac{c}{S_{10} S_{20}}} ,$$

где a, b, c — соответствующая комбинация констант (механизм образования тройного комплекса).

Дискриминация механизмов многосубстратных реакций

Из эксперимента можно определить, в какую группу входит та или иная изучаемая реакция. Для дискриминации механизмов необходимо исследовать зависимости скорости от концентрации одного субстрата при постоянной концентрации другого субстрата, варьируя от серии к серии экспериментов концентрацию последнего.

При анализе экспериментальных данных удобно использовать один из двух подходов.

1. В двойных обратных координатах для механизмов группы пинг-понг зависимости скорости от концентрации будут представлены серией параллельных прямых (рис. 2.16). Для механизмов типа eqb и eqeqm, уравнения скорости которых включают произведение переменных $S_{10} \cdot S_{20}$ в обратных координатах, экспериментальные данные должны линейаризоваться, приводя к серии пересекающихся прямых (рис. 2.17).

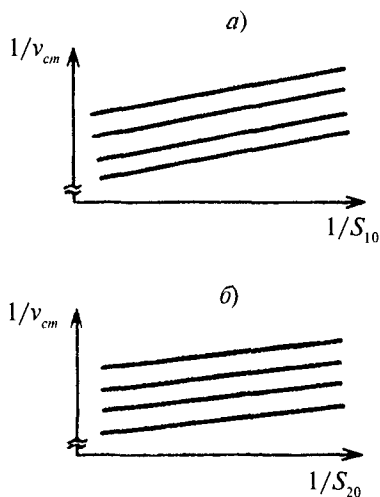


Рис. 2.16. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентраций субстратов в двойных обратных координатах для пинг-понг механизмов.

a — для первого субстрата; *б* — для второго.

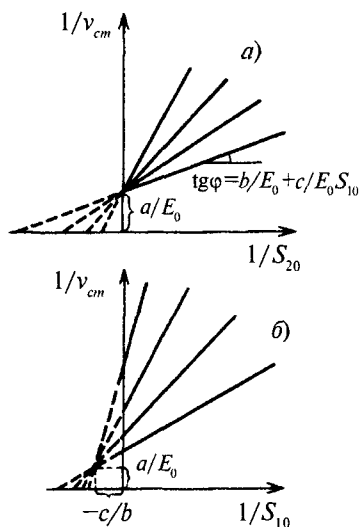


Рис. 2.17. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентраций субстратов для механизмов образования тройного комплекса.

a — для первого субстрата; *б* — для второго.

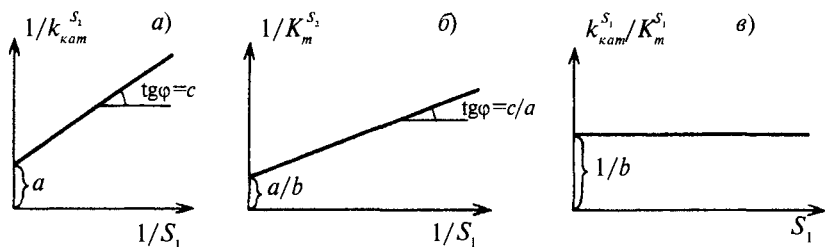


Рис. 2.18. Зависимость кинетических параметров, найденных при вариации S_2 для группы пинг-понг механизмов в различных координатах.

2. В ряде случаев экспериментально удобно исследовать зависимости кинетических параметров $k_{кат}^{S_1}$, $K_m^{S_1}$, определенные по субстрату S_1 , или $k_{кат}^{S_2}$, $K_m^{S_2}$, найденные при вариации концентрации субстрата S_2 . Механизмы группы 1 и 2 различаются по зависимости $k_{кат}^{S_1}(S_2)$, $K_m^{S_1}(S_2)$ и соответственно $k_{кат}^{S_2}(S_1)$, $K_m^{S_2}(S_1)$.

Для группы пинг-понг-механизмов из уравнения (2.55'') следует:

$$k_{кат}^{S_2} = \frac{1}{a + \frac{c}{S_{10}}}; \quad k_{кат}^{S_1} = \frac{1}{a + \frac{b}{S_{20}}};$$

$$K_m^{S_2} = \frac{b}{a + \frac{c}{S_{10}}}; \quad K_m^{S_1} = \frac{c}{a + \frac{b}{S_{20}}}.$$

Величины каталитической константы и константы Михаэлиса как функции концентрации второго субстрата линейризуются в обратных координатах, при этом значение $k_{кат}/K_m$ не зависит от концентрации второго субстрата (рис. 2.18).

Для механизмов *eqb* и *eqeqt* вид этих функций совершенно иной (рис. 2.19):

$$k_{кат}^{S_2} = 1/a;$$

$$K_m^{S_2} = \frac{1}{a} \left(b + \frac{c}{S_{10}} \right).$$

При исследовании зависимости по второму субстрату имеем (рис. 2.20)

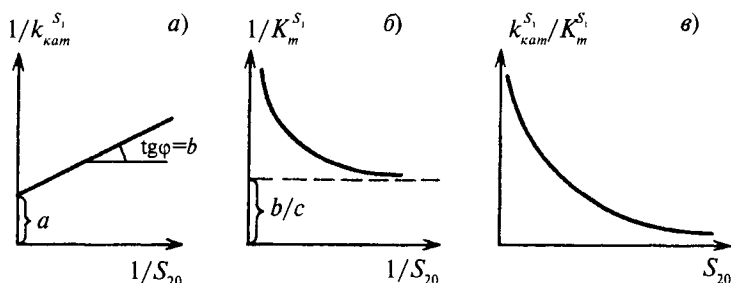


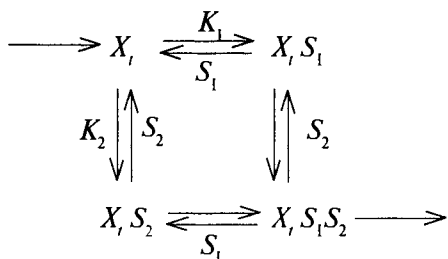
Рис. 2.19. Зависимость кинетических параметров, найденных при вариации S_2 для механизмов образования тройного комплекса в различных координатах.

$$k_m^{S_1} = \frac{1}{a + \frac{b}{S_{20}}}, \quad K_m^{S_1} = \frac{c}{b + aS_{20}}.$$

Сопоставление экспериментальных данных с теоретическими, представленными на рис. 2.16–2.20, позволяет определить, к какой группе механизмов относится исследуемая реакция.

Таким образом, если экспериментальные данные зависимости скорости от концентрации одного из субстратов при фиксированной концентрации второго субстрата приводят в обратных координатах к серии параллельных прямых, можно утверждать, что механизм катализа данным ферментом не включает последовательности стадий *eqb* и *eqeqm*.

Экспериментально механизмы *eqb* и *eqeqm* приводят к серии пересекающихся прямых. Механизм, включающий образование тройного комплекса, носит название упорядоченного механизма, поскольку согласно этой схеме присоединение второго субстрата возможно лишь к комплексу с первым. В кинетике действия ферментов может иметь место и неупорядоченный механизм



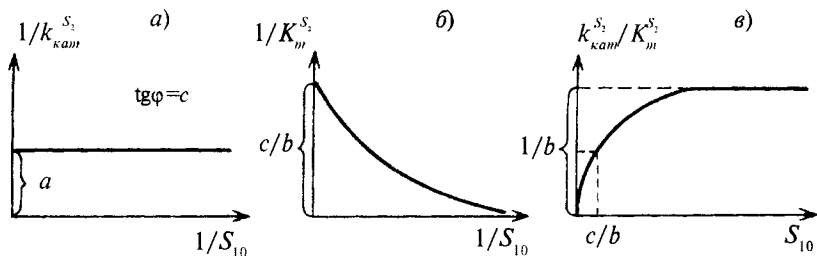


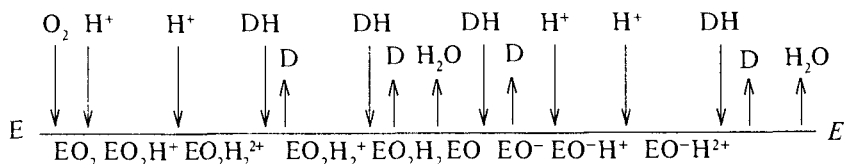
Рис. 2.20. Зависимость кинетических параметров, найденная при вариации S_1 для механизмов образования тройного комплекса в различных координатах.

Кинетически неупорядоченный механизм также приводит к появлению члена $K_1 K_2 / S_1 S_2$, что экспериментально проявляется в серии пересекающихся прямых.

Для механизмов группы пинг-понг тангенсы угла наклона зависимостей $1/v_{ct}$ от $1/S_{10}$ или $1/S_{20}$ дают константы скорости k_1^{II} , k_2^{II} (если эти стадии бимолекулярны) или k_1/K_1 и k_2/K_2 (если реакция протекает через предварительное комплексообразование). По физическому смыслу константы k_1^{II} и k_1/K_1 , k_2^{II} и k_2/K_2 совершенно аналогичны и отражают бимолекулярный переход субстрата из раствора в переходное состояние, минуя стадию образования комплекса. Поэтому определяемую из тангенса угла наклона константу можно использовать как характеристику элементарного процесса, характеризующую реакционную способность того или иного субстрата.

В уравнение скорости для всех механизмов входит концентрационно независимый член, представляющий собой сумму обратных констант всех мономолекулярных стадий процесса. Экспериментально эта сумма определяется из предельной максимальной скорости, найденной при «насыщающих» концентрациях всех субстратов. Очевидно, что эта сумма отражает наиболее медленный мономолекулярный процесс, протекающий в активном центре катализатора.

Пример 2.5. Определить, протекает ли реакция с образованием тройного комплекса фермент–кислород–донор или механизм реакции относится к группе пинг-понг-механизмов для реакции окисления молекулярным кислородом органических субстратов, катализируемая голубой медьсодержащей оксидазой (лакказой). Реакция является двусубстратной, процесс многостадийным:



С целью ответа на этот вопрос исследовали зависимости $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}$, $K_m^{\text{O}_2}$ от концентрации донора электронов. Значения $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}$, $K_m^{\text{O}_2}$ находили путем вариации концентрации кислорода при фиксированной концентрации донора электронов. На рис. 2.21 приведены зависимости величин $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}$, $K_m^{\text{O}_2}$ и $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}/K_m^{\text{O}_2}$ от концентрации доноров для ферроцианида, гидрохинона, гваякола и пирокатехина.

Как следует из рис. 2.21, зависимости $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}$ и $K_m^{\text{O}_2}$ от концентрации

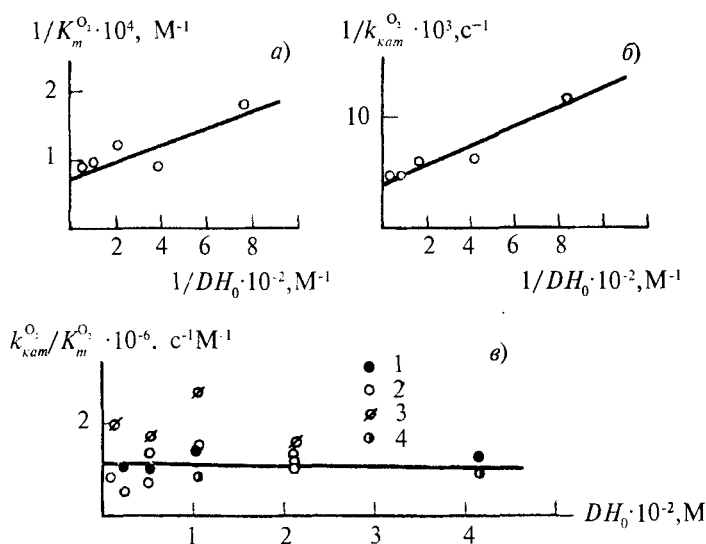


Рис. 2.21. Зависимости константы Михаэлиса по кислороду $K_m^{\text{O}_2}$ от концентрации донора электронов DH_0 (ферроцианид) в двойных обратных координатах (а), каталитической константы по кислороду $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}$ от концентрации донора электронов (б), отношения $k_{\text{кат}}^{\text{O}_2}/K_m^{\text{O}_2}$ от концентрации доноров электронов (в):

1 — ферроцианид; 2 — гидрохинон; 3 — пирокатехин; 4 — гваякол.

донора имеют гиперболический вид, при высоких концентрациях кривые выходят на максимальные значения. Уравнение скорости реакции окисления различных доноров строго описывается уравнением, характерным для группы пинг-понг-механизмов. Значения $k_{кат}^{O_2}$ и $K_m^{O_2}$ спрямляются в обратных координатах, при этом значения $k_{кат}^{O_2}$ для всех исследуемых доноров практически не зависят от природы донора и составляют 180 с^{-1} . Значение $k_{кат}^{O_2} / K_m^{O_2}$ в исследованном диапазоне концентраций постоянно, оно практически не зависит от концентрации и природы доноров (сравни экспериментальные данные с теоретическими).

Для широкого круга доноров электрона были изучены зависимости начальной стационарной скорости окисления в аэрированных растворах субстратов. В этих условиях концентрация кислорода постоянна и равна $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Реакцию исследовали как спектрофотометрически, по образованию окрашенных продуктов реакции, так и полярографически с использованием электрода Кларка по начальной скорости поглощения кислорода. Для всех исследованных случаев зависимость скорости от концентрации донора описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Найденные параметры $k_{кат}^{DH}$ и K_m^{DH} приведены в табл. 2.5. В области pH 3÷5 кинетика реакции не зависит от концентрации ионов водорода. Ионогенные группы активного центра «насыщены» протонами, по-

Таблица 2.5

Кинетические параметры лакказы, определяемые для разных доноров

Донор электрона	$k_{кат}^{O_2} \cdot 10^{-2}, \text{ с}^{-1}$ $DH \rightarrow \infty$	$K_m^{O_2} \cdot 10^4, \text{ М}$ $DH \rightarrow \infty$	$k_{кат}^{DH} \cdot 10^{-2}, \text{ с}^{-1}$	$K_m^{DH} \cdot 10^4, \text{ М}$
Ферро- цианид-ион	2,90	1,64	2,5	4,0
Гидрохинон	2,5	1,5	1,7	4,5
Пирокатехин	2,6	1,53	1,3	9
Гваякол	1,14	1,23	1,6	8

Примечание. Константа Михаэлиса K_m^{DH} и каталитическая константа $k_{кат}^{DH}$ по донору электронов определены в аэробных условиях; максимальные значения константы Михаэлиса $K_m^{O_2}$ и каталитическая константа $k_{кат}^{O_2}$ по кислороду при «насыщающих» концентрациях донора электронов.

этому в этой области принципиально важно рассмотрение взаимного влияния на кинетику процесса кислорода и донора электронов.

В соответствии с приведенными выше схемами наиболее общее уравнение скорости реакции, основанное на пинг-понг-механизме, включающее предварительное комплексообразование кислорода и четырех молекул донора, может быть записано в виде

$$v_{cm} = \frac{E_0}{\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_{O_2}} + \frac{K_{O_2}}{k_{O_2} O_2} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i} + \frac{1}{DH} \sum_{i=1}^4 \frac{K_D^i}{k_D^i}}, \quad (2.56)$$

где $1/k_{эфф}$ — сумма обратных значений констант скоростей всех мономолекулярных процессов в активном центре, не связанных непосредственно со стадиями комплексообразования и превращения фермент-субстратных комплексов; k_{O_2} — константа скорости; K_{O_2} — константа диссоциации фермент-кислородного комплекса; k_D^i — константа скорости; K_D^i — константа диссоциации комплекса активного центра с донором электрона.

Важно подчеркнуть, что уравнение (2.56) характерно для большой группы пинг-понг механизмов, которые могут отличаться друг от друга последовательностью стадий. Независимо от перестановок в последовательности стадий присоединения кислорода и донора электронов уравнение стационарной скорости будет иметь один и тот же вид, данный функцией (2.56). Из этого уравнения следует, что зависимости скорости реакций от концентрации кислорода и донора электронов задаются уравнением типа Михаэлиса-Ментен, параметры которого будут функциями донора электронов, если исследуется зависимость скорости от концентрации кислорода, и соответственно функцией концентрации кислорода, если исследуется зависимость скорости от концентрации донора электронов:

$$k_{кат}^{O_2} = \frac{1}{\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{K_{O_2}} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i} + \frac{1}{DH} \sum_{i=1}^4 \frac{K_D^i}{k_D^i}};$$

$$K_m^{O_2} = \frac{K_{O_2}}{k_{O_2} \left(\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{K_{O_2}} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i} + \frac{1}{DH} \sum_{i=1}^4 \frac{K_D^i}{k_D^i} \right)};$$

$$\frac{k_{кат}^{O_2}}{K_m^{O_2}} = \frac{k_{O_2}}{K_{O_2}}, \quad (2.57)$$

где $k_{кат}^{O_2}$ — каталитическая константа скорости, определяемая из макси-

мальной скорости при насыщении активного центра кислородом; $K_m^{O_2}$ — константа Михаэлиса для зависимости скорости от концентрации кислорода.

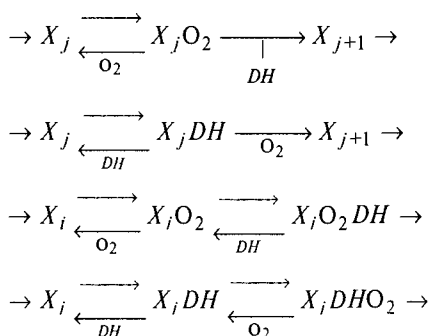
Таким образом, из зависимости скорости реакции от концентрации донора электронов получим

$$\begin{aligned}
 k_{кат}^{DH} &= \frac{1}{\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_{O_2}} + \frac{K_{O_2}}{k_{O_2} O_2} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i}}; \\
 K_m^{DH} &= \frac{\sum_{i=1}^4 \frac{K_D^i}{k_D^i}}{\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_{O_2}} + \frac{K_{O_2}}{k_{O_2} O_2} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i}}; \\
 \frac{k_{кат}^{DH}}{K_m^{DH}} &= \frac{1}{\sum_{i=1}^4 \frac{K_D^i}{k_D^i}},
 \end{aligned} \tag{2.58}$$

где $k_{кат}^{DH}$ — каталитическая константа, найденная из максимальной скорости реакции при насыщении донором электрона; K_m^{DH} — эффективное значение константы Михаэлиса для зависимости скорости реакции от концентрации донора.

Сопоставление экспериментальных данных с теоретическим уравнением (2.56) позволяет сделать следующие выводы.

1. Кинетические закономерности имеют пинг-понг-характер, поэтому можно утверждать, что в механизме реакции отсутствуют следующие последовательности стадий вида



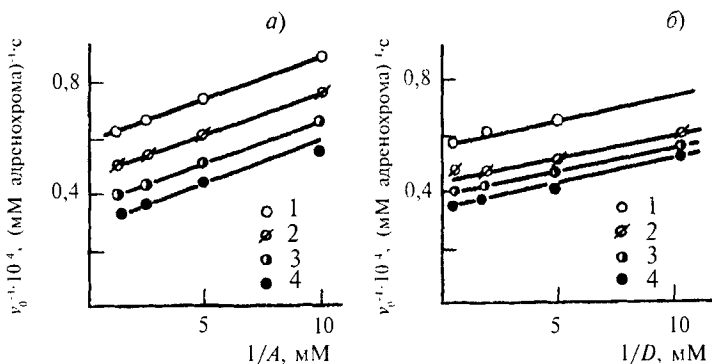


Рис. 2.22. Зависимость начальной стационарной скорости катализа эндопероксидпростагландинсинтетазой от концентрации арахидоновой кислоты при фиксированной концентрации донора (а) (1 — 0,1, 2 — 0,2, 3 — 0,5, 4 — 2,0 мМ) и от концентрации донора при фиксированной концентрации арахидоновой кислоты (б) (1 — 0,1, 2 — 0,2, 3 — 0,3, 4 — 0,5 мМ).

Этот вывод весьма важен для выяснения стадийного механизма действия фермента.

2. Представленные данные позволяют получить характеристики отдельных элементарных стадий. Из рис. 2.21 видно, что, как это следует из уравнения (2.57), величина $k_{кат}^{O_2}/K_m^{O_2}$ не зависит от природы донора, его концентрации и характеризует бимолекулярный процесс взаимодействия молекулярного кислорода с активным центром фермента. Как видно, величины $\frac{k_{кат}^{O_2}}{DH \rightarrow \infty}$ имеют одно и то же значение для всех исследованных субстратов. Из уравнения (2.58) следует, что

$$\frac{k_{кат}^{O_2}}{DH \rightarrow \infty} = \frac{1}{\frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_{O_2}} + \sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i}},$$

Независимость величины $\frac{k_{кат}^{O_2}}{DH \rightarrow \infty}$ от природы донора, характеризуемой

константой k_D^i , говорит о том, что $\sum_{i=1}^4 \frac{1}{k_D^i} \ll \frac{1}{k_{эфф}} + \frac{1}{k_{O_2}}$, т.е. стадия

допирования электрона из фермент-субстратного комплекса, если таковая имеется, протекает существенно быстрее, чем какой-либо другой мономолекулярный процесс. Возможно, что в механизме реакции эта стадия вооб-

ще отсутствует и донирование имеет бимолекулярный характер. Тангенс угла наклона зависимостей $1/k_{\text{кат}}$ и $1/K_m^{\text{O}_2}$ от обратной концентрации донора электронов связан с величинами бимолекулярных констант донирования электронов в активный центр ферментов. Указанную сумму констант скоростей определяет наиболее медленная стадия.

Пример 2.6. Определить механизм реакции, катализируемой эндопероксидпростогландинсинтетазой (циклооксигеназа).

Эндопероксидпростогландинсинтаза — один из немногих представителей четырехсубстратных ферментов. При окислении арахидоновой кислоты с образованием циклоперкисного производного PGH_2 необходимо участие арахидоновой кислоты, трех молекул кислорода и четвертого субстрата — донора электронов. Экспериментально была изучена зависимость скорости реакции от концентрации арахидоновой кислоты при различных фиксированных концентрациях донора электронов — адреналина. Также исследовалась зависимость скорости от концентрации адреналина при различных фиксированных концентрациях арахидоновой кислоты. Наблюдаемые концентрационные зависимости доказывают, что механизм реакции имеет пинг-понг-характер.

На рис. 2.22 приведены экспериментальные данные в обратных координатах. Зависимости максимальных скоростей и констант Михаэлиса, определенных при вариации концентраций донора электронов V_m^D и K_m^D , арахидоновой кислоты V_m^A и K_m^A , линеаризуются в обратных координатах (рис. 2.23). При этом отношения V_m^A/K_m^A , V_m^D/K_m^D не зависят от концентрации второго переменного компонента.

Уравнение стационарной скорости реакции при условии, что взаимодействие субстратов относится к группе пинг-понг-механизмов, будет иметь вид

$$v = \frac{E_0}{\frac{1}{k_{\text{эфф}}} + \frac{1}{k_{\text{O}_2(1)}} + \frac{K_{\text{O}_2(1)}}{k_{\text{O}_2} \text{O}_2} + \frac{1}{k_{\text{O}_2(2)}} + \frac{K_{\text{O}_2(2)}}{k_{\text{O}_2} \text{O}_2} + \frac{1}{k_A} + \frac{K_A}{k_{AA}} + \frac{1}{k_D} + \frac{K_D}{k_{DD}}} \quad (5.59)$$

где $1/k_{\text{эфф}}$ — сумма обратных констант скоростей мономолекулярных стадий, не связанных со стадиями взаимодействия с субстратами;

$k_{\text{O}_2(1)}$, $k_{\text{O}_2(2)}$, $K_{\text{O}_2(1)}$ и $K_{\text{O}_2(2)}$ — константы скорости и диссоциации комплексов с кислородом; k_A и K_A — константы скорости и диссоциации комплекса с арахидоновой кислотой; k_D и K_D — константы скорости и диссоциации комплекса с донором электронов.

Реакцию окисгенирования арахидоновой кислоты проводят в аэрированных растворах. Исследование зависимости скорости реакции от концентрации кислорода показало, что в области концентраций $5,0 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ М скорость реакции практически не зависит от concentra-

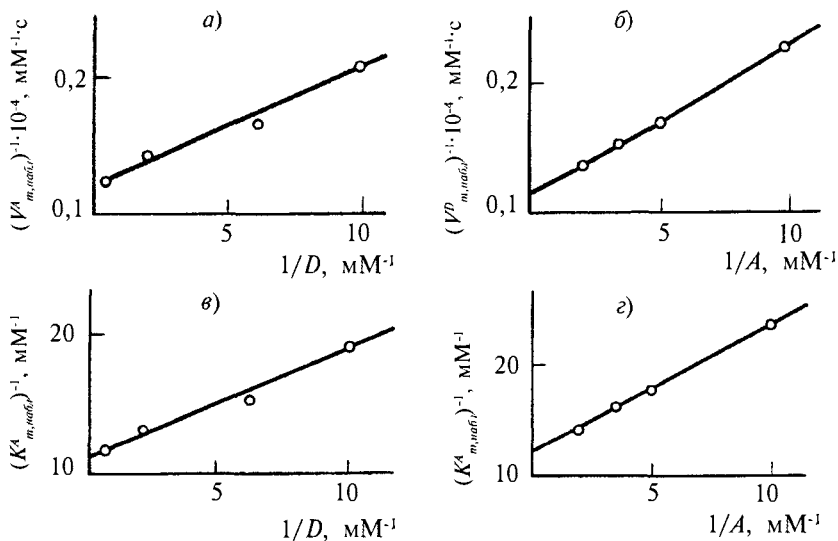


Рис. 2.23. Зависимости наблюдаемых констант эндопероксидпростагландинсинтетазной реакции от концентрации второго субстрата, значение которого фиксировано в экспериментах, представленных на рис. 2.22.

ции кислорода. Это позволяет утверждать, что зависящие от концентрации кислорода члены $K_{O_2(1)}/(k_{O_2(1)}O_2)$ и $K_{O_2(2)}/(k_{O_2(2)}O_2)$ в условиях проведения эксперимента существенно меньше по величине по сравнению с остальными членами, составляющими знаменатель уравнения (5.59). В силу этого для экспериментов в аэрированных растворах можно рассматривать лишь взаимное концентрационное влияние донора электронов и арахидоновой кислоты.

На основе уравнения (5.59) можно сделать некоторые количественные оценки и определить константы скорости циклооксигеназной реакции. В условиях «насыщения» системы кислородом уравнение скорости (5.59) приобретает вид

$$v = \frac{E_0}{\frac{1}{k_{\text{эфф}}} + \frac{1}{k_{O_2(1)}} + \frac{1}{k_{O_2(2)}} + \frac{1}{k_A} + \frac{K_A}{k_A A} + \frac{1}{k_D} + \frac{K_D}{k_D D}}, \quad (5.60)$$

При «насыщающих» концентрациях арахидоновой кислоты и донора электронов система выходит на режим максимальной скорости

$$\lim_{\substack{DH \rightarrow \infty \\ A \rightarrow \infty}} V_m = \frac{E_0}{\frac{1}{k_{\text{эфф}}} + \frac{1}{k_{O_2(1)}} + \frac{1}{k_{O_2(2)}} + \frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_D}},$$

Представляет интерес вариация природы донора электрона и оценка вклада величины $1/k_D$ в наблюдаемую предельную максимальную скорость реакции. В табл. 2.6 приведены значения максимальных скоростей, найденных при постоянной концентрации фермента для ряда субстратов — доноров электрона. Видно, что величины V_m для широкого круга субстратов,

$$\begin{matrix} DH \rightarrow \infty \\ A \rightarrow \infty \end{matrix}$$

сильно различающихся по гидрофобности и редокс-потенциалу, близки, практически одинаковы. Следовательно, значение $1/k_D$ существенно меньше суммы членов в знаменателе уравнения (5.60), соответственно предельная константа отражает скорость другого, более медленного процесса.

Это может быть реакция превращения комплекса с кислородом либо комплекса с арахидоновой кислотой или какой-то другой мономолекулярный процесс, например внутрибелковый перенос электрона или конформационное изменение белка.

Из уравнения (5.60) следует:

$$\frac{V_m^A}{K_m^A E_0} = \frac{k_A}{K_A};$$

$$\frac{V_m^D}{K_m^D E_0} = \frac{k_D}{K_D}.$$

Если принять, что концентрация фермента в системе соответствует концентрации гемина, то величина константы скорости бимолекулярного взаимодействия арахидоновой кислоты с активным центром фермента равна $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

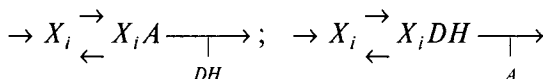
Важно отметить, что в случае эндопероксидпростогландинсинтетазы, так же как и в случае лакказы, наблюдается весьма слабая зависимость константы скорости донирования электронов от свойств донора, прежде всего от его окислительно-восстановительного потенциала. Так же как и в случае лакказы, исследование стационарной кинетики позволяет утверждать, что в механизме реакции отсутствуют комбинации стадий, приводя-

Таблица 2.6

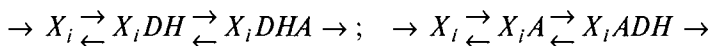
Кинетические характеристики эндопероксидазной реакции

Донор электронов	$V_m, \text{ mM} \cdot \text{с}^{-1}$	$\frac{V_m}{K_m} \cdot 10^{-2}, \text{ с}^{-1}$	$K_m, \text{ M}$
НАДН	0,36	0,36	$1 \cdot 10^{-4}$
Адреналин	0,72	0,72	$1 \cdot 10^{-4}$
Триптофан	0,72	0,021	$3,4 \cdot 10^{-3}$
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,72	0,3	$2,4 \cdot 10^{-4}$

щие к появлению в уравнении членов, содержащих произведение переменных — концентраций арахидоновой кислоты и адреналина:



eqb-механизм



eqeqt-механизм

т.е. не образуется тройной комплекс фермент-арахидоновая кислота-донор электронов и нет бимолекулярных реакций комплексов со вторым субстратом. Это наблюдение весьма важно для построения молекулярной модели катализа эндопероксидпростогландинсинтазой.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие основные механизмы многосубстратных реакций вы знаете? Как дискриминировать эти механизмы? 2. Напишите основные уравнения, соответствующие пинг-понг-механизму. Приведите примеры. 3. Напишите основные уравнения, соответствующие механизму образования тройного комплекса. Приведите примеры. 4. В чем принципиальное отличие механизмов образования тройного комплекса и пинг-понг-механизма?

2.4. Нестационарная кинетика ферментативных реакций. Лабильные промежуточные соединения в механизме катализа. Методы «быстрой» кинетики

Игра была не просто упражнением и не просто отдыхом, она олицетворяла гордую дисциплину ума, особенно математики играли в нее с аскетической и в то же время спортивной виртуозностью и педантичной строгостью, находя в ней наслаждение, облегчавшее им отход от прежних удовольствий и наслаждений.

Г. Гессе

Один из наиболее плодотворных подходов к исследованию механизмов последовательных реакций основан на изучении нестационарных процессов. Как правило, нестационарная кинетика позволяет достаточно детально проанализировать стадийность процесса. Прежде чем выйти в стационарный режим, реакция протекает в переходной фазе. Переходная фаза реакции, предше-

ствующая стационарной, получила название предстационарной. С возможностями предстационарного подхода для дискриминации механизмов реакции мы уже познакомились выше при обсуждении кинетических схем Михаэлиса и Анри.

Рассмотрим кинетику и методологию такого рода исследования на примере изучения лабильных промежуточных соединений в механизме действия сериновых протеаз.

Ацилферменты в механизме катализа сериновыми протеазами

Использование метода предстационарной кинетики позволило исследовать механизм действия протеолитических ферментов. При

изучении гидролиза эфирных субстратов $R - \overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}} - OR'$ под действием α -химотрипсина был обнаружен ряд интересных кинетических особенностей протекания реакции.

1. Найдено, что для некоторых субстратов, различающихся природой группы R' и соответственно электронными свойствами реакционного атома углерода, экспериментально определяемые каталитические константы практически инвариантны, несмотря на то что реакционные способности соединений в модельной реакции, например в реакции щелочного гидролиза, различаются очень сильно. Это является кинетическим свидетельством в пользу существования в механизме реакции стадии, общей для всех использованных соединений.

2. Хартли и Килби, исследуя кинетику гидролиза *n*-нитрофенилового эфира уксусной кислоты, обнаружили, что реакция протекает в две стадии. Вначале наблюдается быстрый «выброс» *n*-нитрофенола в приблизительно стехиометрической концентрации по отношению к добавленному ферменту, затем следует стационарная, более медленная реакция дальнейшего гидролиза субстрата (рис. 2.24).

3. Болз и Вуд, исследуя эту же реакцию при низких значениях рН (рН~4), нашли, что *n*-нитрофенилацетат ацетирует активный центр фермента. Ацетилхимотрипсин можно выделить из реакционной смеси при низких значениях рН в виде индивидуального соединения.

Эти наблюдения позволили предположить, что в механизме катализа α -химотрипсином происходит последовательное «расщепление» сложноэфирной связи с переносом ацильной группы на активный центр фермента, «выбросом» спиртового продукта и образованием ацилферментного промежуточного соединения.

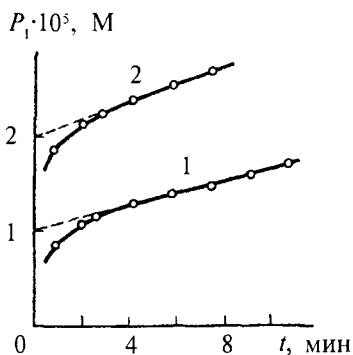
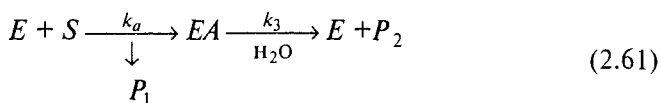


Рис. 2.24. Кинетика образования *p*-нитрофенола в реакции гидролиза *p*-нитрофенилацетата под действием α -химотрипсина.

Концентрация фермента, соответствующая кривой 1, в 2 раза меньше, чем на кривой 2 [Hartley, Kilby, 1952].

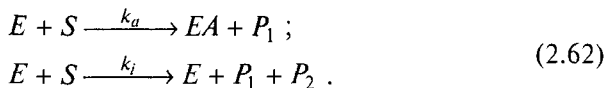
Доказательства ацилферментной природы катализа были получены при исследовании реакций, катализируемых протеолитическими ферментами, методом «остановленной струи» в предстационарном режиме. Детально была исследована кинетика гидролиза *p*-нитрофенилацетата под действием α -химотрипсина [Gutfreund, Sturtevant, 1956; Spencer, Sturtevant, 1959]. В первую очередь возникает вопрос: является ли ацилхимотрипсин, выделенный Болзом и Вудом, истинным промежуточным соединением в механизме катализа α -химотрипсином? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо рассмотреть и сопоставить две кинетические схемы.

Простейшая кинетическая схема, включающая образование промежуточного ацилфермента *EA*, имеет вид



Первая стадия реакции представляет собой ацилирование с «выбросом» в раствор спиртовой (фенольной) компоненты субстрата и переносом ацильной группы в активный центр фермента.

Альтернативный механизм может быть представлен схемой



Первая стадия реакции представляет собой ацилирование активного центра, приводящее к образованию стабильного и нереклаиноспособного ацилфермента, при этом ацильная группа «блокирует» активный центр. Ферментативная реакция протекает при взаимодействии фермента с субстратом (вторая стадия).

Для механизма (2.61) ацилфермент является промежуточным соединением в механизме катализа, в случае схемы (2.62) происходит специфическое ингибирующее ацилирование активно-

го центра. Анализ показывает, что эти кинетические схемы могут быть дискриминированы и сопоставлены с экспериментальными данными. Для этих целей получим теоретическое кинетическое уравнение для обеих кинетических схем и проведем их сравнение.

Промежуточный ацилфермент. Кинетику реакции в ацилферментном каталитическом механизме (2.61) описывает система уравнений ($S_0 \gg E_0$)

$$\begin{cases} \frac{dP_1}{dt} = k_a E \times S_0 \\ \frac{dEA}{dt} = k_a E \times S_0 - k_3 EA \\ E_0 = E + EA \end{cases} \quad (2.63)$$

Из уравнений (2.63) следует:

$$EA = \frac{k_a E_0 S_0}{k_{набл}} (1 - e^{-k_{набл} t}) + C e^{-k_{набл} t}.$$

При различных начальных условиях зависимость концентрации ацилфермента от времени дана различными функциями. Если в начальный момент времени все активные центры фермента находятся в свободном состоянии, $t = 0$, $EA = 0$, концентрация ацилфермента будет задана функцией

$$EA = \frac{k_a E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3} [1 - e^{-(k_a S_0 + k_3)t}]. \quad (2.64)$$

Однако если в начальный момент все активные центры проацилированы $t = 0$, $EA = E_0$, то зависимость EA от времени имеет вид

$$EA = \frac{E_0}{k_a S_0 + k_3} [k_a S_0 + k_3 e^{-(k_a S_0 + k_3)t}]. \quad (2.65)$$

На рис. 2.25а приведены зависимости EA от времени при двух различных начальных условиях.

Соответственно концентрации первого продукта реакции, вычисленные при подстановке уравнений (2.64) и (2.65) в (2.63) с учетом уравнения материального баланса, приводят к зависимостям: начальные условия $t = 0$, $EA = 0$

$$P_1(t) = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3} t + \frac{k_a^2 E_0 S_0^2}{(k_a S_0 + k_3)^2} [1 - e^{-(k_a S_0 + k_3)t}]. \quad (2.66)$$

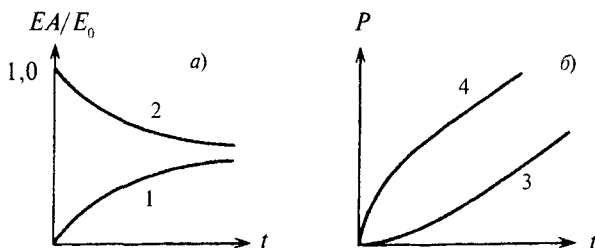


Рис. 2.25. Зависимости от времени концентрации ацилфермента (а) и продукта (б) для реакций, протекающих при различных начальных условиях. 1, 3 — $t = 0$, $EA = 0$; 2, 4 — $t = 0$, $EA = E_0$.

Начальные условия $t = 0$, $EA = E_0$:

$$P_1(t) = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3} t + \frac{k_a^2 E_0 S_0^2}{(k_a S_0 + k_3)^2} \left[e^{-(k_a S_0 + k_3)t} - 1 \right]. \quad (2.67)$$

На рис. 2.25б приведены функции (2.66) и (2.67), соответствующие различным начальным условиям реакции. В первом случае на кинетической кривой должен наблюдаться быстрый «выброс» первого продукта реакции, во втором — период индукции.

Естественно, что стационарные скорости реакции не зависят от начальных условий и для обоих начальных условий имеют вид

$$v_{cm} = \frac{k_a k_3 E_0 S_0}{k_a S_0 + k_3}$$

Ацилирование активного центра. Для схемы (2.62) кинетику реакции описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dP_1}{dt} = (k_a + k_i)E \times S_0 \\ \frac{dEA}{dt} = k_a E \times S_0 \\ E_0 = E + EA \end{cases} \quad (2.68)$$

Решение этой системы при использовании начальных условий $t = 0$, $EA = 0$ приводит к зависимостям

$$EA = E_0(1 - e^{-k_a S_0 t}), \quad (2.69)$$

$$P_1(t) = E_0 \left(1 + \frac{k_t}{k_a} \right) \left(1 - e^{-k_a S_0 t} \right). \quad (2.70)$$

При начальных условиях $t = 0$, $EA = E_0$ весь фермент блокирован и реакция вообще не должна протекать. На рис. 2.26 представлены зависимости $P_1(t)$ для кинетической схемы (2.62).

Таким образом, кинетические схемы (2.61) и (2.62) могут быть дискриминированы по зависимости от времени концентрации продукта (сравним уравнения (2.66), (2.67) и (2.70) и рис. 2.25 и 2.26).

Что же показывает эксперимент? На рис. 2.27 приведены данные работы Спенсера и Стэртеванта [Spencer, Sturtevant, 1959], которые однозначно свидетельствуют в пользу кинетической схемы (2.61), где ацилфермент выступает в качестве промежуточного соединения в механизме реакции.

Кривая 1 соответствует начальному условию $t = 0$, $EA = 0$ (в реакционную ячейку вводят свободный фермент). Кривая 2 наблюдается при условии $t = 0$, $EA = E_0$ (в реакционную среду с pH 8,2 вносили ацилфермент, полученный по Болзу и Вуда при низких значениях pH).

Таким образом, образование ацилфермента в качестве интермедиата в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата кинетически доказано. В дальнейшем ацилферментный механизм был показан для реакции гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров с участием растительных ферментов папаина, фи-

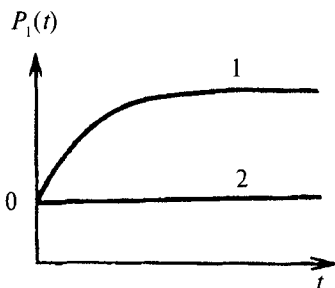


Рис. 2.26. Кинетические кривые образования продукта для реакции, протекающей по схеме (2.62) с необратимым ацилированием активного центра.

Начальные условия: 1 — $t = 0$, $EA = 0$; 2 — $t = 0$, $EA = E_0$.

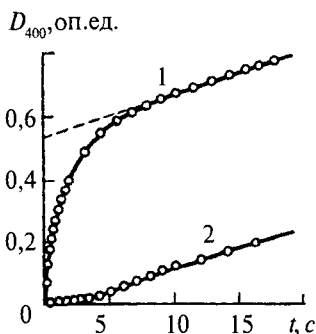


Рис. 2.27. Кинетические кривые накопления *n*-нитрофенола в реакции гидролиза *n*-нитроацетата под действием α -химотрипсина.

1 — реакция инициировалась быстрым смешиванием химотрипсина с субстратом при pH 8,2; 2 — реакция инициировалась быстрым изменением pH от 4,8 до 8,2. Концентрация фермента $4,4 \cdot 10^{-5}$ М, субстрата $2 \cdot 10^{-4}$, 1% этанола, 25° С.

цина, а также трипсина и плазмина — протеолитических ферментов животного происхождения.

Схема (2.61) является простейшей с участием ацилфермента. Детальное экспериментальное исследование кинетики реакции показало, что механизм реакции более сложен и включает по крайней мере одну стадию, предшествующую образованию ацилфермента.

Кинетическое свидетельство в пользу усложнения механизма связано с анализом функции характеристического времени реакции от концентрации субстрата. Независимо от природы детектируемого вещества (исходный субстрат, интермедиат, первый или второй продукт) кинетическая схема (2.61) описывается одним характеристическим временем. Таково свойство линейной системы уравнений. Показатель экспоненты остается инвариантным и для кинетической схемы (2.61) и имеет вид

$$\tau^{-1} = k_a S_0 + k_3. \quad (2.71)$$

Эта величина входит во все интегральные кинетические уравнения схемы и может быть найдена из экспериментальных данных, например из зависимости (2.66), которую можно представить в виде

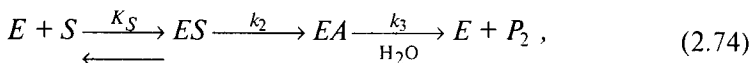
$$P(t) = At + B \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right). \quad (2.72)$$

Параметр A определяется как стационарная скорость реакции, B — как «выброс» продукта. Соответственно обратная величина характеристического времени может быть найдена из зависимости

$\ln \left(1 - \frac{P_1 - At}{B} \right)^{-1}$ от времени по тангенсу угла наклона. Экспериментальное исследование зависимости τ^{-1} от S_0 показало, что функция не линейна, а имеет вид, близкий к виду, заданному уравнением Михаэлиса с дополнительной константой:

$$\tau^{-1} = \frac{aS_0}{b + S_0} + C. \quad (2.73)$$

Например, этому уравнению подчиняются экспериментальные данные работы [Sodetz, Castellino, 1972], в которой исследовалась предстационарная кинетика действия плазмина. Аналогичные данные получены в работе Бендера и соавторов при изучении кинетики гидролиза *n*-нитрофенилацетата под действием α -химотрипсина. Эти факты говорят о том, что механизм катализа включает промежуточные соединения, предшествующие ацилированию:



где ES — фермент-субстратный комплекс.

Кинетическая схема (2.74) описывается уравнениями:

$$\begin{cases} EA(t) = \frac{k_2 E_0 S_0}{(K_S + S_0) \left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right)} \left[1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right) t} \right] \\ ES(t) = \frac{E_0 S_0}{(K_S + S_0)} \left\{ 1 - \frac{k_2 S_0}{(K_S + S_0) \left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right)} \left[1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right) t} \right] \right\} \\ P_1(t) = \frac{k_2 k_3 E_0 S_0}{k_2 S_0 + k_3 (K_S + S_0)} t + E_0 \frac{k_2 S_0^2}{k_2 S_0 + k_3 (K_S + S_0)} \left[1 - e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right) t} \right] \\ P_2(t) = \frac{k_2 k_3 E_0 S_0}{k_2 S_0 + k_3 (K_S + S_0)} t + \frac{k_2 k_3 E_0 S_0 (K_S + S_0)}{[k_2 S_0 + k_3 (K_S + S_0)]^2} \left[e^{-\left(k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0} \right) t} - 1 \right] \end{cases} \quad (2.75)$$

Характеристическое время реакции [показатель экспонент в уравнениях (2.75)] имеет вид

$$\tau^{-1} = k_3 + \frac{k_2 S_0}{K_S + S_0}. \quad (2.75')$$

[см. эмпирическое уравнение (2.73)]. При $t \rightarrow \infty$ система переходит в стационарный режим, который характеризуется следующими соотношениями:

$$\begin{aligned} ES_{cm} &= \lim_{t \rightarrow \infty} ES = \frac{\frac{k_3}{k_2 + k_3} E_0 S_0}{S_0 + \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S}; \\ EA_{cm} &= \lim_{t \rightarrow \infty} EA = \frac{\frac{k_2}{k_2 + k_3} E_0 S_0}{S_0 + \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S}; \end{aligned}$$

$$\frac{ES_{cm}}{EA_{cm}} = \frac{k_3}{k_3};$$

$$v_{cm} = \left(\frac{dP_1}{dt} \right)_{cm} = \left(\frac{dP_1}{dt} \right)_{cm} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} E_0 S_0}{S_0 + \frac{k_3}{k_2 + k_3} K_S}. \quad (2.76)$$

В зависимости от того, какая стадия является скоростьюопределяющей, уравнение (2.76) модифицируется к виду

$$v_{cm} = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_S + S_0}, \text{ если } k_3 \gg k_2, \quad (2.77)$$

или

$$v_{cm} = \frac{k_3 E_0 S_0}{K_S \frac{k_3}{k_2} + S_0}, \text{ если } k_2 \gg k_3. \quad (2.77')$$

В случае катализа α -химотрипсином гидролиза сложноэфирных субстратов, как правило, лимитирует стадия гидролиза ацилфермента ($k_2 \gg k_3$) и стационарная кинетика описывается уравнением (2.77'). Амиды аминокислот гидролизуются в условиях, когда $k_2 \ll k_3$, и в стационарном состоянии справедливо уравнение (2.77).

Прямое экспериментальное подтверждение участия промежуточных соединений ES и EA в катализе гидролиза эфиров N-ацетилированных L-аминокислот получено из анализа стационарной кинетики реакции на длинах волн поглощения промежуточных соединений ($\lambda_1 \sim 290$ нм) [Hess, McConn, Ku, McConkey, 1970]. Так, при смешении раствора α -химотрипсина с метиловым эфиром N-ацетил-L-фенилаланина наблюдается быстрое, оптически регистрируемое изменение с временем полупревращения меньше 3 мс (образование комплекса ES), за которым следует сравнительно медленная фаза образования ацилфермента (рис. 2.28).

В стационарном режиме ($dEA/dt = 0$) концентрация ацилфермента постоянна, последующий расход субстрата приводит к исчезновению в растворе промежуточных соединений. Аналогичная картина наблюдается при анализе других «специфических» субстратов — метиловых эфиров N-ацетил-L-тирозина, N-ацетил-L-триптофана, N-ацетил-L-лейцина, N-ацетил-L-тирозина. Таким образом, полученные данные демонстрируют участие

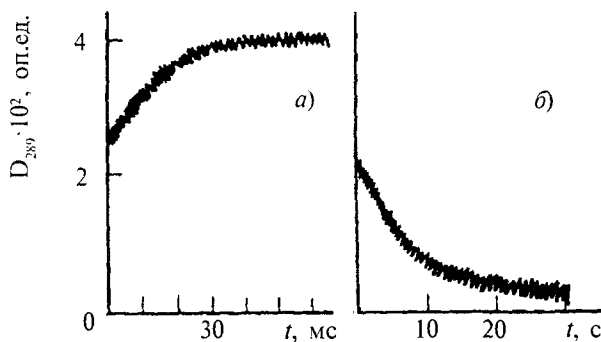


Рис. 2.28. Предстационная кинетика гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина, исследованная методом «остановленной струи».

a — изменение оптической плотности при смешивании $3,7 \cdot 10^{-5}$ М химотрипсина и $1,7 \cdot 10^{-2}$ М субстрата при pH 3,2; *б* — изменение оптической плотности при изменении pH от 3,2 до 5,7.

промежуточного ацилфермента в механизме гидролиза сложноэфирных субстратов α -химотрипсина.

Выделение, очистка ацилферментов, полученных при низких значениях pH, последующий гидролиз белка и идентификация связи белок — ацильная группа показали, что при ацилировании происходит этерификация гидроксильной группы серина-195.

Определение кинетических параметров

Предстационный подход. Наиболее прямое определение констант скоростей элементарных стадий реакции вытекает из анализа предстационной кинетики реакции при определении характеристического времени [уравнение (2.75')]. Из экспериментальных данных по образованию продуктов или промежуточных соединений могут быть найдены характеристические времена реакции [см., например, преобразование уравнения (2.72)]. Из зависимости τ^{-1} от концентрации субстрата можно найти элементарные константы скорости k_2 и k_3 [см. уравнение (2.75') и рис. 2.29].

Исследование субстратов с известной лимитирующей стадией. В большинстве случаев непосредственное определение характеристических времен реакции экспериментально затруднено. При условии, что механизм реакции достаточно изучен, для определения элементарных констант, можно воспользоваться данными стационарной кинетики. Так, для гидролиза сложноэфирных суб-

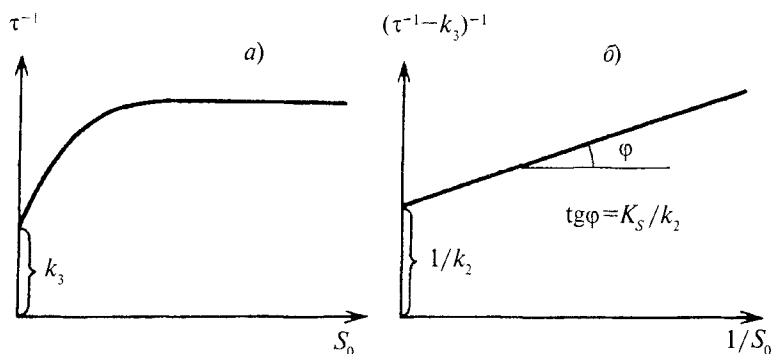


Рис. 2.29. Определение «элементарных» констант схемы (2.73) из зависимости характеристического времени от концентрации субстрата [уравнение (2.75')].

стратов под действием α -химотрипсина лимитирующей является стадия гидролиза ацилфермента. Соответственно определяемая на опыте каталитическая константа равна k_3 [см. уравнение (2.77')]. При использовании этого подхода получена важная информация о связи структуры и реакционной способности различных ацилферментов (см. ниже).



Березин И.В.
(1923–1987)

Физикохимик, биохимик. Основоположник химической и инженерной энзимологии.

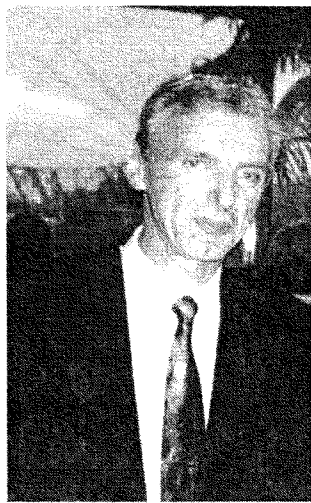
Селективное воздействие на скорости отдельных стадий. Если какая-либо элементарная стадия является «чувствительной» к внешнему воздействию и ее скорость можно варьировать, то это дает дополнительную возможность определения элементарных констант механизма реакции. В приложении к исследованию механизма катализа α -химотрипсином для этой цели были использованы эффекты обратимого ингибирующего влияния катионов тяжелых металлов на стадию ацилирования [Березин и др., 1967] или же влияния на эту стадию ионной силы раствора [Мартинек, Яцимирский и др., 1971].

На рис. 2.30 приведены данные о влиянии ионной силы раствора



Мартинек К.

Многие годы работал с И.В. Березиным. Разработал теорию стабильности ферментов, на основе представлений о двухцентровом строении активного центра фермента, создал количественную теорию специфичности ферментов, разработал основы мицеллярного катализа и мицеллярной энзимологии.

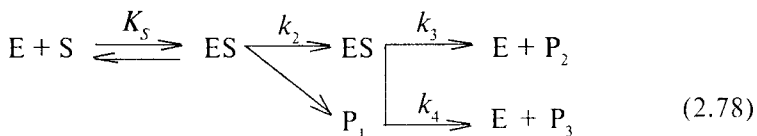


Яцимирский А.К.

Совместно с И.В. Березиным и К. Мартинеком создал основы мицеллярного катализа; известен работами в области создания химических моделей ферментов и супрамолекулярной химии.

на стационарную скорость гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-тирозина под действием α -химотрипсина. Абсцисса точки пересечения дает значение $1/K_S$, ордината $1/k_3 E_0$. Если известны значение k_3 и K_S , то из величины $k_{кат}$ может быть вычислена константа скорости ацилирования.

Наибольшее развитие и последовательное применение в реакциях с участием переноса ацильной группы нашел метод конкурирующих реакций, основанный на конкуренции между водой и добавленным нуклеофильным агентом N за реакцию с ацилферментом [Bender et al., 1964, Клесов, 1972]:



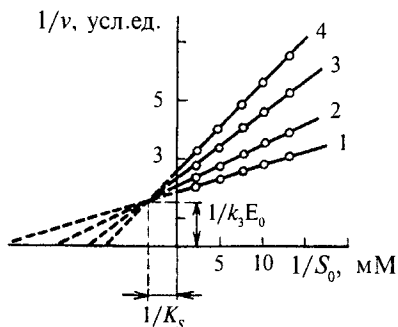


Рис. 2.30. Зависимость начальной стационарной скорости гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-тирозина под действием α -химотрипсина от ионной силы раствора (KCl). 1 — 0,1; 2 — 0,2; 3 — 0,5; 4 — 1,0 [Мартинек, Яцимирский и др., 1971].

Анализируя зависимости $k_{\text{кат}}$ и K_m от концентрации добавленного нуклеофила в соответствии с уравнениями (2.79), можно определить раздельно константы k_2 , k_3 , k_4 .

Структура и реакционная способность ацилферментных производных α -химотрипсина

Транспецифичность активного центра α -химотрипсина. Реакционная способность ацилферментных производных α -химотрипсина в реакции гидролиза [стадия деацилирования, схема (2.73)] является функцией структуры ацильной части субстрата. В зависимости от строения ацильной части скорость гидролиза ацилферментов различается более чем в 10^4 раз, в то время как в реакции щелочного гидролиза эти различия весьма невелики. Структура активного центра фермента задает необходимые пространственные соотношения, определяющие реакционную способность ацилфермента.

Наиболее ярко это проявляется в эффекте трансспецифичности α -химотрипсина [Варфоломеев, 1971]. В работах Варфоломеева, Мартинек и Березина исследовалась реакционная способность цис- и транспроизводных β -арилакриловых кислот в реакции гидролиза под действием α -химотрипсина. Было обнаружено, что в то время как ацилферментное промежуточное соединение, образуемое трансстереоизомером кислоты, гидролизуетея в течение минуты, ацилфермент в цисстереоформе представляет собой практически стабильный каталитически неактивный продукт. Экспериментально это проявляется в том, что, если α -химотрипсин обрабатывать цис-изомером субстрата, быстро ацилирующим активный центр, например *n*-нитрофениловым эфиром цис-4-нитрокоричной кислоты, каталитическая

В соответствии с этой схемой экспериментально определяемые параметры уравнения Михаэлиса, найденные при различных концентрациях нуклеофила, имеют вид

$$k_{\text{кат}(1)} = \frac{k_2(k_3 + k_4 N)}{k_2 + k_3 + k_4 N};$$

$$k_{\text{кат}(2)} = \frac{k_3 + k_4 N}{k_2 + k_3 + k_4 N}; \quad (2.79)$$

$$K_m = K_s \frac{k_3 + k_4 N}{k_2 + k_3 + k_4 N}.$$

где $k_{\text{кат}(1)}$ и $k_{\text{кат}(2)}$ — параметры, найденные по образованию продуктов P_1 и P_2 соответственно.

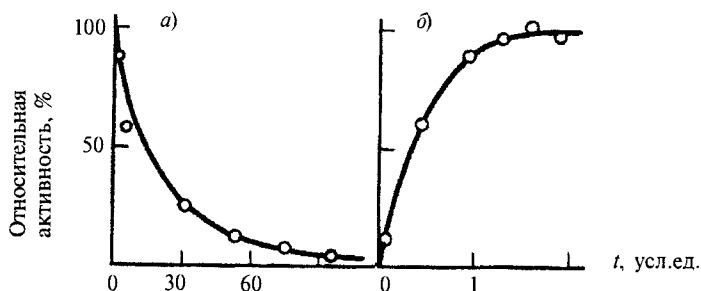
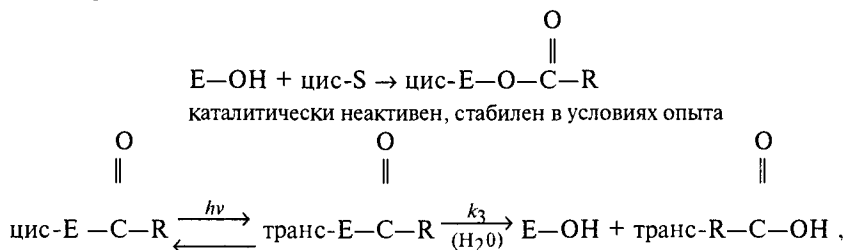


Рис. 2.31. Изменение каталитической активности α -химотрипсина в процессе его инкубации с *p*-нитрофениловым эфиром нитрокоричной кислоты (а), восстановление фермента в процессе освещения цис-4-нитроциннамоил- α -химотрипсина (б) [Варфоломеев и др., 1971].

активность фермента в реакции с модельным субстратом падает практически до нуля (рис. 2.31). При освещении полученного каталитически неактивного производного α -химотрипсина ультрафиолетовым светом можно полностью восстановить исходную активность катализатора (рис. 2.31б). Схема процесса имеет вид



где E-OH — каталитически активная форма α -химотрипсина.

Цис- и трансизомеры ацилферментов коричной и нитрокоричной кислот были выделены в индивидуальном виде, изучены их спектральные характеристики, процесс цис-трансфотоизомеризации циннамоильных групп в активном центре химотрипсина, исследована кинетика гидролиза с образованием активного катализатора. В табл. 2.7 приведены кинетические характеристики цис- и трансизомеров субстратов в реакции ацилирования (k_2/K_s) и деацилирования образующихся ацилферментов. Видно, что трансстереоизомеры в 10^3 – 10^4 раза более реакционноспособны, чем соответствующие цисформы.

Наблюдаемое различие в реакционной способности следует отнести за счет специфической организации активного центра фермента. Константы скорости щелочного гидролиза этиловых эфиров стереоизомерных форм коричной кислоты различаются весьма слабо ($k_{\text{транс}}/k_{\text{цис}} = 1,5 \div 2$). Если нативную структуру активного центра α -химотрипсина нарушить, поместив ацилфермент в раствор 8 М мочевины, константы скорости деацилирования цис- и трансформ ацилферментов практически одинаковы.



Клесов А.А.

Физикохимик. Работает в области ферментного катализа, специфичности ферментов и биокаталитической технологии. Совместно с А.П. Синициным и М.Л. Рабиновичем изучил механизм действия полиферментного целлюлозного комплекса.

На схеме видно, что ацильная группа в цисконформации может препятствовать участию в реакции каталитически важной имидазольной группы или разрушать необходимое для катализа пространственное соответствие между имидазолом гистидина-57 и пространственное соответствие между

Транспецифичность α -химотрипсина объясняется, по-видимому, стерическими эффектами. В цисконформации ацилфермента в нативном состоянии белка каталитически активный имидазол гистидина-57 находится в непосредственной близости от цис-4-нитроциннамоил- α -химотрипсина. Спектр поглощения цис-4-нитроциннамоильной группы изменяется с изменением pH и характеризуется pK_a , совпадающим с pK_a имидазольной группы активного центра. В этом случае 4-нитроциннамоильная группа выступает как хромофорная метка активного центра химотрипсина.

Данные рентгеноструктурного анализа трансиндолилакрилоил- α -химотрипсина [Henderson, 1970] подтверждают стерический характер транспецифичности α -химотрипсина. На рис. 2.32, построенном в соответствии с работой Хендерсона, изображен фрагмент активного центра α -химотрипсина. На схеме обозначена конформация циннамоильной метки в цисконформации. Видно, что ароматическая группа оказывается в непосредственной близости от имидазольного кольца гистидина-57.

Таблица 2.7

Транспецифичность α -химотрипсина

Субстрат	Стереизомер	k_2/K_s , (м ⁻¹ ·с ⁻¹)	k_3 , с ⁻¹
Циннамоилимидазол	транс	—	$0,9 \cdot 10^{-2}$
	цис	—	$0,6 \cdot 10^{-5}$
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	транс	$6 \cdot 10^5$	0,42
4-Нитрокоричной кислоты	цис	$1,2 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
<i>n</i> -Нитрофениловый эфир	транс	650	—
Индолилакриловой кислоты	цис	0,61	—

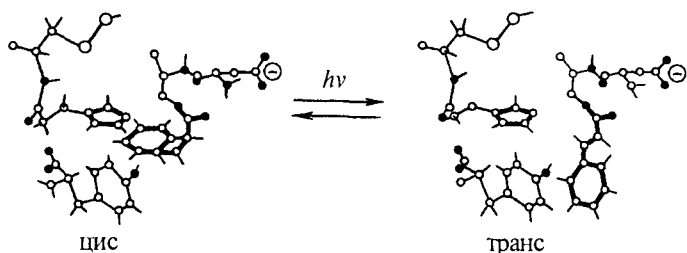
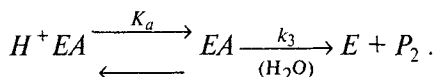


Рис. 2.32. Структура активного центра циннамоил- α -химотрипсина.

имидазолом гистидина-57 и карбоксильной группой аспарагиновой кислоты-102. Итак, транспецифичность действия химотрипсина связана с тем, что в цисацилферменте каталитическая реакция пространственно затруднена боковой группой субстрата.

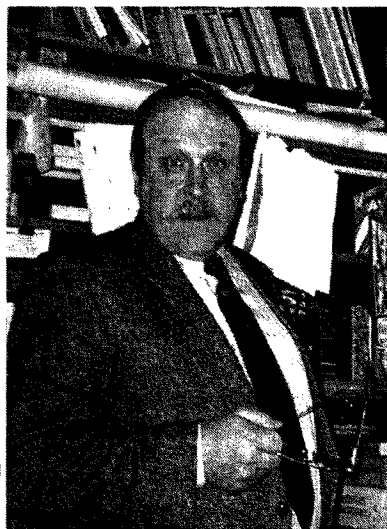
Структура и реакционная способность ацилферментов алифатических карбоновых кислот и N-ацетил-L-аминокислот. Интересные выводы о природе ферментативного катализа могут быть сделаны при систематическом изучении реакционной способности ацилферментов, различающихся числом CH_2 -звеньев в структуре ацильной части. Последовательное изучение связи структуры и реакционной способности ацилферментов было проведено в работах Доровской (1972), Березина, Мартинек (1977).

В реакциях гидролиза этиловых, метиловых и *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых и аминокислот лимитирующей является стадия деацилирования, так что при насыщении субстратом практически весь фермент находится в ацилферментной форме. Уравнение стационарной скорости в этом случае отражает процесс гидролиза ацилфермента [см. уравнение (2.77')]. Скорость процесса деацилирования зависит от pH. Эта зависимость отражает участие в механизме катализа имидазольной группы гистидина-57, входящего в активный центр фермента:



При переходе к низким значениям pH скорость деацилирования падает. На рис. 2.33 приведены данные по зависимости от pH наблюдаемой константы скорости гидролиза для ацилфермента, образуемого химотрипсином с N-ацетил-L-тиозином [Доровская, Варфоломеев, Мартинек, 1973]. Экспериментальные данные получены при различных температурах. При данной температуре зависимость наблюдаемой константы скорости от pH строго описывается уравнением

$$k_{3, \text{набл}} = \frac{k_2}{1 + \frac{H^+}{K_a}}.$$



Левашов А.В.

Физикохимик, биохимик. Работает в области изучения химии ферментов, совместно с К. Мартинек создал основы мицеллярной энзимологии.

Значения pK_a примерно равны 7, так что при $pH > 8$ в логарифмических координатах эта функция представлена прямой с нулевым тангенсом угла наклона, при $pH < 6$ — прямой с тангенсом угла наклона, близким к единице (штриховые линии).

Из рис. 2.33 следует, что при $pH \geq 8,0$ из экспериментальных данных определяются «истинные» значения k_3 , не включающие параметры стадии протонирования активного центра.

Температурная зависимость k_3 изображена на рис. 2.33б в координатах уравнения Аррениуса. По тангенсу угла наклона зависимости $\lg k_3$ от $1/T$ определена энергия активации, которая связана с энтальпией активации уравнением

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT, \quad (2.80)$$

где R — газовая постоянная

Значения $\Delta H^\ddagger$ гидролиза данного ацилфермента, а также энтропии активации $\Delta S^\ddagger$, найденные при использовании «классического» уравнения теории переходного состояния (см § 1.4)

$$k = \frac{\kappa T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}},$$

приведены в табл. 2.8.

Таблица 2.8

Параметры активации реакции деацилирования ацилхимотрипсина — производных N-ацетил-L-аминокислот [Martinek et.al. 1972]

Аминокислота	$k_{кат}, c^{-1}$	$\Delta G^\ddagger,$ ккал/моль	$\Delta H^\ddagger,$ ккал/моль	$-\Delta \Delta S^\ddagger,$ ккал/моль	$-\Delta S^\ddagger,$ э.с
α -Аминомасляная кислота	1,6	17,1	16,9	0,2	0,7
Норвалин	5,9	16,3	15,6	0,7	2,4
Норлейцин	16,7	15,7	13,7	2,0	6,8
Триптофан	47,0	15,2	12,3	2,9	10,0
Фенилаланин	90,5	14,7	11,3	3,4	11,45
Тирозин	250	14,1	95	4,6	15,4

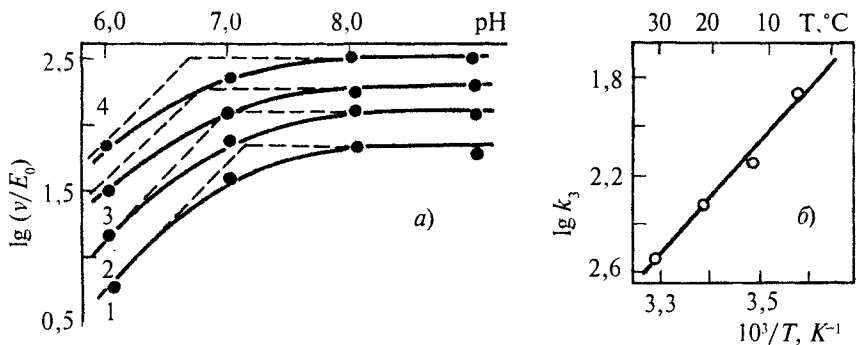


Рис. 2.33. Зависимость от pH (а) и температуры (б) константы скорости деацитилирования N-ацетил-L-тирозин- α -химотрипсина: 1 — 6; 2 — 14; 3 — 22; 4 — 30 °C.

В исследуемом интервале температур (5–30 °C) зависимость от температуры константы скорости деацитилирования различных ацилферментов достаточно хорошо описывается уравнением Аррениуса (рис. 2.34).

В табл. 2.8 и 2.9 представлены экспериментальные значения k_3 при 25 °C для различных ацилферментов, значения $\Delta G^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$ и $\Delta H^\ddagger$, найденные при исследовании температурной зависимости деацитилирования двух серий ацилферментов — производных алифатических карбоновых кислот (табл. 2.9) и N-ацетил-L-аминокислот (табл. 2.8).

Полученные экспериментальные данные позволяют обнаружить несколько закономерностей в функционировании активного центра α -химотрипсина.

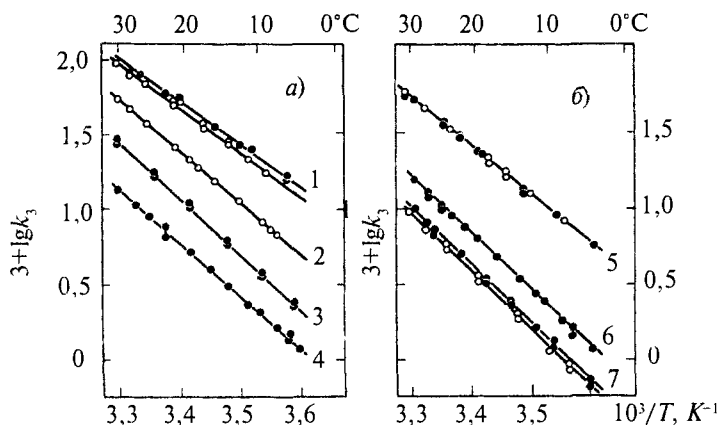


Рис. 2.34. Температурные зависимости констант скоростей деацитилирования различных ацилферментов.

1 — гептаноил; 2 — октаноил; 3 — валерил; 4 — ацетил; 5 — гексаноил; 6 — пропионил; 7 — бутирил [Доровска и др., 1973].

**Параметры активации реакции деацилирования ацилхимотрипсина —
производных карбоновых кислот
[Доровска, Варфоломеев, Мартинек, 1973]**

Ацильная группа	$k_{кат}$, с ⁻¹	$\Delta G^\ddagger$, ккал/моль	$\Delta H^\ddagger$, ккал/моль	$-T\Delta S^\ddagger$, ккал/моль	$-\Delta S^\ddagger$, э.с.
Ацетил	8,5	20,18	15,5	4,7	16
Пропионил	9,8	20,10	17,2	2,75	9
Бутирил	5,9	20,59	17,3	3,1	10,5
Валерил	16,8	19,80	16,1	3,7	12,5
Гексаноил	36,4	19,30	14,3	5,0	17
Гептаноил	69	18,95	12,7	6,2	21
Гексаноил	33,5	19,35	15,1	4,2	14

Для ацилферментов с различным числом звеньев в алифатической цепи в диапазоне $3 \leq n \leq 6$ наблюдается практически линейное понижение свободной энергии активации с инкрементом 600 кал/моль на одну CH_2 -группу. Это предельное значение, которое может быть реализовано, если вся свободная энергия гидрофобного взаимодействия алифатического радикала трансформируется в понижение энергетического барьера реакции [Березин, Мартинек, 1977].

На рис. 2.35 приведены значения $\lg k_3$ как функции показателя гидрофобности, характеризующего свободную энергию переноса алифатического радикала из воды в гидрофобную фазу. Видно, что короткие радикалы ($n < 3$) еще не взаимодействуют с гидрофобной сорбционной областью активного центра и достаточно большие ($n > 7$) также не могут полностью реализовать механизм понижения энергетического барьера за счет сорбции части субстрата. Это дает представление о геометрических характеристиках активного центра фермента.

Принципиально интересные результаты получены при анализе роли α -ацетамидной группы субстрата. Сравнение двух серий субстратов показывает, что α -ацетамидная группа вносит практически постоянный вклад в понижение свободной энергии активации

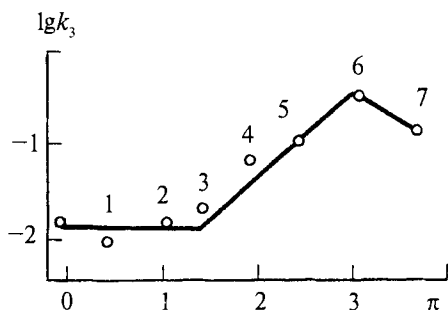


Рис. 2.35. Зависимость константы скорости деацилирования ацилферментов от гидрофобности алифатического радикала.

1 — CH_3 ; 2 — CH_2CH_3 ; 3 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$; 4 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$; 5 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$; 6 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5$; 7 — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$.

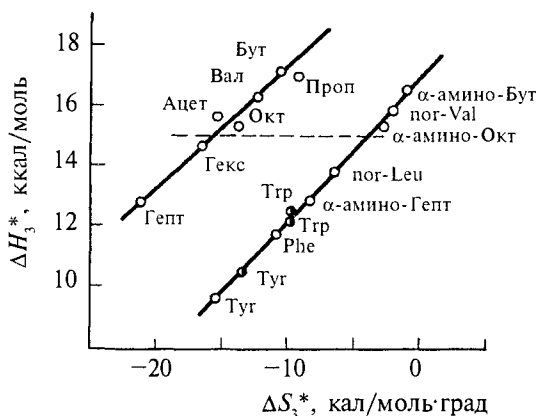


Рис. 2.36. Линейная связь между энтропией и энтальпией активации при гидролизе ацилферментов — производных алифатических карбоновых кислот (левая прямая) и α -N-ацилзамещенных L-аминокислот (правая прямая).

гидролиза ацилферментов независимо от структуры боковой группы ацилфермента. Константы скорости гидролиза ацилферментов с α -ацетамидной группой и без этой группы ($k_{3(\text{H})}$) связаны линейным соотношением

$$\lg k_{3(\text{NHCOCH}_3)} = \lg k_{3(\text{H})} + 2,4.$$

Ацетамидная группа для всех обсуждаемых ацилферментов в 250 раз увеличивает скорость гидролиза. Это соответствует понижению свободной энергии активации на 3,3 ккал/моль. Анализ, проведенный в работе (Доровска, 1973), показывает, что энтальпии и энтропии активации деацилирования различных ацилферментов связаны между собой линейными соотношениями, при этом две серии структур приводят к двум линейным зависимостям (рис. 2.36). Из рисунка видно, что реакции гидролиза ацилферментов, содержащих в своей структуре ту же самую группу R, характеризуются практически одинаковой энтальпией активации (штриховая линия). Прямые, приведенные на рис. 2.36, параллельны, тангенсы угла наклона обеих прямых близки к 420 К.

Основное различие заключается в том, что наличие ацетамидной группы приводит к выигрышу в энтропии активации. Константы скорости деацилирования ацилферментов с α -ацетамидной группой характеризуются меньшей отрицательной энтропией активации на величину 10–12 кал·моль⁻¹·град⁻¹, при этом стабилизация переходного состояния ацилферментов с α -ацетамидной группой имеет чисто энтропийную природу. Взаимодействие между ацетамидной группой и активным центром ориентирует и «замораживает» гидролизующую сложнэфирную связь в положении, обеспечивающем реакционноспособное состояние активного центра.

Согласно термодинамическим расчетам изменение энтропии на каждую «замороженную» связь в боковой группе аминокислотного остатка в

полипептидной цепи составляет 4–7 э.е. Предполагается, что в случае специфических субстратов, содержащих α -ацетамидную группу в исходном состоянии стадии деацилирования, происходит благоприятное «замораживание» трех связей фрагмента $\text{C} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{O} -$, что делает карбонильную группу

максимально доступной для нуклеофильной атаки водой [Березин, Мартинек, 1977].

Молекулярная модель катализа α -химотрипсином

Детальное кинетическое и структурное исследование α -химотрипсина позволило построить молекулярную модель трансформации веществ под действием этого катализатора. Значительную роль в создании этой модели сыграл метод рентгеноструктурного анализа. Методами химической модификации было найдено, что каталитическая активность определяется функционированием целого ряда остатков аминокислот. На рис. 2.37 представлен фрагмент белковой молекулы α -химотрипсина, составляющей активный центр фермента [Blow, Birktoft, Hartley, 1969] (см. также рис. 2.32).

На стадии ацилирования нуклеофильным агентом выступает гидроксильная группа серина-195. Высокая реакционная способность этой группы достигается за счет ее поляризации с образованием водородной связи с имидазольной группой гистидина-57, который, в свою очередь, «поляризуется» избыточной электронной плотностью, возникающей на ионизованном состоянии карбоксильной группы аспарагиновой кислоты-102 (либо образованием водородной связи) (см. рис. 2.37). Система сопряженных водородных связей существенно увеличивает реакционную способность гидроксильной группы серина. В ацилферменте по аналогичному механизму увеличивается нуклеофильная реакционная способность воды, которая образует водородную связь с имидазолом гистидина-57 (рис. 2.38).

На стадии как ацилирования, так и деацилирования реализуется ряд

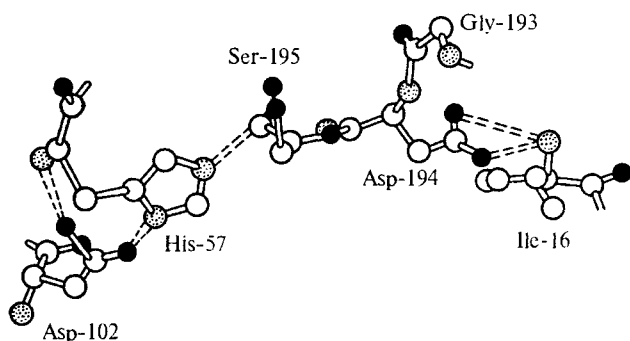


Рис. 2.37. Рентгеноструктурные данные об активном центре α -химотрипсина [Blow e.a., 1969].

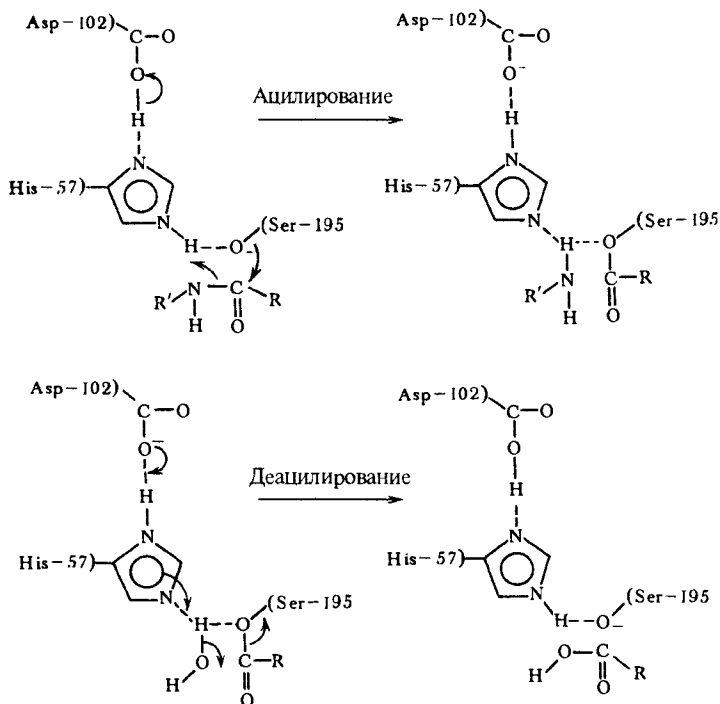
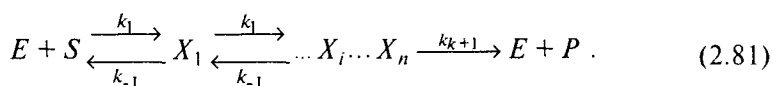


Рис. 2.38. Молекулярная модель действия α -химотрипсина на стадии ацилирования и гидролиза ацилфермента.

«быстрых» взаимодействий субстрата с белком. В исходном состоянии происходит гидрофобное взаимодействие ароматического или алифатического радикала с белком, образуется водородная связь α -ацетамидной группы с карбонильным атомом кислорода серина-214. Это фиксирует молекулу субстрата в необходимом конформационном состоянии, что делает возможным атаку реакционноспособной связи сложным нуклеофильным агентом на лимитирующей стадии реакции.

Предстабионарная кинетика многостадийной ферментативной реакции

Рассмотрим кинетические проявления лабильных интермедиатов в более общем случае — для реакции превращения субстрата в продукт с участием произвольного числа n промежуточных соединений:



Существенно упрощает анализ кинетики реакции использование большого избытка субстрата по сравнению с концентрацией активных центров фермента $S_0 \gg E_0$. Это условие переводит бимолекулярный нелинейный член $k_1 E \cdot S$ в псевдомономолекулярный $k_1 E \cdot S_0$, линейно зависящий только от одной переменной концентрации. В этом случае кинетику процесса описывает система уравнений

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dX_1}{dt} &= k_1 S_0 E + k_{-2} X_2 - (k_{-1} + k_2) X_1 \\ \frac{dX_i}{dt} &= k_i X_{i-1} + k_{-(i+1)} X_{i+1} - (k_{-i} + k_{i+1}) X_i \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{dX_n}{dt} &= k_n X_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1}) X_n \\ E_0 &= E + \sum_{i=1}^n X_i \\ \frac{dP}{dt} &= k_{n+1} X_n \end{aligned} \right. \quad (2.82)$$

Система (2.82) представляет собой линейную систему $(n+1)$ -уравнений. Исключением переменной E с помощью уравнения материального баланса эта система сводится к системе n -линейных дифференциальных уравнений, которые могут быть трансформированы в линейное дифференциальное уравнение с постоянными коэффициентами вида

$$\frac{d^n X_n}{dt^n} + a_1 \frac{d^{n-1} X_n}{dt^{n-1}} + \dots + a_n X_n = b. \quad (2.83)$$

Общим решением этого уравнения является сумма экспоненциальных членов

$$X_n(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\lambda_i t} + \frac{b}{a_n}, \quad (2.84)$$

где λ_i — однократные корни характеристического уравнения

$$\lambda^n + a_1 \lambda^{n-1} + \dots + a_n = 0.$$

Корни характеристического уравнения имеют размерность обратного времени

$$\tau^{-1} = -\frac{1}{\lambda_i} . \quad (2.84')$$

После подстановки уравнения (2.84) в (2.83) и интегрирования получаем

$$P_n(t) = \sum_{i=1}^n k_{n+1} \frac{A_i}{\lambda_i} (e^{\lambda_i t} - 1) + \frac{k_{n+1} b}{a_n} t . \quad (2.85)$$

Следует отметить две особенности изменения во времени концентрации продукта реакции.

1. После протекания реакции в предстационарном режиме по истечении времени $t \gg \tau_p$, $i = 1, \dots, n$, реакция переходит в стационарный режим, характеризуемый стационарной скоростью

$$v_{cm} = \frac{k_{n+1} b}{a_n} t , \quad (2.85')$$

где величины b и a_n являются функциями элементарных констант и начальных концентраций фермента и субстрата и в каждом конкретном случае определяются как коэффициенты уравнения (2.83).

2. Зависимость концентрации конечного промежуточного соединения описывается суммой экспоненциальных членов, а концентрация конечного продукта — суммой экспонент и линейным членом, причем число экспонент соответствует числу промежуточных соединений в механизме реакции. Таким образом, для реакции, протекающей с участием n -промежуточных соединений, в идеальном случае можно получить набор n -характеристических времен.

Реально в эксперименте может наблюдаться меньшее число экспоненциальных членов. Это связано с методическими особенностями регистрации кинетической кривой. Так, при использовании спектрофотометрического метода регистрации необходимы заметные спектральные различия компонентов реакции. Существенные ограничения накладывает также временная разрешающая способность установки. Экспериментально определить характеристическое время можно, если оно превышает «мертвое» время используемой аппаратуры (см. «Экспериментальные методы исследования нестационарной кинетики»). Эти ограничения приводят к тому, что наблюдаемое число экспоненциальных членов позволяет оценить лишь минимальное число промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

Экспериментальные методы исследования нестационарной кинетики

Исследование ферментативных реакций в предстационарном режиме требует специальной экспериментальной техники, поскольку методы должны иметь достаточно высокую временную разрешающую способность.

«Мертвое» время экспериментальной методики должно быть существенно меньше времени протекания реакции в предстационарном режиме. Рассмотрим в качестве примера случай реакции с участием одного промежуточного соединения. Экспериментальную методику можно считать удовлетворительной, если ее «мертвое» время будет меньше величины τ [уравнения (2.84') и (2.85')]. Используя наиболее характерные для ферментативного катализа значения констант скоростей, можно оценить величину τ . Величина констант скорости образования ферментсубстратного комплекса k_1 для большинства ферментативных реакций лежит в диапазоне 10^6 – 10^{10} $\text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$. Типичное значение K_m , характерное для многих ферментативных реакций, равно 10^{-5} М. Если концентрация субстрата равна 10^{-5} М (эта концентрация обычно хорошо детектируется чувствительным спектрофотометрическим методом), значение $1/\tau$ будет лежать в диапазоне 10^{-6} – 10^{-2} с. Это показывает, что для исследования предстационарной кинетики ферментативных реакций необходима специальная экспериментальная техника, позволяющая регистрировать кинетические процессы в микро- и миллисекундном временном диапазоне.

Кинетика предстационарного протекания ферментативных реакций в том приближении, в котором она была изложена выше (условие избытка одного из реагентов и небольшая глубина превращения субстрата), изучалась в основном «струевыми» методами. Струевые методы измерения кинетики быстрых реакций в растворе впервые использовали Хартридж и Роутон [Hartridge, Roughton, 1923]. Позднее они получили развитие благодаря работам Чанса [Chance, 1940]. Сущность используемых струевых методов заключается в том, что реакция инициируется быстрым смешиванием реагентов в проточных условиях.

Различают три метода, известных как методы: «*непрерывной струи*», «*ускоренной струи*» и «*остановленной струи*».

По методу «непрерывной струи» два раствора реагирующих веществ вводят в смесительную камеру, и раствор после смешивания поступает в трубку для наблюдения. (рис. 2.39а). В этой методике при постоянной скорости потока время t определяется расстоянием d от смесительной камеры: $t = d/u$.

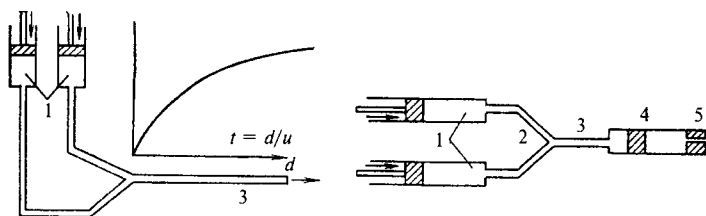


Рис. 2.39. Принципиальная схема метода «непрерывной струи» (а) и «остановленной струи» (б).

1 — растворы реагирующих веществ; 2 — смешительная камера; 3 — трубка для наблюдателя; 4 — место наблюдения; 5 — останавливающий поршень.

По методу «ускоренной струи» растворы реагирующих веществ помещают в шприцы, поршни которых приводят в движение резким толчком в течение примерно 0,1 с. Наблюдение проводят в фиксированной точке вблизи смешительной камеры, при этом скорость течения жидкости постоянно меняется. Специальное автоматическое устройство связывает время протекания реакции со скоростью потока. Методика «ускоренной струи» позволяет использовать весьма малые объемы реагирующих веществ (до 0,1 мл), что является важным преимуществом при исследовании ферментативных реакций.

Наиболее широкое распространение при анализе «быстрой» кинетики ферментативных реакций нашел метод «остановленной струи». Принципиальная схема метода представлена на рис. 2.39б. Для остановки струи используется простое устройство, которое позволяет остановить поток за 1–2 мс. Устройство представляет собой поршень, помещенный в конце трубки для наблюдения, реакционная смесь толкает поршень, и он резко останавливается, дойдя до внешнего ограничителя.

Принципиальная особенность всех «струевых» методов — быстрое смешивание растворов реагирующих веществ в специально сконструированной смешительной камере.

Вопросу об эффективном смешивании было уделено большое внимание. Основной вывод, который был сделан, заключается в том, что константы скорости, определенные при помощи «струевой» аппаратуры, можно считать надежными для реакций с временами полупревращения более 0,2–1,0 мс. «Мертвое» время современных «струевых» установок близко к 0,1–0,3 мс. Разработка достаточно простой и удобной аппаратуры привела к тому, что «струевые» методы (особенно метод «остановленной струи») на-

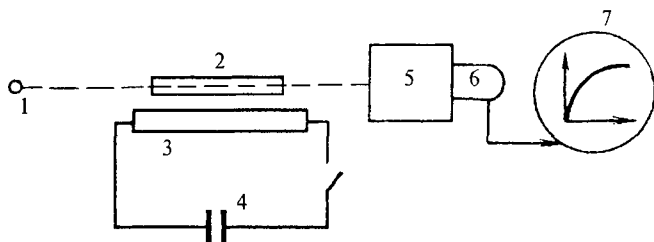


Рис. 2.40. Принципиальная схема импульсного фотолиза.

1 — источник света; 2 — кювета с исследуемым раствором; 3 — импульсная лампа; 4 — высоковольтный конденсатор; 5 — монохроматор; 6 — фотоумножитель; 7 — осциллограф.

шли применение для изучения промежуточных соединений в ферментативных реакциях.

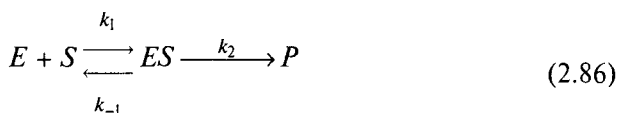
Увеличить временную разрешающую способность аппаратуры для исследования нестационарной кинетики позволяет использование в энзимологии метода импульсного фотолиза («флеш-метод»). Этот метод применим для реакций, которые могут инициироваться действием света за счет протекающей в системе фотореакции, «флеш-метод» не требует быстрого смешивания растворов реагентов. Принципиальная схема метода импульсного фотолиза представлена на рис. 2.40. Реакция инициируется действием мощного светового импульса на раствор фермента с веществом, которое под действием света превращается в субстрат или ингибитор.

Могут быть реализованы системы, в которых фотохимическая реакция происходит в активном центре фермента и продуктом фотохимической реакции является активный фермент. При использовании светочувствительного «пресубстрата», способного под действием света превращаться в субстрат, «мертвое» время метода определяется двумя параметрами: 1) временем импульсной вспышки; 2) временем фотохимического образования субстрата. Ксеноновая импульсная техника позволяет получать мощные импульсы света продолжительностью 10–100 мкс. Время вспышки может быть уменьшено без уменьшения мощности при использовании лазерной техники. Время фотохимической реакции может быть достаточно коротким.

Таким образом, современные методы исследования «быстрых» химических реакций позволяют проводить исследования в микро- и миллисекундном временном диапазоне, необходимом для изучения предстационарной кинетики ферментативных реакций.

**Нестационарная кинетика ферментативных реакций
при переменной концентрации субстрата.
Кинетические закономерности реакции с участием
одного промежуточного соединения**

В некоторых случаях нестационарную кинетику ферментативных реакций с целью выявления и изучения промежуточных соединений, принимающих участие в ферментативной реакции, удобно исследовать в условиях, при которых концентрация субстрата является переменной величиной и в процессе реакции происходит полное расходование субстрата. Для механизма реакции с участием одного промежуточного соединения



система уравнений, описывающая изменение во времени всех компонентов реакции, имеет вид

$$\begin{cases} d[S]/dt = k_{-1}[X] - k_1[E][S] \\ d[X]/dt = k_1[E][S] - (k_2 + k_{-1})[X] \\ d[P]/dt = k_2[X] \\ [E]_0 = [E] + [X] \end{cases} \quad (2.87)$$

Эта система уравнений нелинейна вследствие наличия члена, содержащего произведение переменных $k_1[E][S]$, и решение ее в большинстве случаев сопряжено с приближенным численным интегрированием. В частном случае при условии $[E]_0 \gg [S]_0$ система уравнений трансформируется в линейную систему, и ее решение детально анализирует ниже. При условии $[E]_0 \gg [S]_0$ концентрация фермента в процессе реакции не изменяется. Из уравнения (2.87) следует, что $[E] = [E]_0$ и уравнения (2.87) принимают вид системы линейных уравнений с постоянными коэффициентами:

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= k_{-1}[X] - k_1[E]_0[S]; \\ d[X]/dt &= k_1[E]_0[S] - (k_2 + k_{-1})[X]. \end{aligned} \quad (2.88)$$

Эта система двух уравнений может быть сведена к одному дифференциальному уравнению второго порядка. Используя уравнение (2.88), выражаем величину $[S]$ через $[X]$:

$$[S] = \frac{1}{k_1[E]_0} \{d[X]/dt + (k_2 + k_{-1})[X]\};$$

$$d[S]/dt = \frac{1}{k_1[E]_0} \{d^2[X]/dt^2 + (k_2 + k_{-1})d[X]/dt\}. \quad (2.89)$$

Подставляя величины $[S]$ и $d[S]/dt$ (из 2.89) в дифференциальное уравнение (2.88), получаем линейное дифференциальное уравнение второго порядка

$$d^2[X]/dt^2 + (k_2 + k_{-1} + k_1[E]_0)d[X]/dt + k_1k_2[E]_0[X] = 0. \quad (2.90)$$

Соответствующее характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + (k_2 + k_{-1} + k_1[E]_0)\lambda + k_1k_2[E]_0[X] = 0.$$

имеет два действительных корня

$$\lambda_{1,2} = \frac{k_2 + k_{-1} + k_1[E]_0}{2} \pm \sqrt{\frac{(k_2 + k_{-1} + k_1[E]_0)^2}{4} - k_1k_2[E]_0}, \quad (2.90')$$

поскольку

$$(k_2 + k_{-1} + k_1[E]_0)^2 > 4k_1k_2[E]_0.$$

В соответствии с теорией линейных дифференциальных уравнений решение уравнения (2.90) в этом случае имеет вид

$$[X] = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t}, \quad (2.91)$$

где λ_1, λ_2 — корни характеристического уравнения; C_1, C_2 — постоянные интегрирования, определяемые из начальных условий.

Для нахождения постоянных C_1 и C_2 используем условия $t = 0$: $[X] = 0, dX/dt = k_1[E_0][S_0]$. Подстановка этих условий в уравнение (2.91) приводит к системе алгебраических уравнений

$$C_1 + C_2 = 0;$$

$$\lambda C_1 + \lambda_2 C_2 = k_1[E]_0[S]_0,$$

решение которой дает постоянные интегрирования

$$C_1 = \frac{k_1[E_0][S_0]}{\lambda_1 - \lambda_2}; \quad C_2 = \frac{k_1[E_0][S_0]}{\lambda_2 - \lambda_1}.$$

Таким образом, изменение во времени концентрации промежуточного соединения описывает функция

$$[X(t)] = k_1[E_0][S_0] \left\{ \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_1 t] - \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_2 t] \right\}. \quad (2.92)$$

Изменение во времени концентрации субстрата определяется с использованием уравнения (2.92) при подстановке $[X]$ и $d[X]/dt$ в уравнение (2.89):

$$[S(t)] = [S_0] \left\{ \frac{\lambda_1 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_1 t] - \frac{\lambda_2 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_2 t] \right\}. \quad (2.93)$$

Соответственно функция $[P](t)$ определяется подстановкой уравнения (2.93) в уравнение (2.87) и интегрированием полученного дифференциального уравнения с разделяющимися переменными:

$$[P(t)] = k_1 k_2 [E_0][S_0] \left\{ \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} (\exp[\lambda_1 t] - 1) - \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} (\exp[\lambda_2 t] - 1) \right\}. \quad (2.94)$$

Графический вид функций $[S](t)$, $[X](t)$ и $[P](t)$ дан на рис. 2.41. Характерной особенностью $[S](t)$, $[X](t)$ и $[P](t)$ является то, что они представляют собой суммы одних и тех же экспоненциальных членов, различающихся лишь предэкспонентами. Величины λ_1 и λ_2 имеют размерности обратного времени и связаны с характеристическими временами регистрируемых кинетических процессов соотношениями

$$\lambda_1 = -1/\tau_1, \quad \lambda_2 = -1/\tau_2. \quad (2.95)$$

Величины τ_1 и τ_2 могут быть найдены из любой экспериментальной зависимости $[S](t)$, $[X](t)$ или $[P](t)$. Из анализа найденных величин τ_1 и τ_2 (или λ_1 и λ_2) определяют все константы скорости, описывающие механизм реакции (2.86).

Величины τ_1 и τ_2 (или λ_1 и λ_2) определяются из анаморфоз функций $[S](t)$, $[X](t)$ или $[P](t)$ в полулогарифмических координатах. Действительно, с точностью до постоянных уравнения (2.92) и (2.93) могут быть представлены в виде

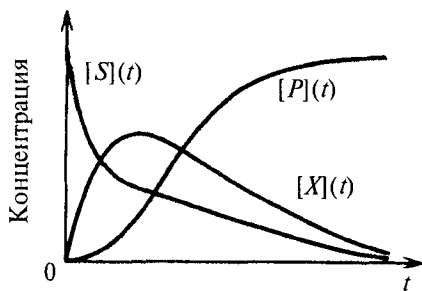


Рис. 2.41. Зависимость от времени концентрации субстрата, промежуточного соединения и продукта при переменной концентрации субстрата.

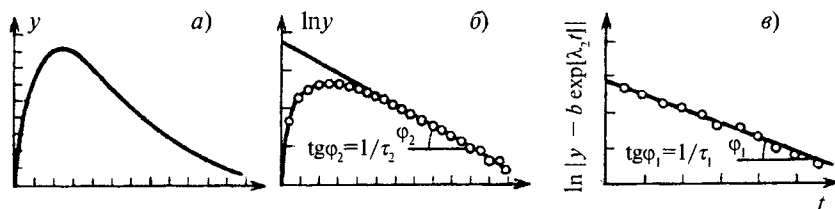


Рис. 2.42. Определение показателей экспонент из кинетической кривой, описываемой суммой двух экспоненциальных членов.

$$y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t], \quad (2.96)$$

уравнение (2.94) — в виде

$$y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t] + C. \quad (2.97)$$

Можно показать, что в уравнении (2.97) $C = -[S]_0$. На рис. 2.42 представлен вид функций (2.96) или (2.97) $[S]_0 - y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t]$ в полулогарифмических координатах. Из линейной части кривой в условиях, когда первым, более «быстрым» экспоненциальным членом можно практически пренебречь, по тангенсу угла наклона определяют величину λ_2 , по отрезку, отсекаемому на оси ординат, — величину b . Показатель второй экспоненты находят по тангенсу угла наклона зависимости $\ln(y - b \exp[\lambda_2 t])$ или $\ln([S]_0 - y - b \exp[\lambda_2 t])$, для функции $[P](t)$ в соответствии с уравнением

$$\ln(y - b e^{\lambda_2 t}) = \ln a + \lambda_1 t. \quad (2.98)$$

Величины λ_1 и λ_2 связаны с элементарными константами скорости реакции (2.86) достаточно сложным соотношением (2.90'), и непосредственное определение констант скоростей из величин λ_1 и λ_2 затруднено (за исключением частного случая, рассмотренного ниже). Однако функции $\lambda_1 \cdot \lambda_2$, $\lambda_1 + \lambda_2$ связаны, как корни характеристического уравнения (2.90) с константами скоростей k_1 , k_{-1} и k_2 следующими уравнениями:

$$\lambda_1 \cdot \lambda_2 = k_2 k_1 [E]_0; \quad (\lambda_1 + \lambda_2) = k_1 [E]_0 + k_{-1} + k_2. \quad (2.99)$$

При условии, что величины λ_1 и λ_2 (или τ_1 и τ_2) найдены из эксперимента при различных концентрациях фермента (т.е. найдены зависимости λ_1 и λ_2 от $[E]_0$), используя уравнения (2.99), можно найти все константы скорости реакции (2.86) (см. рис. 2.43). Из зависимости функции $(1/\tau_1 + 1/\tau_2)$ от концентрации фермента по тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, определяют величины k_1 и $k_{-1} + k_2$. По тангенсу угла наклона зависимости $(\tau_1 \cdot \tau_2)^{-1}$ находят величину $k_1 \cdot k_2$, из которой,

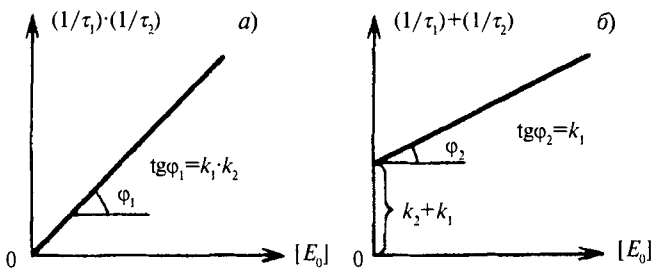


Рис. 2.43. Определение кинетических констант для реакции (2.86) из данных по нестационарной кинетике.

используя найденное значение k_1 , определяют константу скорости k_2 . Значение k_{-1} находят из суммы $k_{-1} + k_2$.

Формально-кинетический анализ реакции (2.86) при переменной концентрации субстрата и при условии $[E]_0 \gg [S]_0$ существенно упрощается, если $k_{-1} \ll k_2 + k_1[E]_0$. В этом частном случае [см. уравнение (2.90)] показатели экспонент непосредственно связаны с элементарными константами уравнений:

$$\lambda_1 = -k_1[E]_0; \quad \lambda_2 = -k_2. \quad (2.100)$$

При этом условии концентрации субстрата, промежуточного соединения и продукта реакции описаны уравнениями

$$\begin{cases} [S](t) = [S]_0 \left\{ \frac{k_{-1}}{k_1[E]_0 - k_2} e^{-k_2 t} + \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2 - k_1[E]_0} \right) e^{-k_1[E]_0 t} \right\} \\ [X](t) = k_1[E]_0[S]_0 \left\{ \frac{1}{k_1[E]_0 - k_2} e^{-k_2 t} + \frac{1}{k_2 - k_1[E]_0} e^{-k_1[E]_0 t} \right\} \\ [P](t) = [S]_0 \left\{ \frac{k_1[E]_0}{k_2 - k_1[E]_0} (e^{-k_2 t} - 1) + \frac{k_2}{k_1[E]_0 - k_2} e^{-k_1[E]_0 t} \right\} \end{cases} \quad (2.101)$$

В случае, если экспериментальные данные получены при соизмеримых концентрациях фермента и субстрата, система уравнений (2.87) нелинейна, и при решении этой системы необходимо численно интегрировать дифференциальные уравнения. Тем не менее численные значения констант скоростей реакции (2.86) и в этих условиях могут быть определены достаточно просто. Сложение уравнений системы (2.87) приводит к уравнению

$$d[S]/dt + d[X]/dt = -k_2[X].$$

[X]

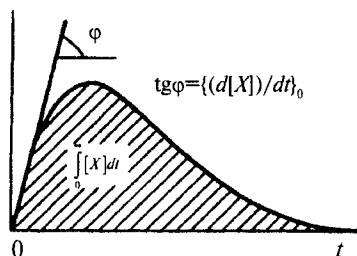


Рис. 2.44. Определение кинетических констант по интегральной кинетической кривой образования и расхода промежуточного соединения.

Интегрирование этого уравнения по всему диапазону времени

$$\int_{[S]_0}^0 d[S] + \int_0^{\infty} d[X] = -k_2 \int_0^{\infty} [X] dt$$

с учетом условий $t = 0$, $[S] = [S]_0$, $[X] = 0$; $t \rightarrow \infty$, $[S] \rightarrow 0$, $[X] \rightarrow 0$ приводит к уравнению

$$[S]_0 = k_2 \int_0^{\infty} [X] dt. \quad (2.102)$$

При условии, что исследование кинетики реакции проводится по

концентрации промежуточного соединения, интеграл $\int_0^{\infty} [X] dt$

достаточно просто и точно может быть найден по площади, ограниченной кривой $[X](t)$ (интегральная кинетическая кривая) (рис. 2.44). Это позволяет определить величину k_2 .

$$k_2 = [S]_0 / \int_0^{\infty} [X] dt. \quad (2.103)$$

Величина k_1 может быть найдена из начальной скорости образования промежуточного соединения. Значение k_{-1} может быть найдено, если из данных по стационарной скорости реакции известна величина $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$, поскольку значения констант k_1 и k_2 определены выше.

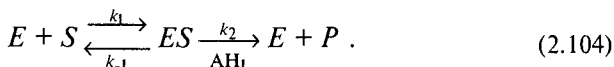
Каталаза и пероксидаза

Рассмотренный выше подход к исследованию механизма ферментативной реакции при переменной концентрации субстрата по кинетике образования и расходования промежуточного соединения был использован Б. Чансом при изучении механизма катализа окислительными ферментами каталазой и пероксидазой. Спектры поглощения в видимой области комплексов гемсодержащих ферментов каталазы и пероксидазы с перекисью водорода и органическими перекисями существенно отличаются от спектров поглощения исходных ферментов. Это позволило Чансу провести непосредственное кинетическое изучение промежуточных соединений методами «ускоренной» и «остановленной» струи с использованием высокочувствительной спектрофо-

тометрической аппаратуры. При быстром смешивании растворов каталазы с перекисью водорода была зарегистрирована кинетика образования комплексов «каталаза—перекись водорода», «каталаза—органические перекиси» и более медленная кинетика исчезновения, промежуточного комплекса в результате расхода перекисного соединения (рис. 2.45). Вторая стадия реакции имеет в присутствии субстратов-доноров электронов бимолекулярный характер, поскольку скорость исчезновения промежуточного комплекса увеличивается с увеличением концентрации субстратов-доноров (были использованы алифатические спирты и гликоли). Таким образом, согласно Чансу, механизм пероксидазного действия каталазы представлен схемой

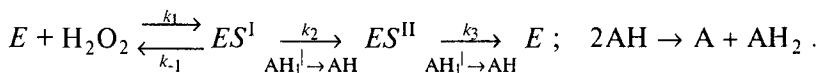


Рис. 2.45. Изменение концентрации комплекса «пероксидаза—перекись водорода».



Константы скорости этого механизма k_1 и $k_2' = k_2[\text{АН}_2]_0$ были определены в соответствии с уравнением (2.103).

По данным Чанса, механизм каталазного действия каталазы существенно не отличается от механизма пероксидазного действия этого фермента. В качестве донорной молекулы в этом случае выступает вторая молекула перекиси водорода. Комплекс I образуется сразу при добавлении перекиси водорода; это неустойчивое соединение зеленого цвета быстро превращается в красный комплекс II. Превращение комплекса I в комплекс II происходит быстрее в присутствии донора водорода. Общая схема процесса, составленная на основе измерений быстрой кинетики в нестационарном режиме, имеет следующий вид:



КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какую информацию о механизме ферментативной реакции позволяют получить методы нестационарной кинетики? Приведите примеры.
2. Какие методы нестационарной кинетики вы знаете?
3. Как определяются кинетические параметры методами нестационарной кинетики?
4. Каким образом было доказано существование ацилфермента в катализе α -химотрипсинном и другими сериновыми протеазами?
5. Напишите основные уравнения нестационарной кинетики многостадийной ферментной реакции.
6. Преимущества и недостатки струевых методов.
7. Напишите основные уравнения нестационарной кинетики ферментативных реакций при перменной концентрации субстрата. Как определяются кинетические параметры в этом случае?

2.5. Релаксационная кинетика ферментативных реакций

Нет таких экспериментальных данных, которые бы нельзя было объяснить с помощью произвольной теории.

П. Лут

«Химическая релаксация» при комплексообразовании фермента с субстратом или эффектором

В настоящее время для анализа механизмов ферментативных реакций широко используются экспериментальные и теоретические методы релаксационной кинетики. Релаксационные методы исследования кинетики химических реакций основаны на том принципе, что при быстром внешнем воздействии на систему (изменение температуры, давления, электрического поля) время, которое нужно системе для достижения нового равновесия (или стационарного состояния), зависит от скорости химической реакции (или иногда от скорости диффузии реагентов). Переход системы к новым равновесным концентрациям реагентов иногда называют «химической» релаксацией.

Рассмотрим принципы релаксационной кинетики на примере простейшей реакции комплексообразования активного центра фермента с каким-либо лигандом A (субстратом, ингибитором, эффектором):



В начальном состоянии система находится в равновесии, которое характеризуется константой равновесия $K_0 = K(T_0)$ и соответственно равновесными концентрациями $[\overline{E}], [\overline{A}], [\overline{EA}]$. Предположим, что в системе резко изменяется температура $T \rightarrow T_0 + \Delta T$. Это приводит к изменению константы равновесия $K \rightarrow K_0 + \Delta K$, которое определяется отношением

$$\frac{\Delta K}{K_0} \equiv \Delta \ln K \equiv \frac{\Delta H}{RT^2} \Delta T, \quad (2.106)$$

где ΔH — стандартное изменение энтальпии; R — газовая постоянная.

Таким образом, после быстрого изменения температуры исходные концентрации компонентов не соответствуют новому рав-

новесию, характеризуемому константой равновесия $K_0 + \Delta K$, и система кинетически переходит в новое равновесное состояние.

Кинетика реакции описывается дифференциальным уравнением

$$d[EA]/dt = k_{1,2}[E][A] - k_{2,1}[EA], \quad (2.107)$$

в котором текущие концентрации связаны с равновесными концентрациями уравнениями:

$$\begin{aligned} [EA] &= [\overline{EA}] + \Delta[EA](t); \\ [E] &= [\overline{E}] + \Delta[E](t); \\ [A] &= [\overline{A}] + \Delta[A](t). \end{aligned} \quad (2.108)$$

Уравнение (2.107) нелинейно вследствие наличия в нем произведения переменных $[E]$ и $[A]$. Анализ кинетики существенно упрощается, если отклонение от равновесия, вызываемое внешним возмущающим фактором, невелико, т. е. если справедливы неравенства:

$$[\overline{E}] \gg \Delta[E](t), \quad (2.109)$$

и, следовательно,

$$[\overline{A}] \gg \Delta[A](t). \quad (2.110)$$

В этом случае можно пренебречь произведением переменных, и бимолекулярный член в уравнении (2.107) принимает вид

$$k_{1,2}([\overline{E}] + \Delta[E])([\overline{A}] + \Delta[A]) \approx k_{1,2}[\overline{E}][\overline{A}] + k_{1,2}[\overline{E}]\Delta[A] + k_{1,2}[\overline{A}]\Delta[E]. \quad (2.111)$$

Уравнение (2.107) вследствие этого трансформируется в линейное дифференциальное уравнение с постоянными коэффициентами. Исследование механизма реакции при небольшом отклонении от равновесия — характерная черта релаксационной кинетики.

С учетом равенства

$$\Delta[A] = \Delta[E] = -\Delta[EA], \quad (2.112)$$

которое является следствием материального баланса по $[E]$ и $[A]$, уравнение (1.107) принимает вид

$$d\Delta[EA]/dt + (k_{1,2}[\overline{E}] + [\overline{A}]k_{2,1})\Delta[EA] = k_{1,2}[\overline{A}][\overline{E}] - k_{2,1}[\overline{EA}]. \quad (2.113)$$

Решение этого дифференциального уравнения представляет собой экспоненциальную функцию от времени, в которой показатель экспоненты связан с элементарными константами скорости реакции (2.105) уравнением

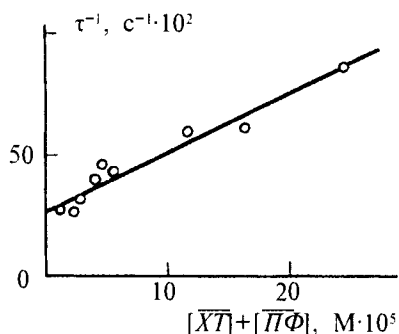
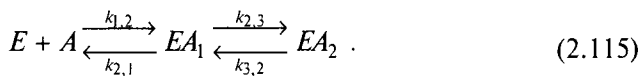


Рис. 2.46. Зависимость обратного времени релаксации взаимодействия α -химотрипсина с красителем акрифлавином от суммы равновесных концентраций фермента и профловина [Navsteen, 1968].

По тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, найдены константы скорости процесса комплексообразования $k_{1,2} = 2,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, $k_{2,1} = 2,7 \cdot 10^2 \cdot \text{c}^{-1}$.

Кинетика реакции комплексообразования с одним промежуточным соединением

Методы определения элементарных констант усложняются по мере усложнения механизма реакции. Для типичной обратимой двухстадийной реакции комплексообразования лиганда A с активным центром фермента данные релаксационной кинетики позволяют определить все четыре элементарные константы скорости процесса:



Для этой реакции кинетика процесса описывается системой уравнений:

$$\begin{cases} d[E]/dt = -k_{1,2}[E][A] + k_{2,1}[EA_1] \\ d[EA_1]/dt = k_{1,2}[E][A] - (k_{2,1} + k_{2,3})[EA_1] + k_{3,2}[EA_2] \\ [E]_0 = [E] + [EA_1] + [EA_2] \\ [A]_0 = [A] + [EA_1] + [EA_2] \end{cases} \quad (2.116)$$

$$\tau^{-1} = k_{1,2}([E] + [A]) + k_{1,2} \quad (2.114)$$

Величина τ называется временем релаксации. При анализе зависимости времени релаксации от равновесных концентраций E и A могут быть найдены элементарные константы скорости реакции (2.105).

В качестве примера на рис. 2.46 приведены кинетические данные реакции комплексообразования активного центра α -химотрипсина с красителем акрифлавином. Представленные экспериментальные данные хорошо описываются уравнением (2.114). По тангенсу угла на-

Из уравнений материального баланса следует, что $\Delta[A] = \Delta[E]$, $\Delta[EA_2] = -\Delta[E] - \Delta[EA_1]$. После перехода к новым переменным $\Delta[E]$ и $\Delta[EA_1]$ система уравнений (2.116) трансформируется к виду:

$$\begin{aligned} d\Delta[E]/dt &= a_{1,1}\Delta[E] + a_{1,2}\Delta[EA_1] ; \\ d\Delta[EA_1]/dt &= a_{2,1}\Delta[E] + a_{2,2}\Delta[EA_1] , \end{aligned} \quad (2.117)$$

где

$$\begin{aligned} a_{1,1} &= -k_{1,2} \left([\bar{E}] + [\bar{A}] \right) ; \quad a_{1,2} = k_{2,1} ; \\ a_{2,1} &= k_{1,2} \left([\bar{E}] + [\bar{A}] \right) - k_{3,2} ; \quad a_{2,2} = -k_{3,2} - k_{2,1} - k_{2,3} . \end{aligned}$$

Система уравнений (2.117) представляет собой линейную систему уравнений с постоянными коэффициентами. Линеаризация системы уравнений (2.116) возможна при условии, что смещение концентраций компонентов относительно установившегося равновесия невелико. Это позволяет пренебречь в сумме членами, содержащими произведения переменных $\Delta[E] \cdot \Delta[EA_1]$. Небольшое смещение от равновесия является основным условием выполнения уравнений релаксационной кинетики.

Интегрирование системы уравнений (2.117) дает сумму двух экспоненциальных членов, показатели экспонент которых являются корнями соответствующего характеристического уравнения. Характеристическое уравнение в форме определителя имеет вид

$$\begin{vmatrix} a_{1,1} - \lambda & a_{1,2} \\ a_{2,1} & a_{2,2} - \lambda \end{vmatrix} = 0 . \quad (2.118)$$

Корни характеристического уравнения, найденные при решении квадратного уравнения (2.118), даны иррациональной функцией:

$$\lambda_{1,2} = \frac{a_{1,1} + a_{2,2}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{a_{1,1} - a_{2,2}}{2} \right)^2 - (a_{1,1}a_{2,2} + a_{2,1}a_{1,2})} . \quad (1.119)$$

Из экспериментальных данных на опыте определяются два времени релаксации $\tau_{1,2}$, которые связаны с $\lambda_{1,2}$ соотношением

$$\tau_{1,2} = 1/\lambda_{1,2} . \quad (2.120)$$

Как видно, времена релаксации определяются элементарными константами в соответствии с уравнениями (2.117), (2.119), (2.120). Однако непосредственное вычисление элементарных констант по времени релаксации затруднено.

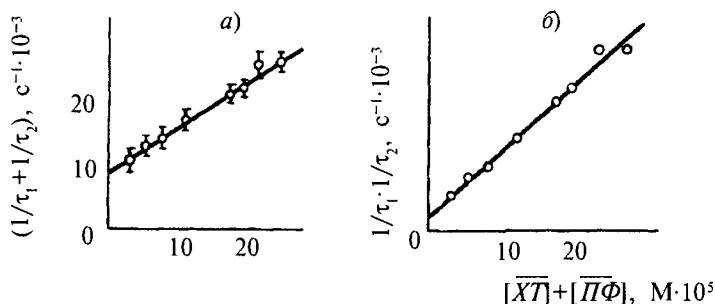


Рис. 2.47. Зависимость суммы (а) и произведения (б) обратных времен релаксации от суммы равновесных концентраций α -химотрипсина и профлавина [Navsteen, 1968].

Некоторые функции времен релаксации связаны с элементарными константами скорости процесса простыми соотношениями, которые позволяют определить из экспериментальных данных константы скорости элементарных процессов механизма реакции (2.115). Этот прием неоднократно использован выше; он основан на том, что величины λ_1 и λ_2 связаны как корни характеристического уравнения соотношениями

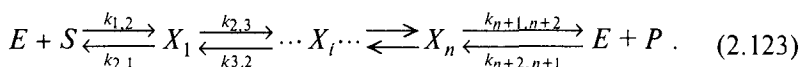
$$-(\lambda_1 + \lambda_2) = a_{1,1} + a_{2,2} = k_{1,2}([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{2,1} + k_{2,3} + k_{3,2}; \quad (2.121)$$

$$\lambda_1 \lambda_2 = -a_{1,2} a_{2,1} + a_{1,1} a_{2,2} = (k_{1,2} k_{2,3} + k_{1,2} k_{3,2})([\bar{E}] + [\bar{A}]) + k_{2,1} k_{3,2}. \quad (2.122)$$

Рассмотрим механизм комплексообразования активным центром α -химотрипсина красителя профлавина. Кинетическая кривая комплексообразования описывается суммой двух экспоненциальных членов, из которой соответственно были найдены времена релаксации τ_1 и τ_2 . На рис. 2.47, а представлена зависимость функции $\tau_1^{-1} + \tau_2^{-1}$ от суммы равновесных концентраций фермента и красителя. По тангенсу угла наклона этой зависимости определяется константа скорости $k_{1,2}$. Отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает сумму констант $k_{2,1} + k_{2,3} + k_{3,2}$. Соответственно из зависимости функции $\tau_1^{-1} \cdot \tau_2^{-1}$ от равновесных концентраций фермента и красителя определяются параметры $k_{1,2} k_{2,3} + k_{1,2} k_{3,2}$ (по тангенсу угла наклона) и $k_{2,1} k_{3,2}$ (по отрезку, отсекаемому на оси ординат). Решение полученной системы четырех уравнений с четырьмя неизвестными константами скорости позволяет найти все четыре элементарные константы скорости механизма (2.115). Для экспериментальных данных, представленных на рис. 2.47, найденные константы скорости равны: $k_{1,2} = 0,63 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $k_{2,1} = 1200 \text{ c}^{-1}$, $k_{2,3} = 520 \text{ c}^{-1}$, $k_{1,2} = 7040 \text{ c}^{-1}$.

Релаксационная кинетика многостадийной фермент-субстратной реакции

Методы релаксационной кинетики в современном виде — мощное оружие в исследовании многостадийных фермент-субстратных реакций. Ниже анализируется кинетика реакции с участием n промежуточных соединений:



Для системы, находящейся в равновесии, концентрации всех компонентов реакции постоянны и соответственно равны $[\bar{E}]$, $[\bar{S}]$, $[\bar{X}_1]$... $[\bar{X}_n]$, $[\bar{P}]$. При быстром изменении состояния равновесия концентрации реагентов будут отличаться от равновесных, соответствующих новому равновесию.

Текущую концентрацию каждого из компонентов можно записать в виде $([\bar{E}] + \Delta[E])$, $([\bar{S}] + \Delta[S])$, $([\bar{X}_i] + \Delta[X_i])$, $([\bar{P}] + \Delta[P])$, где Δ обозначены переменные во времени изменения концентрации реагентов.

Для того чтобы найти функциональную зависимость каждого из компонентов реакции, необходимо решить систему уравнений типа (2.116). Эта система будет линейна, если смещение от равновесия невелико. При этом условии бимолекулярные члены уравнений $k_{1,2}[E][S]$ и $k_{n+2}, k_{n+1}[E][P]$, которые приводят к нелинейности системы, можно представить в виде $k_{1,2}([E] + \Delta[E])([S] + \Delta[S]) \approx k_{1,2}([E][S] + [S]\Delta[E] + [E]\Delta[S])$ и соответственно $k_{n+2,n+1}([E][P] + [P]\Delta[E] + [E]\Delta[P])$, поскольку при малом смещении равновесия в записанных суммах можно пренебречь произведением переменных. В результате система уравнений, описывающая кинетику процесса, может быть представлена в виде

$$\begin{aligned} d\Delta[S]/dt &= a_{1,1}\Delta[S] + \sum_{j=1}^n a_{1,j+1}\Delta[X_j]; \\ d\Delta[X_i]/dt &= a_{i+1,1}\Delta[S] + \sum_{j=1}^n a_{i,j+1}\Delta[X_j], \end{aligned} \quad (2.124)$$

где a_{ij} — функции констант скоростей и равновесных концентраций компонентов.

Общее решение системы линейных дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами может быть найдено в виде

$$\Delta[S] = \sum_{j=1}^{n+1} A_j e^{\lambda_j t} ; \quad \Delta[X_i] = \sum_{j=1}^{n+1} B_{i,j} e^{\lambda_j t} , \quad (2.125)$$

где $\lambda_{i,j}$ — корни характеристического уравнения $n+1$ степени, которая в форме определителя имеет вид

$$\begin{vmatrix} a_{1,1} - \lambda & a_{1,2} & \cdots & a_{1,n+1} \\ a_{2,1} & a_{2,2} - \lambda & \cdots & a_{2,n+1} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{n+1,1} & a_{n+1,2} & \cdots & a_{n+1,n+1} - \lambda \end{vmatrix} = 0 . \quad (2.126)$$

Важный вывод, который следует из данного рассмотрения, заключается в том, что в случае n промежуточных соединений число экспоненциальных членов, описывающих кинетику реакции, равно $n+1$. Таким образом, наблюдаемое число экспонент является критерием минимального числа промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

Так, для реакции с участием одного промежуточного соединения число экспоненциальных членов равно двум [см. (2.118) и (2.120)]. Экспериментально определенные величины времени релаксации ($-1/\lambda$) являются функциями всех констант скоростей элементарных реакций и равновесных концентраций реагентов. В математическом смысле аналогичная ситуация возникает при анализе колебательных спектров молекул, где вместо колебаний отдельных связей измеряют «нормальные» колебания, представляющие собой сложные функции отдельных частот. Анализ математических зависимостей, возникающих при решении систем уравнений, описывающих эти процессы, детально разработан Эйгеном [Eigen, Hammers, 1963].

Экспериментальные методы исследования релаксационной кинетики

При анализе механизмов ферментативных реакций наибольшее применение нашел метод «температурного скачка». Это определяется тем, что в настоящее время разработана достаточно простая и надежная аппаратура, позволяющая осуществить изменение температуры за несколько микросекунд, а также тем, что этот метод позволяет работать с небольшим объемом исследуемого раствора (до 0,1 мл), что весьма важно при исследовании реакций с ферментами. Метод «температурного скачка» удобно сочетается с чувствительной спектрофотометрической аппарату-

рой, что позволяет регистрировать весьма незначительные концентрации промежуточных соединений. Принципиальная схема установки «температурный скачок» приведена на рис. 2.48.

Обычно температурный скачок осуществляется за счет разряда высоковольтного конденсатора через раствор электролита в реакционной ячейке. Изменение температуры связано с теплоемкостью раствора, напряжением на конденсаторе и его емкостью соотношением

$$\Delta T + \frac{jCU^2}{2\rho C_p}, \quad (2.127)$$

где C — емкость конденсатора; U — напряжение; ρ — плотность раствора; C_p — удельная теплоемкость при постоянном давлении; j — постоянная ячейки.

Обычно с помощью этого метода поднимают температуру раствора на 2–10°C.

Время, в течение которого происходит изменение температуры, определяется емкостью конденсатора C и сопротивлением раствора в реакционной ячейке:

$$\tau = RC/2. \quad (2.128)$$

Поэтому в реакционную ячейку добавляют нейтральную соль с высокой концентрацией электролита, понижающего электрическое сопротивление раствора. Лучшие приборы позволяют получить необходимое изменение температуры за несколько микросекунд.

Для изучения реакций, имеющих необратимые стадии, в последнее время широко используется метод комбинации установки «остановленная струя» — «температурный скачок». Это позволяет изучать релаксационную кинетику стадий, предшествующих лимитирующей стадии. В установках этого типа после смешивания растворов и остановки струи происходит температурный скачок за счет разряда высоковольтного конденсатора. Температурный скачок может произойти в течение нескольких микросекунд после остановки струи.

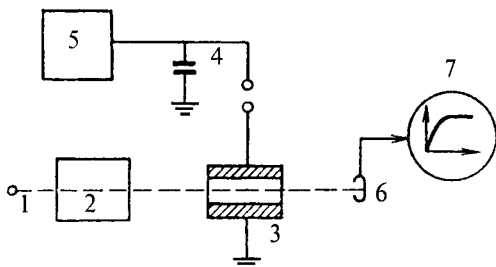


Рис. 2.48. Принципиальная схема метода «температурного скачка».

1 — источник света; 2 — монохроматор; 3 — ячейка с исследуемым раствором; 4 — высоковольтный конденсатор; 5 — блок питания разрядного устройства; 6 — фотоумножитель; 7 — осциллограф.

Другие возможности быстрого разогрева реакционной ячейки связаны с использованием микроволновой и лазерной техники. При помощи микроволнового импульсного генератора за 0,5–3 мкс ячейка объемом 25 мкл может быть нагрета на 3–10°C. Импульсный лазерный нагрев может существенно уменьшить «мертвое» время методики.

Внешнее влияние, возмущающее систему, может иметь разную физическую природу. В общем случае константа равновесия является функцией температуры, давления, электрического поля: $K = K(T_0, P_0, \varphi_0, \dots)$. Внешнее воздействие может изменять эти параметры: $T \rightarrow T_0 + \Delta T$, $P \rightarrow P_0 + \Delta P$, $\varphi \rightarrow \varphi_0 + \Delta\varphi$, что приводит к соответствующему изменению константы равновесия $K \rightarrow K_0 + \Delta K$. Это изменение связано с термодинамическими параметрами системы следующим уравнением:

$$\begin{aligned} \Delta K/K &= \Delta \ln K \approx (d \ln K / dT)_{P, \varphi} \Delta T + (d \ln K / dP)_{T, \varphi} \Delta P + (d \ln K / d\varphi)_{T, P} \Delta \varphi = \\ &= \Delta H / RT^2 \Delta T - \Delta V / RT + \Delta M / RT \Delta \varphi, \end{aligned} \quad (2.129)$$

где ΔH — стандартное изменение энтропии; ΔV — стандартное изменение объема; ΔM — изменение микроскопического электрического момента системы; R — газовая постоянная.

Поэтому, помимо рассмотренного выше быстрого изменения температуры (температурного скачка), внешним воздействием на систему может быть изменение давления (скачок давления, поглощение ультразвука) или электрического поля (метод электрического импульса).

Релаксационные методы, используемые для исследования быстрых химических реакций в растворе, имеют весьма высокую разрешающую способность. Так, например, метод поглощения ультразвука имеет разрешающую способность вплоть до наносекундного диапазона. Ниже приведены диапазоны времен релаксаций, которые могут быть проанализированы с использованием этих методов (табл. 2.10).

Таблица 2.10

Разрешающая способность релаксационных методов

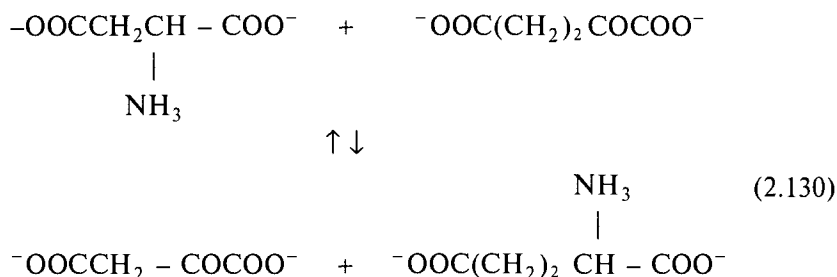
Метод	Разрешающая способность, с
Поглощение ультразвука	$10^{-6} - 10^{-10}$
Температурный скачок	$10^{-4} - 10^{-6}$
Метод электрического импульса	$10^{-4} - 10^{-6}$
Скачок давления	10^{-2}

Видно, что применение методов релаксационной кинетики позволяет исследовать процессы продолжительностью до 10^{-10} с. Именно поэтому релаксационная кинетика является в настоящее время мощным орудием в исследовании механизмов ферментативных реакций.

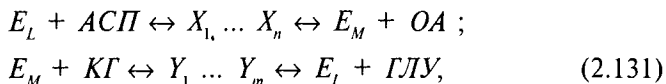
Аспаратаминотрансфераза, рибонуклеаза

Использование релаксационного подхода для изучения механизмов ферментативных реакций привело к выяснению детального постадийного механизма катализа рядом ферментов.

Рассмотрим проведенное Хаммесом исследование механизма катализа аспаратаминотрансферазой. Аспаратаминотрансфераза катализирует обратимую реакцию переноса аминогруппы между аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами с образованием щавелево-уксусной и глутаминовой кислот:



В качестве кофермента в этой реакции участвует пиридоксаль-фосфат, который в процессе реакции претерпевает существенные спектральные изменения, что обеспечивает удобный метод слежения за кинетикой реакции. В общих чертах механизм реакции заключается в переносе аминогруппы с аминокислоты на пиридоксальфосфат с образованием пиридоксаминфосфата и кетокислоты, после чего следует перенос аминогруппы к другой кетокислоте с образованием новой аминокислоты:



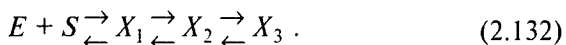
где E_L — фермент в форме пиридоксалья; E_M — фермент в форме пиридоксамина; $АСП$ — аспарагиновая кислота; $ОА$ — щавелево-уксусная кислота; $ГЛУ$ — глутаминовая кислота; $КГ$ — кетоглутаровая кислота; X_n , Y_m — промежуточные соединения реакций.

Изучение этой системы методом температурного скачка по-

зволило обнаружить в каждой из реакций (превращение аспарагиновой кислоты в шавелевоуксусную, кетоглутаровой — в глутаминовую) по крайней мере по два промежуточных соединения (при исследовании каждой реакции были обнаружены три времени релаксации, лежащие в интервале 50 мкс—20 мс).

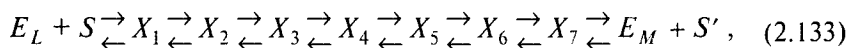
Были изучены зависимости времени релаксаций от концентрации субстратов и фермента и определены (или оценены) константы скорости, характеризующие отдельные стадии. Исследование спектральных характеристик промежуточных соединений показало, что они представляют собой, по-видимому, ковалентные соединения субстратов с пиридоксальфосфатом, включающие шиффовы основания.

Помимо изученных стадий, в реакциях аспартатаминотрансферазы наблюдали более быстрые спектральные изменения, кинетику которых нельзя было проанализировать при использовании методики температурного скачка. С целью замедления скорости этих реакций было исследовано взаимодействие с ферментом некоторых модифицированных субстратов. Аналог субстратов — L- α -метиласпарагиновая кислота — является конкурентным ингибитором аминокислотных субстратов. Она не способна образовывать альдимин с пиридоксальфосфатом на ферменте. Однако из-за наличия метильной группы в α -положении трансаминирование протекать не может. Кинетическое изучение этой системы комбинированным методом «остановленной струи» — «температурного скачка» обнаружило, что реакция протекает в три стадии:



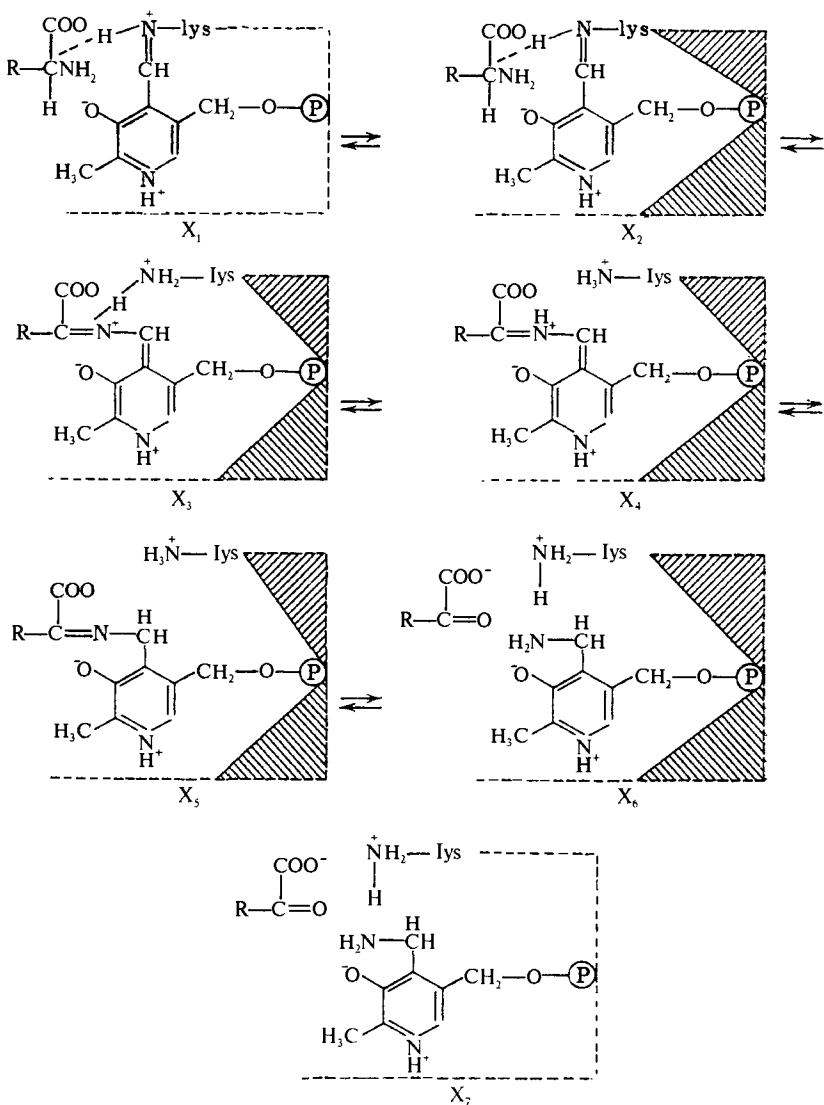
Были определены все константы скорости этого механизма и изучены спектральные свойства промежуточных соединений. Реакция включает образование первичного комплекса X_1 , за которым следует конформационное изменение ($X_1 \leftrightarrow X_2$) и образование альдимины X_3 .

Более детализированная картина фермент-субстратного взаимодействия была получена при исследовании модифицированных субстратов фермента. Изомер β -L-оксиаспарагиновой кислоты представляет собой субстрат фермента, однако реакция трансаминирования протекает очень медленно. При изучении реакции этого субстрата с аспартатаминотрансферазой было обнаружено восемь времен релаксаций. В соответствии с этим простейший механизм реакции включает семь промежуточных соединений и имеет вид



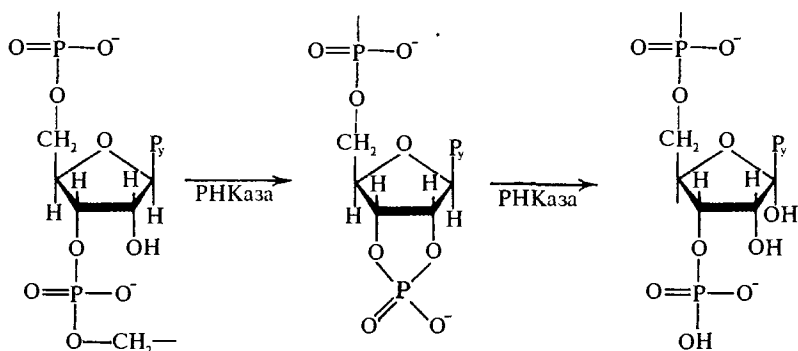
где S' — кетоформа субстрата.

Анализ зависимости времен релаксации и констант равновесий от концентраций позволил вычислить 14 из 16 кинетических констант, описывающих механизм (2.133). Кроме того, были определены спектральные характеристики промежуточных соединений. Эти данные позволили постулировать детальный механизм катализа ферментом:

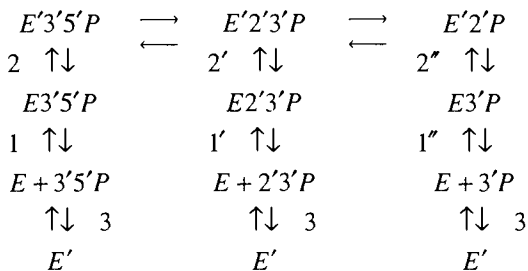


Первые три промежуточных соединения имеют спектральные характеристики, аналогичные соединениям X_1 , X_2 , X_3 (2.132) в реакции L- α -метиласпарагиновой кислоты, и реакция на этих стадиях, по-видимому, также заканчивается образованием альдимины (X_3). Промежуточное соединение X_4 имеет максимумы поглощения при 460 и 490 нм, причем молярное поглощение при 490 нм превышает $10^5 \cdot \text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Вероятно, это соединение имеет хиноидную структуру. Остальные три лабильные промежуточные соединения представляют собой кетимины.

Так же детально, как и механизм катализа аспаратаминотрансферазой, Хаммес изучил механизм действия рибонуклеазы А. Реакция, катализируемая этим ферментом, включает переэтерификацию 3',5'-динуклеотида с образованием циклического 2',3'-циклофосфата, после чего следует гидролиз циклического фосфата, с образованием 3'-нуклеотида.



При исследовании релаксационной кинетики использовали синтетические субстраты, что существенно упрощает кинетический анализ. На основе этих исследований был предложен «минимальный» механизм, представленный на схеме:



Для каждого класса субстратов (3',5'-динуклеотид, 2',3'-циклофосфат, 3'-нуклеотид) реакция включает бимолекулярную стадию образования первичного комплекса (стадии 1,1',1''), за которой следует его изомеризация (стадии 2,2',2''). Кроме того, исследование свободного фермента показало, что фермент существует в двух конформациях (стадия 3). Эти кинетические результаты были сопоставлены с данными рентгеноструктурного анализа, что позволило постулировать детальный механизм действия фермента.

Исследование механизмов действия аспартатаминотрансферазы и рибонуклеазы *A* прекрасно иллюстрирует возможности и достижения нестационарных кинетических методов при изучении механизмов ферментативного катализа.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите основные методы релаксационной кинетики. 2. Напишите уравнения релаксационной кинетики комплексообразования фермента с субстратом для случая одного промежуточного соединения, нескольких промежуточных соединений. 3. Какие экспериментальные методы релаксационной кинетики вы знаете? 4. Что такое спектр времени релаксации? 5. Как время релаксации связано с кинетическими константами скоростей элементарных стадий? 6. Каковы кинетические схемы катализа аспартатаминотрансферазой и рибонуклеазой?

2.6. Влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций

Влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций еще более непонятно в связи с тем, что количество разбитой посуды и число предшествующих праздников на скорость этих реакций заметного влияния не оказывают.

Шарль О'Тан

Влияние различных факторов на скорость химической реакции было рассмотрено в § 1.4. Однако влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций имеет ряд особенностей, связанных в первую очередь с многостадийностью ферментативных превращений. В настоящем параграфе описываются эти особенности.

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций

Зависимость кинетических и равновесных параметров ферментативных реакций от температуры

Влияние температуры на равновесные стадии ферментативной реакции не отличается от других химических реакций. Уравнение Вант-Гоффа зависимости равновесной константы от температуры для ферментативной реакции запишется так же, как и для любых других химических реакций:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

или

$$\frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (2.134)$$

Таким образом, график зависимости $(\ln K, 1/T)$ имеет тангенс угла наклона $-\Delta H/R$ (рис. 2.49). Следовательно, экспериментальные данные по температурной зависимости равновесия ферментативной реакции можно обрабатывать точно так же, как и обычных химических реакций.

Следует иметь в виду, что большинство определяемых в ферментативной кинетике констант имеет *эффективный характер* (см.

§ 2.1). Поэтому даже в тех случаях, когда изучаемая ферментативная реакция действительно протекает в равновесных условиях, равновесная константа, входящая в выражение (2.134), может носить эффективный характер и зависеть, например, от pH среды (см. ниже).

Кроме того, за счет многостадийности ферментативного процесса при одних температурах одна стадия может лимитировать скорость ферментативной реакции, а при других температурах — другая стадия. Поэтому температурные зависимости равновесной константы фермента-

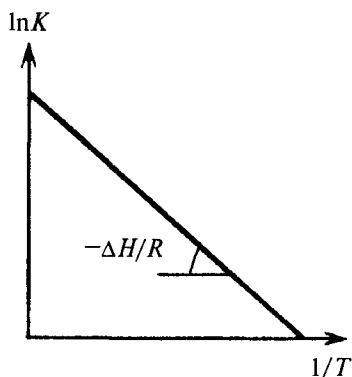


Рис. 2.49. Определение энтальпии ферментативной реакции по данным температурной зависимости равновесной константы.

тивной реакции достаточно часто не имеют линейного характера, изображенного на рис. 2.49.

Для скоростей ферментативных реакций характерно наличие «температурного оптимума» — диапазона температур, при которых скорость ферментативных реакций максимальна. Уменьшение температуры приводит к уменьшению скорости химической реакции за счет уменьшения доли молекул фермента и субстрата с высокой энергией, что соответствует обычной химической кинетике (см. § 1.4). Так как ферменты являются белковыми молекулами, то увеличение температуры приводит к их «плавлению», а затем и денатурации. Поэтому повышение температуры выше определенных значений вызывает обычно уменьшение скорости ферментативной реакции.

Таким образом, *скорость большинства ферментативных реакций колоколообразно зависит от температуры: при любом отклонении температуры от «температурного оптимума» наблюдается уменьшение скорости ферментативной реакции.* При низких температурах уменьшение скорости связано с уменьшением доли активных молекул, при высоких температурах — с конформационными изменениями ферментов.

Пример 2.7 [1]. Проводилось изучение нековалентного связывания аниона гидразония коричной кислоты с α -химотрипсином. Показано, что данное связывание зависит от степени ионизации фермента. Вычислить энтальпию ионизации на основании данных табл. 2.11.

Преобразуем выражение (2.134) следующим образом:

$$\frac{d \ln Ka}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = 2,3 \frac{d \lg Ka}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = 2,3 \frac{d pKa}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = - \frac{\Delta H}{R}.$$

Следовательно, график температурной зависимости константы ионизации α -химотрипсина в координатах ($pKa, 1/T$) имеет вид прямой с тангенсом угла наклона $\Delta H/2,3R$ (рис 2.50). Из графика определяем: $\Delta H = 22,4$ ккал/моль.

Пример 2.8 [1]. На основании данных табл. 2.12 определить значения стандартной энтальпии, энтропии активации для следующей схемы:

Таблица 2.11

Температурная зависимость константы ионизации α -химотрипсина (0,2 М NaCl, концентрация фермента $2 \cdot 10^{-2}$ М, концентрация коричной кислоты $1 \cdot 10^{-2}$ М)

$t, ^\circ\text{C}$	12	20	28	36
pKa	8,81	8,41	7,90	7,52

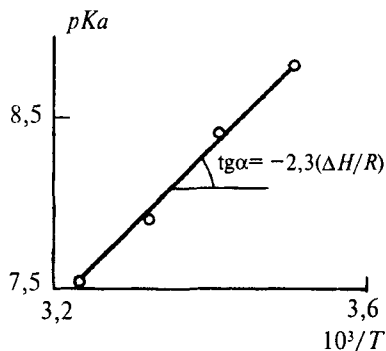


Рис. 2.50. Определение энтальпии ионизации α-химотрипсина.

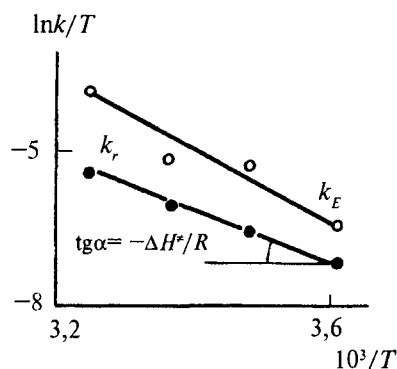
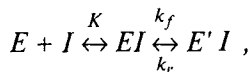


Рис. 2.51. Определение параметров температурной зависимости конформационных изменений α-химотрипсин-ингибиторного комплекса



где E — α-химотрипсин; E' — его изомер; I — ингибитор.

В соответствии с методами, рассмотренными в § 1.4, тангенс угла наклона температурных зависимостей констант скоростей в координатах $(\ln k/T, 1/T)$ равен $-\Delta H^*/R$ (рис. 2.51). Из графика находим: $\Delta H_f^* = 30,4$ ккал/моль, $\Delta H_r^* = 19,9$ ккал/моль.

Найдем свободную энергию процесса:

$$\Delta F = \Delta E^* = -RT \ln k.$$

Тогда энтропия равна:

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta E^*}{T}.$$

Следовательно, $\Delta S_f^* = 43,6$ э.е., $\Delta S_r^* = 6,2$ э.е.

Пример 2.9. В § 2–4, в пункте, посвященном изучению свойств ацилферментных интермедиатов α-химотрипсина, исследовали температурные зависимости констант скорости деацитилирования α-химотрипсина. На основании данных рис. 2.34 определить ΔH^* и ΔS^* для реакций

ацилферментов различных структуры.

Для решения этой задачи воспользуемся уравнением для константы скорости реакции теории переходного состояния (см. § 1.4):

Таблица 2.12

Влияние температуры на константы скоростей конформационных изменений α-химотрипсина

$t, ^\circ\text{C}$	k_r, c^{-1}	k_f, c^{-1}
20	0,48	0,23
25	1,51	0,42
28	1,78	0,48
36	6,67	1,34

$$k = \frac{k' T}{h} \exp\left[\frac{\Delta S^*}{R}\right] \exp\left[-\frac{\Delta H^*}{RT}\right].$$

Тогда по тангенсу угла наклона прямых в координатах $(\ln k, 1/T)$ определяем ΔH^* , по точке пересечения с осью ординат — ΔS^* . Найденные значения представлены в табл. 2.10 (см. § 2—4).

Изучение термодинамики конформационных изменений активных центров ферментов

Открытие явления обратного осмоса тепла в активных центрах ферментов (перенос тепла от менее подвижных участков полипептидной цепи к более подвижным) приписывают моему аспиранту Питеру Луту. Надеюсь, что Вы понимаете, что это открытие сделано мною. П.Лут оказался первым автором нашей статьи просто по алфавиту.

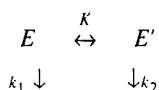
Шарль О'Тан

Вопросы приоритета в науке зачастую весьма спорны и условны. В 1775 г. Кулон открыл закон взаимодействия двух зарядов (закон Кулона). Он открыл закон Ома в 1826—1827 гг. Английским физиком и химиком Генри Кавендишем (1731—1810) эти законы были открыты существенно раньше (1771—1773 гг.) Это обнаружил в 1879 г. Максвелл, разбирая рукописи Генри Кавендиша. По мнению академика П.А. Капицы, Г. Кавендиш просто забыл отправить рукописи статей в печать.

Наука и жизнь

Изучение конформационных изменений в ферментах можно проводить на основании уравнения Вант-Гоффа для равновесия или уравнения Аррениуса для скоростей. Одним из подходов является метод инактивации ферментов под действием ультразвука. Рассмотрим этот метод на конкретном примере.

Пример 2.10 [1]. Схема инактивации α -химотрипсина под действием ультразвука выглядит следующим образом:



продукты инактивации фермента,

где E и E' — фермент и его изомер.

**Зависимость эффективной константы скорости инактивации
химотрипсина под действием ультразвука от температуры**

$t, ^\circ\text{C}$	15	20	23	26	28	32	35
$k_{\text{эфф}}, 10^2 \text{ мин}^{-1}$	2,20	1,85	1,50	4,10	5,90	8,30	8,20

На основании данных табл. 2.13 определить температуру и энтальпию конформационного перехода инактивации химотрипсина под действием ультразвука в предположении, что константы скоростей k_1 , k_2 практически не зависят от температуры.

Суммарная скорость реакции инактивации определяется как $v = k_1 E + k_2 E'$.

Используя уравнение материального баланса $E_0 = E' + E$, получаем:

$$V = k_{\text{эфф}} E_0;$$

$$V = k_{\text{эфф}} E_0; \quad k_{\text{эфф}} = \frac{k_1 + k_2 K}{1 + K}.$$

Продифференцировав полученное выражение по T , предполагая константы скоростей постоянными (так как конформационные изменения происходят в узком температурном диапазоне), получим

$$\frac{dk_{\text{эфф}}}{dT} = \frac{k_2 - k_1}{(1 + K)^2} \frac{dK}{dT}.$$

При температуре, соответствующей конформационному переходу, $K = 1$, что соответствует точке перегиба в координатах $(k_{\text{эфф}}, T)$. Тогда

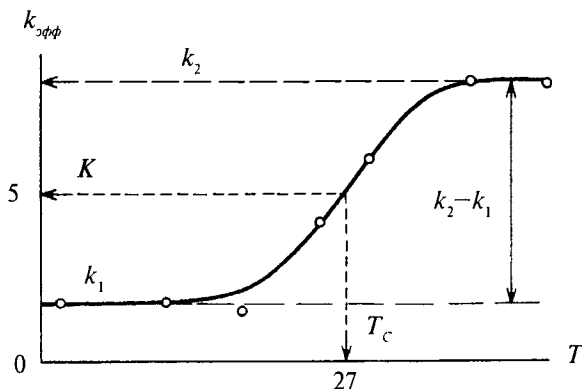


Рис. 2.52. Определение температуры конформационного перехода.

$$\frac{dk_{эфф}}{dT} = \frac{k_2 - k_1}{4} \frac{dK}{dT}.$$

Преобразуем уравнение Вант-Гоффа:

$$\Delta H = \frac{RT^2}{K} \frac{dK}{dT}.$$

Тогда

$$\Delta H = \frac{4RT_c^2}{k_2 - k_1} \left. \frac{dk_{эфф}}{dT} \right|_{T=T_c},$$

где T_c — температура конформационного перехода.

В соответствии с рис. 2.52 определяем: $T_c = 27^\circ\text{C}$, $\Delta H = 96,5$ ккал/моль.

Влияние pH на скорость ферментативных реакций

Все известные ферменты содержат ионогенные группы. Ионогенные группы входят в состав активных центров ферментов. За счет них осуществляется катализ и специфическое распознавание ферментом субстрата, они обеспечивают специфичность фермент-субстратного взаимодействия.

В эксперименте достаточно часто используется исследование pH-зависимостей ферментативных реакций для изучения числа и свойств ионогенных групп. Общие методы изучения pH-зависимостей соответствуют описанным в § 1.4. Рассмотрим специфические для ферментативной кинетики методы анализа pH-зависимостей.

Пример 2.11 [1]. На основании данных табл. 2.14 найти pK_a ионогенной группы химотрипсина, определяющей активность фермента.

В соответствии с методами, описанными в § 1.4, по точке перегиба зависимости ($k_{каж}$, pH) определяем $pK_a = 7,1$ (рис. 2.53).

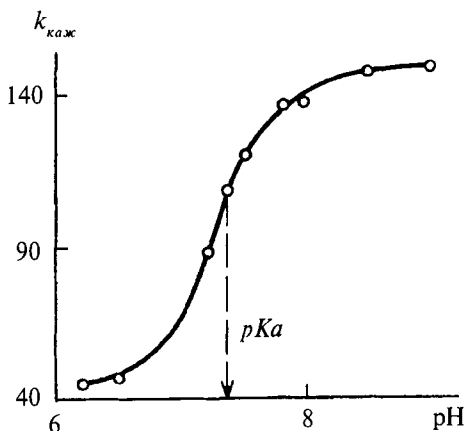


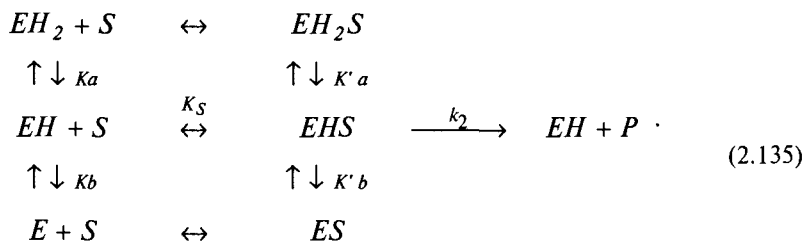
Рис. 2.53. Определение pK_a химотрипсина.

pH-зависимость скорости каталитической константы от скорости гидролиза этилового эфира N-ацетил-L-тирозина под действием химотрипсина

pH	6,2	6,5	7,0	7,5	7,8	8,0	8,5	9,0
$k_{кат}, c^{-1}$	46	48	95	120	137	139	148	150

pH-зависимость двухстадийной ферментативной реакции

Достаточно часто зависимость скорости ферментативной реакции от pH можно описать при помощи следующей схемы:



Обработка схем типа (2.135) сводится к определению доли активных форм фермента:

$$Ka = \frac{[EH][H^+]}{[EH_2]}; \quad K'a = \frac{[EHS][H^+]}{[EH_2S]};$$

$$Kb = \frac{[E][H^+]}{[EH_2]}; \quad K'b = \frac{[ES][H^+]}{[EHS]};$$

$$K_S = \frac{[ES][S]}{[EHS]};$$

$$[E]_0 = [E] + [EH] + [EH_2] + [ES] + [EHS] + [EH_2S];$$

$$v = k_2[EHS].$$

Общее уравнение скорости ферментативной реакции запишется следующим образом:

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{k_{\text{кат}}[E]_0[S]_0}{K_{m(\text{каз})} + [S]_0}; \\
 k_{\text{кат}} &= \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K'a} + \frac{K'b}{[H^+]}}; \\
 K_{m(\text{каз})} &= K_S \frac{1 + \frac{[H^+]}{Ka} + \frac{Kb}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'a} + \frac{K'b}{[H^+]}}.
 \end{aligned} \tag{2.136}$$

Пример 2.12 [1]. На основании данных табл. 2.15 определить константы ионизации ионогенных групп папаина в свободной форме фермента и в фермент-субстратном комплексе.

Как видно из (2.136), величина $k_{\text{кат}}$ отражает влияние pH на фермент-субстратный комплекс, а величина $k_{\text{кат}}/K_{m(\text{каз})}$ — на свободную форму фермента. В соответствии с этим

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{m(\text{каз})}} = \frac{k_2 / K_m}{1 + \frac{[H^+]}{Ka} + \frac{Kb}{[H^+]}}.$$

Таблица 2.15

**Влияние pH на скорость ферментативной реакции,
катализируемой папаином**

pH	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_{m(\text{каз})} \cdot 10^3 \text{ M}$
3,98	0,29	4,07
4,50	0,47	3,23
4,99	0,72	3,29
5,49	0,76	3,17
5,96	0,74	2,86
6,49	0,73	2,95
7,01	0,69	3,00
7,48	0,63	3,18
7,65	0,63	3,59
8,28	0,53	5,06
8,51	0,45	4,39
8,82	0,40	5,47
8,91	0,34	5,76
9,25	0,21	6,06

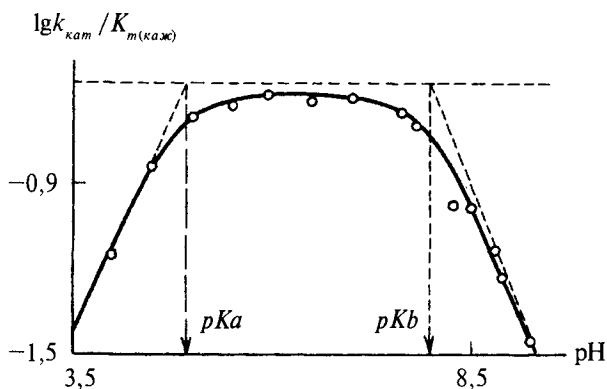


Рис. 2.54. Определение констант ионизации папаина.

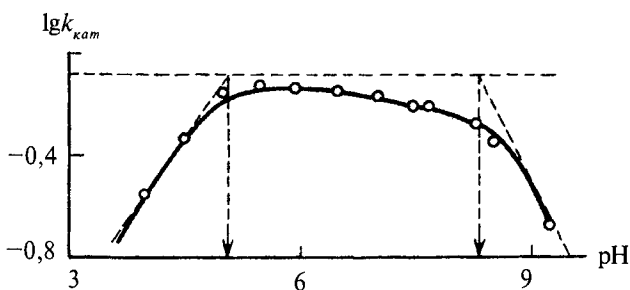


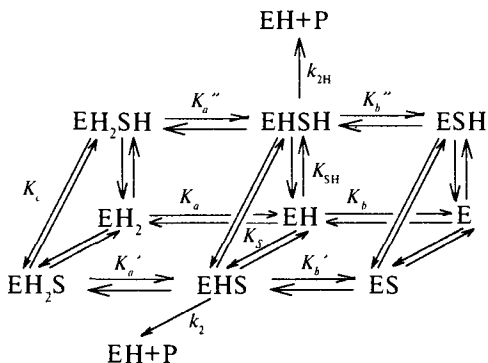
Рис. 2.55. Определение констант ионизации фермент-субстратного комплекса.

Тогда для определения pK_a и pK_b применим обычный способ (см. § 1.4). Построим график ($\lg k_{\text{кат}} / K_m (\text{с/сж}), \text{pH}$) и определим $pK_a=4,9$ и $pK_b=8,1$ (рис. 2.54). Следовательно, для свободного фермента $K_a = 2,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $K_b = 7,9 \cdot 10^{-9} \text{ M}$.

Для определения pK_a и pK_b фермент-субстратного комплекса построим график в координатах ($\lg k_{\text{кат}}, \text{pH}$) (рис. 2.55). Из графика определяем: $pK_a = 5$, $pK_b = 8,2$. Следовательно, в случае папаина фермент-субстратное взаимодействие не влияет на свойства ионогенных групп.

Определение параметров рН-зависимости ферментативной реакции в случае ионизации субстрата

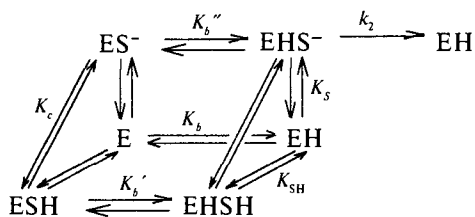
Процесс определения параметров рН-зависимостей сильно усложняется в тех случаях, когда ионогенные группы содержат не только фермент, но и субстрат. Подобные реакции описываются, например, в виде следующих схем:



Анализ подобных схем существенно упрощается за счет применения метода графов. Кроме того, анализ рН-зависимостей ферментативных реакций существенно упрощается, если каталитической активностью обладает лишь одна из форм фермента (субстрата).

Пример 2.13 [1]. Реакция гидролиза N-трифторацетил-L-фенилаланина катализируется пепсином. Известно, что гидролиз происходит только в том случае, когда активный центр фермента протонизирован, а субстрат находится в депротонизованном состоянии. На основании данных табл. 2.16 определить pK ионогенных групп субстрата и фермента.

Данной реакции соответствует следующая кинетическая схема:



С помощью метода графов можно показать, что в данном случае

$$\frac{k_{\text{кат}}}{K_{m(\text{каж})}} = \frac{k_2 / K_s}{\left(1 + \frac{Kb}{[H^+]}\right) \left(1 + \frac{[H^+]}{Kc}\right)}.$$

Аналогично предыдущему примеру определяем $pKb = 3,6$; $pKc = 2,9$ (рис. 2.56).

рН-зависимость ферментативной реакции (см. пример 2.13)

рН	$k_{кат}, c^{-1}$	$K_{т(каж)} \cdot 10^3 M$
1,70	2,4	6,6
2,25	6,0	5,9
2,80	14,3	8,0
3,05	26,8	14,0
3,35	34,1	16,6
3,60	31,7	15,5
4,05	21,7	21,6
4,50	15,8	28,6
4,65	13,1	29,0
5,40	5,5	81,8

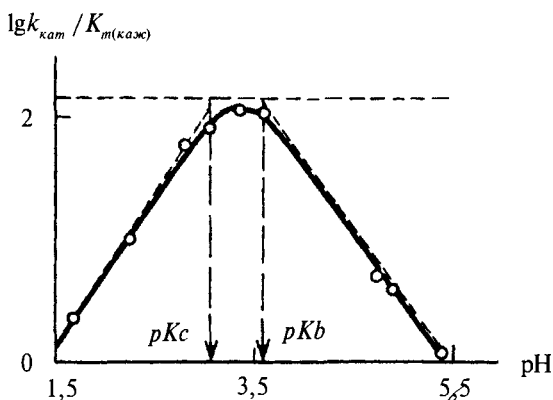


Рис. 2.56. Определение параметров рН-зависимости ферментативной реакции (см. пример 2.13).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные закономерности влияния температуры на скорость ферментативной реакции? 2. Как определяются pK ионогенных групп ферментов в свободном и связанном состоянии? 3. Каковы основные закономерности влияния рН на скорость ферментативной реакции? 4. Как определяются параметры рН-зависимости скорости ферментативной реакции в случае ионизации субстрата?

2.7. Ингибирование ферментативных реакций

Все ингибиторы, с которыми мне приходилось сталкиваться, не хотели работать так, как это указано в паспорте: в условиях ингибирования они проявляли активирующие свойства и наоборот. Поэтому во всех отчетах по работе с ингибиторами я просто менял знак эффекта. Думаю, что точно так же поступали многие мои коллеги.

Шарль О'Тан

Вещества, подавляющие каталитическую активность ферментов, называют *ингибиторами*. Взаимодействуя с активным центром фермента, ингибиторы по тому или иному механизму прерывают каталитический цикл, уменьшая скорость ферментативной реакции. Различают два основных класса ингибиторов — *обратимые* и *необратимые*. Необратимые ингибиторы иногда называют *инактиваторами*. Часто ингибиторы ферментов — сильные яды или лекарственные препараты.

Примером необратимого ингибирования являются фосфоорганические соединения, используемые в качестве пестицидов или боевых отравляющих веществ (зарин, зоман, VX). Фосфорелируя активный центр ацетилхолинэстеразы, соединения этого класса образуют прочные химические инертные соединения, блокируя центральную нервную систему животного, человека или насекомого. Классическим примером обратимого ингибитора является цианид-ион или окись углерода, взаимодействующие с гем-содержащими ферментами или переносчиками кислорода. Образую комплексы с гем-белками, эти соединения обратимо выводят их из биохимических процессов.

Первый вопрос, который требует решения при наблюдении подавления ферментативной активности, заключается в том, обратим или необратим эффект ингибирования. Экспериментально на этот вопрос ответить достаточно просто. Необходимо вывести из системы ингибитор, например, диализом или гель-фильтрацией. Если фермент восстановил каталитическую активность, то это — обратимый ингибитор, если активность фермента подавлена — ингибирование необратимо.

Рассмотрим кинетические закономерности необратимого и обратимого ингибирования. В качестве иллюстрации будут использованы данные по ингибированию простагландин-Н-синтетазы широко известными и применяемыми лекарственными средствами.

Необратимое ингибирование

Кинетическую схему необратимого ингибирования можно представить в виде



При ингибировании происходит реакция второго порядка между активным центром E и ингибитором I с образованием ферментативного неактивного производного EI .

Рассмотрим, что происходит при принятии таблетки ацетилсалициловой кислоты (аспирина). С начала века в мире использовали более 320 миллиардов таблеток аспирина. Это самое популярное лекарство получено впервые в 1897 г.

Аспирин — медленный необратимый ингибитор (инактиватор) PGH-синтетазы

При добавлении к раствору PGH-синтетазы ацетилсалициловой кислоты наблюдается медленная потеря активности фермента в реакции окисления арахидоновой кислоты в PGH_2 . Скорость инактивации фермента увеличивается с ростом концентрации аспирина. Типичные наблюдаемые зависимости активности PGH-синтетазы от времени для фермента в микросомной фракции везикулярных желез барана представлены на рис. 2.57. Аналогичные зависимости наблюдаются для фермента из тромбоцитов

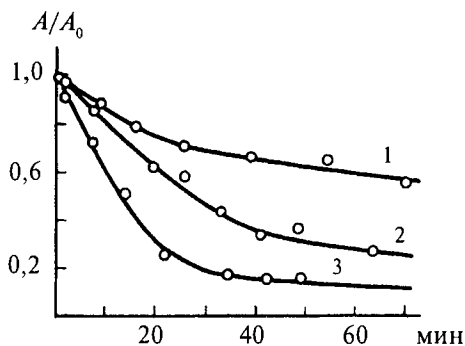


Рис. 2.57. Кинетика изменения активности PGH-синтетазы при инкубировании фермента в растворах аспирина разной концентрации (мМ).

1 — 0,81; 2 — 2,35; 3 — 4,36. Условия: 37°C; 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; этанол — 1,7%; твин-20 — 0,1%. PGH-синтетазу выделяли из везикулярных желез барана (микросомная фракция).

человека. Процесс инактивации фермента необратим. Существенное уменьшение концентрации ингибитора в среде путем разбавления реакционной смеси не приводит к появлению активности фермента. Инактивацию фермента нельзя объяснить его денатурацией, поскольку в контрольном опыте в отсутствие аспирина фермент полностью сохраняет свою активность. Простейший механизм потери активности дан схемой (2.137).

В условиях избытка ингибитора по сравнению с концентрацией активных центров фермента (при использовании нестероидных противовоспалительных соединений это соотношение всегда имеет место) кинетику изменения концент-

рации активного фермента во времени будут описывать следующие уравнения:

$$E_0 = E + EI, \text{ т.е. } \frac{dE}{dt} = \frac{dEI}{dt}$$

$$\frac{dEI}{dt} = \frac{dE}{dt} = kI_0 E \quad \text{или} \quad \frac{d \ln E}{dt} = -kI_0,$$

где I_0 — концентрация ингибитора, взятого в большом избытке.

Решение этого уравнения при начальных условиях $t = 0$, $E = E_0$ имеет вид

$$E = E_0 \exp[-kI_0 t] \quad (2.138)$$

где E_0 — начальная концентрация активных центров; I_0 — начальная и постоянная концентрация ингибитора ($I_0 \gg E_0$).

Поскольку измеряемая на опыте активность PGH-синтетазы линейно зависит от концентрации фермента, по тому же закону должна меняться и активность катализатора.

Экспериментальные данные рис. 2.58 показывают, что эта зависимость при ингибировании аспирином действительно имеет место. Кинетические кривые описываются уравнением первого порядка, при этом показатель экспоненты линейно зависит от концентрации ингибитора (рис. 2.58б). Тангенс угла наклона этой зависимости позволяет определить константу скорости необратимого взаимодействия аспирина с активным центром фермента. Видно, что необратимая инактивация PGH-синтетазы аспирином — сравнительно медленный процесс.

Соответствие кинетики инактивации фермента уравнению первого порядка в условиях избытка ингибитора указывает на то, что реакция между активным центром фермента и аспирином действительно протекает в стехиометрическом соотношении 1:1.

Аспирин необратимо реагирует с PGH-синтетазой с переносом ациль-

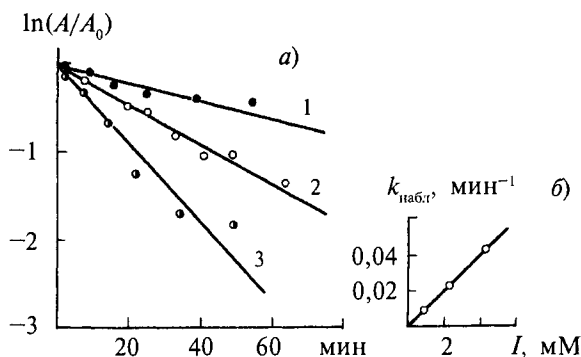


Рис. 2.58. Линеаризация данных рис. 2.57 в полулогарифмических координатах (а); концентрация аспирина (мМ) (б).

1 — 0,81; 2 — 2,35; 3 — 4,36. б — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка от концентрации аспирина.

ной группы на белок, ацетилируя гидроксильную группу серина 514, расположенную в локусе адсорбции арахидоновой кислоты.

Обратимое ингибирование. Индометацин и вольтарен — медленные, обратимые ингибиторы PGH-синтетазы

Инкубация PGH-синтетазы с индометацином, как и в случае с аспиринном, приводит к потере ферментом его активности. Этот процесс также развивается во времени (рис. 2.59). Принципиальное отличие механизмов действия этих лекарственных препаратов заключается в том, что индометацин представляет собой обратимый ингибитор PGH-синтетазы. Этот вывод следует из двух серий экспериментов.

1. Обратимость взаимодействия индометацина с PGH-синтетазой вытекает из того, что после отделения ингибитора от фермента активность PGH-синтетазы восстанавливается. Так, PGH-синтетазу микросомной фракции тромбоцитов человека обрабатывали индометацином в концентрации $7,5 \cdot 10^{-6}$ М в течение 40 мин. Остаточная активность фермента в результате такой обработки составляла 28%. Однако после отделения микросом от раствора центрифугированием ($105\,000\text{ г}$; 1,5 ч) и промывки их буферным раствором активность фермента восстанавливалась практически полностью (95% от исходной).

PGH-синтетазу из везикулярных желез иммобилизовали на ДЭАЭ-сефадексе. В результате обработки иммобилизованного фермента раствором $2,6 \cdot 10^{-5}$ М индометацина в течение часа активность фермента падала до 23%, после отфильтровывания иммобилизованного фермента и промывки его буферным раствором активность фермента увеличивалась и составляла 80% от исходной. Из этих данных следует, что взаимодействие PGH-синтетазы с индометацином имеет обратимый характер.

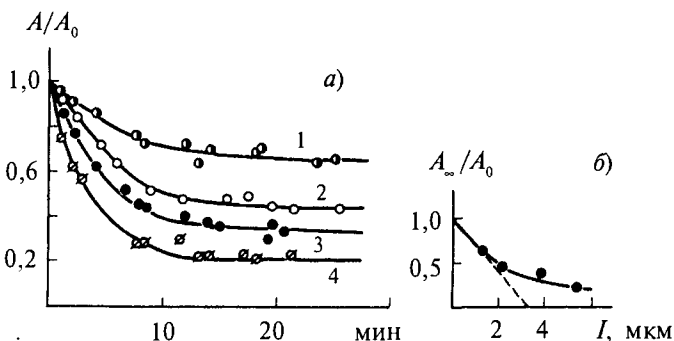


Рис. 2.59. *a* — кинетические кривые изменения активности PGH-синтетазы из везикулярных желез барана при инкубации фермента в растворах индометацина разной концентрации (мкМ). 1 — 1,4; 2 — 2,2; 3 — 3,8; 4 — 5,4. Условия: 32°C ; 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; этанол — 1,7%; твин-20 — 0,1%; *б* — зависимость относительной предельной активности фермента от концентрации индометацина.

2. Кинетические измерения показали, что PGN-синтетаза с индометацином взаимодействует по схеме



На рис. 2.59 приведены кинетические кривые изменения активности PGN-синтетазы в процессе инкубации фермента с индометацином. При бесконечном времени кинетические кривые «запределиваются» и не выходят на нулевую активность. Такого рода зависимости могут наблюдаться в одном из двух случаев: а) при обратимости реакции; б) при необратимости процесса в условиях соизмеримости концентраций активных центров и ингибитора.

Рассмотрим особенности кинетики процесса для обоих случаев. Для необратимой инактивации при соизмеримости I_0 и E_0 справедливо соотношение

$$\frac{E_0(I_0 - EI)}{I_0(E_0 - EI)} = e^{-k(E_0 - I_0)t}.$$

Если $E_0 > I_0$ (критерий сохранения остаточной активности фермента при бесконечном времени), при $t \rightarrow \infty$ имеют место условия: $E_0 I / I_0 \cdot E \rightarrow 0$ или $I \rightarrow 0$, при которых концентрация соединения EI равна I_0 . Из уравнения материального баланса следует:

$$E_{\infty} = E_0 - I_0,$$

или

$$\frac{EI}{E_0} = 1 - \frac{I_0}{E_0},$$

где E_{∞} — остаточная предельная концентрация фермента.

Из этого соотношения при пропорциональности активности концентрации фермента следует, что для необратимой инактивации при $I_0 \sim E_0$ относительная активность фермента должна линейно падать с ростом концентрации ингибитора. Зависимость предельной относительной активности от концентрации ингибитора приведена на рис. 2.59б, из которого видно, что это уравнение (пунктирная линия) не описывает существующей зависимости.

Кинетические данные согласуются со схемой (2.139), согласно которой индометацин представляет собой медленный обратимый ингибитор PGN-синтетазы. В соответствии с этой схемой изменение концентрации комплекса «фермент–ингибитор» во времени должно быть представлено уравнением

$$EI = \frac{k_1 E_0 I_0}{k_1 I_0 + k_{-1}} \left(1 - e^{-[k_1 I_0 + k_{-1}]t} \right), \quad (2.140)$$

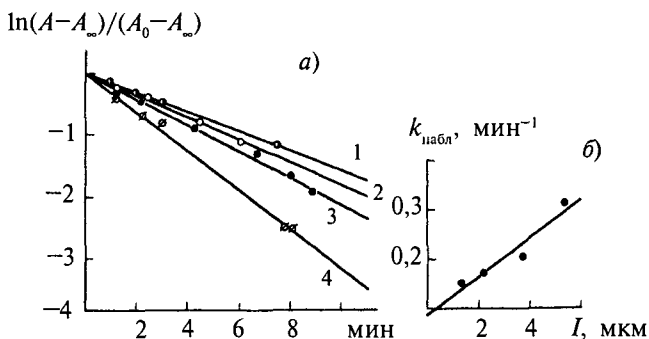


Рис. 2.60. Линеаризация данных рис. 2.59, *а* по ингибированию PGN-синтетазы индометацином. Концентрация ингибитора (мкМ).

1 — 1,4; 2 — 2,2; 3 — 3,8; 4 — 5,4; *б* — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка от концентрации индометацина.

а относительное изменение активности — уравнением

$$\frac{A(t)}{A_0} = 1 - \frac{k_1 I_0}{k_1 I_0 + k_{-1}} \left(1 - e^{-[k_1 I_0 + k_{-1}]t} \right), \quad (2.141)$$

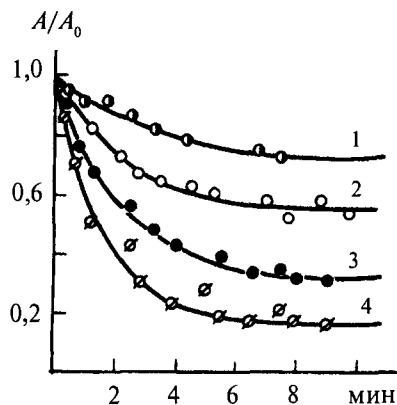


Рис. 2.61. Кинетические кривые изменения активности PGN-синтетазы при инкубации фермента с вольтареном при концентрациях (мкМ).

1 — 0,86; 2 — 1,54; 3 — 2,81; 4 — 4,25. Условия: PGN-синтетаза в микросомах из везикулярных желез барана; 32°C; 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; этанол — 1,6%; твин-20 — 0,1%.

Рис. 2.60*а* и *б* иллюстрирует соответствие экспериментальных данных, рассчитанных по уравнению (2.141). Зависимость обратного наблюдаемого характеристического времени представлена линейной функцией концентрации ингибитора, из которой следуют константы скорости прямой и обратной реакции и соответственно константа равновесия образования комплекса.

Аналогично индометацину ведет себя в реакции ингибирования PGN-синтетазы вольтарен. На рис. 2.61 приведены кинетические кривые падения активности фермента при различных концентрациях вольтарена. Спрямление кинетических кривых в координатах уравнения (2.141) представлено на 2.62.

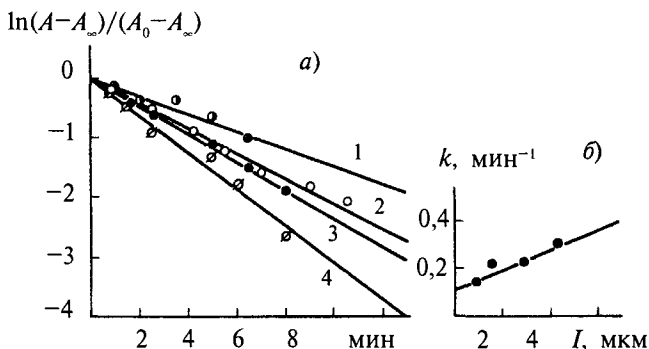


Рис. 2.62. Линеаризация данных рис 2.61 по ингибированию PGH-синтазы вольтареном (а) и концентрация вольтарена (мкМ) (б).

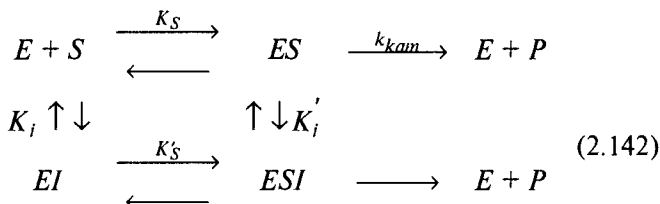
1 — 0,86; 2 — 1,54; 3 — 2,81; 4 — 4,25; б — зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации первого порядка от концентрации вольтарена.

На этом же рисунке (б) дана зависимость обратного характеристического времени от концентрации ингибитора, из которой найдены константы скорости прямой и обратной реакции взаимодействия вольтарена с активным центром фермента (сравни рис. 2.59, 2.60, 2.61 и 2.62).

Индометацин и вольтарен относительно медленно взаимодействуют с активным центром PGH-синтазы. Процесс установления равновесия занимает более 10 мин.

Обратимое ингибирование односубстратных реакций

«Классическая» кинетическая схема обратимого ингибирования односубстратных реакций имеет вид



Равновесные процессы образования ES , EI и ESI определяются тремя константами K_S , K_i и α . Это следует из простых термодинамических соображений. Процесс перехода от E к ESI в равновесном режиме не зависит от пути перехода. Таким образом, $K_S \alpha K_i = K_i K'_S$ или $K'_S = \alpha K_S$. Эта схема подробно рассмотрена в литературе.

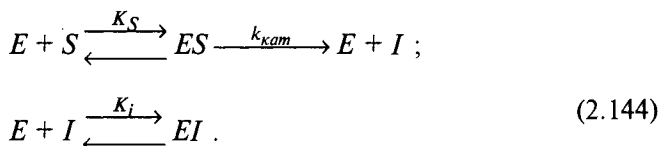
Начальная стационарная скорость процесса будет дана уравнением

$$v_0 = \frac{k_{\text{кат}} \frac{\alpha K_i + \beta I}{\alpha K_i + I} E_0 S_0}{\alpha K_S \frac{K_i + I}{\alpha K_i + I} + S_0} . \quad (2.143)$$

В зависимости от численных значений α и β могут иметь место несколько «классических» вариантов ингибирования.

1. Полное конкурентное ингибирование

При $\alpha \rightarrow \infty$ тройной комплекс фактически не образуется. Схема реакции существенно упрощается:



Скорость реакции имеет вид

$$v_0 = \frac{k E_0 S_0}{K_S \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S_0} . \quad (2.145)$$

Видно, что ингибитор влияет на наблюдаемую константу Михаэлиса и не влияет на v_{max} или $k_{\text{кат}}$. В двойных обратных координатах серия экспериментальных кривых, полученных при различных концентрациях субстрата и ингибитора, будет представлена пучком прямых, пересекающихся в точке $1/v_{\text{max}}$ (рис. 2.63).

Для идентификации механизма ингибирования и определения константы ингибирования часто применяют метод Диксона, откладывая значение $1/v_0$ от I_0 при различных S_0 (рис. 2.64):

2. Полное неконкурентное ингибирование

При $\alpha = 1$, $\beta = 0$, т.е. когда ингибитор связывается с фермент-субстратным комплексом так же эффективно, как и со свободным активным центром, но комплексообразование приводит к потере реакционной способности, имеем

$$v_0 = \frac{\frac{k_{\text{кат}}}{1 + I/K_i} E_0 S_0}{K_m + S_0} . \quad (2.146)$$

Ингибитор влияет на максимальную скорость реакции, но не

влияет на константу Михаэлиса. В двойных обратных координатах будет иметь место серия прямых, пересекающихся на оси $1/S_0$ (рис. 2.65). Соответственно в координатах Диксона $1/v_0$ от I_0 будем иметь семейство параллельных прямых (рис. 2.66).

3. Бесконкурентное ингибирование

Выделяют также случай, когда $\alpha = \beta$, $\alpha, \beta < 1$. В этом случае максимальная скорость и константа Михаэлиса при увеличении концентрации эффектора уменьшаются в равной степени:

$$v_0 = \frac{\alpha k_{\text{кат}} \frac{K_i + I}{\alpha K_i + I} E_0 S_0}{K_m \frac{K_i + I}{\alpha K_i + I} + S_0} \quad (2.147)$$

В двойных обратных координатах экспериментальные данные будут представлены серией параллельных непересекающихся прямых (рис. 2.67).

Бруфен, напроксен, бутадион, анальгин — быстрые обратимые ингибиторы РGH-синтетазы

Исследование ряда нестероидных противовоспалительных препаратов показало, что они являются быстросействующими и обратимыми ингибиторами исследуемого фермента. При добавлении их к раствору фермента можно наблюдать быстрое подавление активности катализатора, которое постоянно во времени (рис. 2.68). Этот класс ингибиторов изучен в рамках известных подходов к исследованию влияния их на скорость ферментативной реакции в присутствии субстратов [Варфоломеев, Мевх и др., 1985].

Как известно, в реакции, катализируемой РGH-синтетазой, принимают

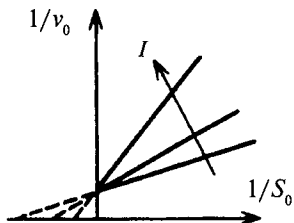


Рис. 2.63. Полное конкурентное ингибирование в двойных обратных координатах.

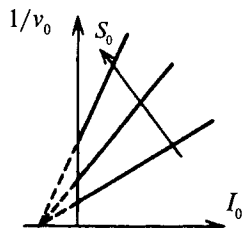


Рис. 2.64. Полное конкурентное ингибирование в координатах Диксона.

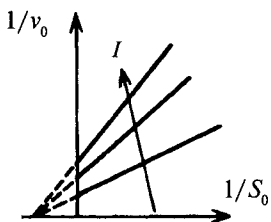


Рис. 2.65. Полное неконкурентное ингибирование в двойных обратных координатах.

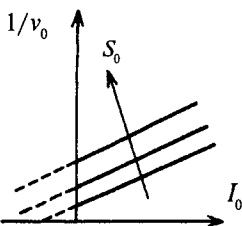


Рис. 2.66. Полное неконкурентное ингибирование в координатах Диксона.

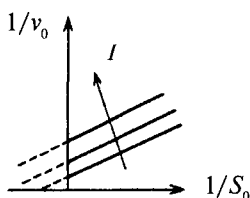


Рис. 2.67. Бесконкурентное ингибирование в двойных обратных координатах.

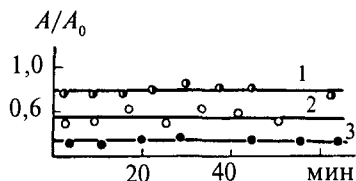


Рис. 2.68. Изменение во времени активности PGH-синтетазы при инкубации фермента (микросомная фракция везикулярных желез) с бутадиионом (мМ).

1 — 0,62; 2 — 3,4; 3 — 4,2. Условия: 32°C; 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; этанол — 1,6%; твин-20 — 0,1%.

участие такие субстраты, как арахидоновая кислота, кислород и восстановитель — донор электронов. На рис. 2.69 приведены зависимости скорости реакции от концентрации арахидоновой кислоты и адреналина при различных концентрациях бругфена.

Аналогичные зависимости представлены для напрокссена на рис. 2.70. Изучение бутадииона и аналъгина показало, что они являются также обратимыми ингибиторами PGH-синтетазы, однако эффективности ингибирования для бутадииона и аналъгина несколько ниже, чем для бругфена и напрокссена. Экспериментально наблюдаемые зависимости скорости реакций от концентрации арахидоновой кислоты при различных концентрациях ингибиторов для бутадииона и аналъгина приведены на рис. 2.71 а и б соответственно.

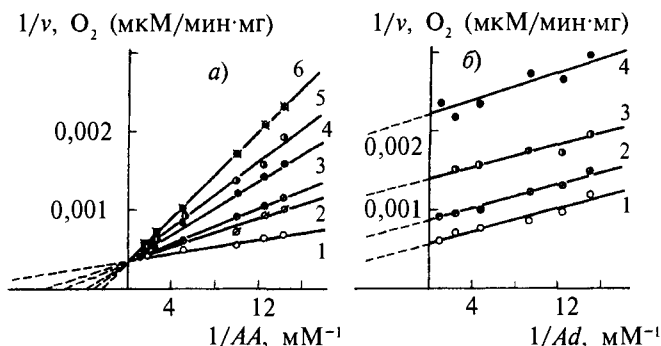


Рис. 2.69. Зависимость скорости PGH-синтетазной реакции (микросомная фракция везикулярных желез) от концентрации арахидоновой кислоты (а) и адреналина (б) в обратных координатах при различных концентрациях бругфена (мкМ).

(а) 1 — 0; 2 — 8; 3 — 15; 4 — 25; 5 — 35; 6 — 50; (б) 1 — 0; 2 — 25; 3 — 50; 4 — 126. Условия: 32°C; 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; этанол — 1,6%; твин-20 — 0,1%; гемин — 1,8 мкМ; адреналин — 1.1 мМ (а); арахидоноовая кислота — 73.5 мкМ (б).

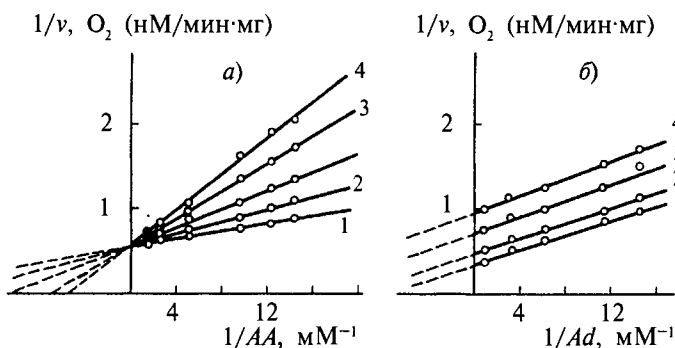


Рис. 2.70. Зависимость скорости PGH-синтетазной реакции (микросомная фракция везикулярных желез) от концентрации арахидоновой кислоты (а) и адреналина (б) в обратных координатах при различных концентрациях напроксена (мкМ).

(а) 1 — 0; 2 — 3,7; 3 — 17,3; 4 — 27,7; 5 — 43,3; (б) 1 — 0; 2 — 65; 3 — 130; 4 — 217. Условия: 32°C; 20 мМ фосфатный буфер, рН 7,2; этанол — 1,6%; твин-20 — 0,1%; гемин — 1,8 мкМ; адреналин — 1,1 мМ (а), арахидоновая кислота — 625 мкМ (б).

С формально-кинетической точки зрения указанные ингибиторы (бруфен, напроксен, бутадиион, анальгин) выступают в качестве конкурентных ингибиторов по отношению к арахидоновой кислоте и бесконкурентных — по отношению к донору электронов. Эти эффекты ингибирования для многосубстратной реакции рассмотрены ниже.

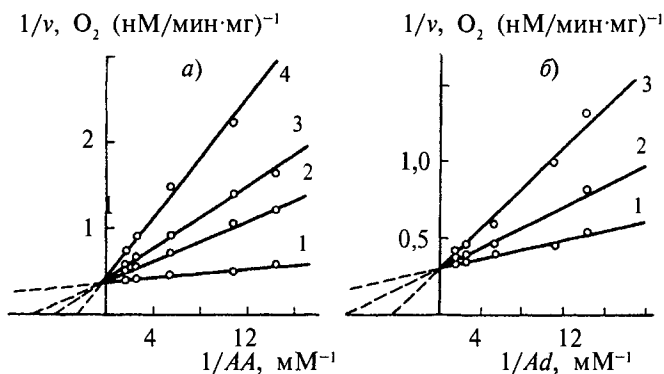


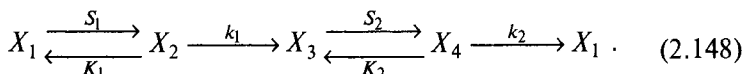
Рис. 2.71. Зависимость скорости PGH-синтетазной реакции (микросомная фракция везикулярных желез) от концентрации арахидоновой кислоты в обратных координатах (а) при различных концентрациях бутадииона, (б) при различных концентрациях анальгина (мМ).

1 — 0; 2 — 0,45; 3 — 0,9; 4 — 1,58. Условия: 32°C; 20 мМ фосфатный буфер рН 7,2; этанол — 1,6%; твин-20 — 0,1%; гемин — 1,8 мкМ; адреналин — 1,1 мМ.

Обратимое ингибирование многосубстратных ферментативных реакций

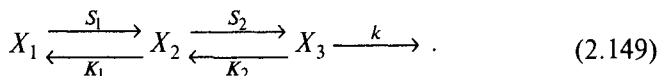
Многосубстратная природа реакций должна весьма специфично отражаться в кинетике ингибирования, и для многосубстратных реакций должны существовать особые закономерности ингибирования. Рассмотрим эти закономерности для упорядоченных механизмов реакций.

Как было показано ранее, механизмы двусубстратных ферментативных реакций можно разбить на два класса, принципиально различающихся по зависимости скорости реакции от концентрации обоих субстратов. Первый класс составляют процессы, уравнения скорости для которых не содержат произведения концентраций двух субстратов. Механизмы этих реакций получили название механизмов с немумплицирующими субстратами. Установлено, что необходимым условием для реализации данного типа механизма является наличие по крайней мере одной необратимой стадии между двумя пунктами ввода субстратов в механизм превращения. Простейшую каноническую схему такой реакции можно представить в виде



Для простоты примем, что стадии ввода субстратов являются обратимыми и быстрыми и могут быть охарактеризованы константами равновесия (комплексы субстратов с активными центрами ферментов).

Второй класс реакций образуют процессы, уравнения скорости для которых включают произведение концентраций субстратов. Это реакции с так называемыми мультиплицирующими субстратами; необходимым условием реализации таких реакций является обратимость всех стадий между двумя точками ввода двух различных субстратов. Простейшая каноническая схема для механизма с мультиплицирующими субстратами имеет вид



Предполагается, что стадии ввода субстратов обратимы, быстрые и характеризуются константами равновесия K_1 и K_2 .

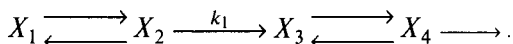
Рассмотрим зависимости скорости от концентрации обоих субстратов и концентрации обратимого ингибитора для механизмов обоих классов. Очевидно, что ингибитор может взаимодействовать со свободной формой фермента X_1 или с различными интермедиатами фермент-субстратных превращений.

Немультиплицирующие субстраты. Кинетические закономерности ингибирования двусубстратной реакции с немумультиплицирующим механизмом наиболее полно рассмотрены в монографии [Варфоломеева С.Д., Мевх А.Т. «Простагландины — молекулярные биорегуляторы». МГУ, 1985]. Приведены кинетические схемы взаимодействия ингибитора с ферментом, уравнение стационарной скорости реакции в обратной форме, а также координаты точки пересечения прямых зависимости $1/v$ от $1/S_1$ или от $1/S_2$ при различных концентрациях ингибитора (если такая точка пересечения существует). Рассмотрены механизмы, по которым ингибитор взаимодействует с одной из форм активного центра (X_1 , X_2 , X_3 , X_4), с какими-либо двумя-тремя формами либо со всеми четырьмя состояниями активного центра.

Вариация стадий взаимодействия ингибиторов с интермедиатами ферментативной реакции приводит к 14 различным механизмам.

При экспериментальном изучении зависимости скорости реакции от концентрации субстратов и ингибиторов механизмы реакций можно в значительной степени дискриминировать. Анализ показывает, что все представленные механизмы приводят к шести различным вариантам зависимостей скорости от концентрации первого или второго субстрата при различных концентрациях ингибиторов.

Рассмотрим некоторые примеры для схемы



1. Ингибитор взаимодействует со свободной формой фермента X_1 или с интермедиатом X_3 :

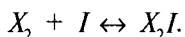


Уравнение скорости в обратных координатах

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} . \quad (2.150')$$

Такого же рода зависимости будут наблюдаться, если ингибитор взаимодействует с интермедиатом X_3 (рис. 2.72, 2.73).

2. Ингибитор взаимодействует с интермедиатом X_2 или X_4



Уравнение скорости в двойных обратных координатах

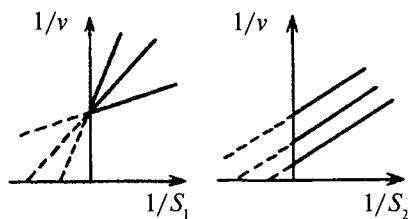


Рис. 2.72. Немультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует со свободной формой фермента X_1 .

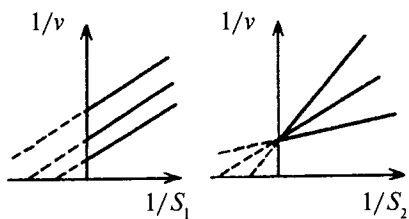


Рис. 2.73. Немультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует с интермедиатом X_3 .

$$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1}{k_1 S_1} + \frac{1}{k_2} + \frac{K_2}{k_2 S_2} + \frac{1}{K_1} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right). \quad (2.151)$$

Как по первому, так и по второму субстрату зависимости представлены серией параллельных непересекающихся прямых. Аналогичная картина будет иметь место, если ингибитор взаимодействует с формой X_4 или одновременно с X_2 и X_4 (рис. 2.74).

3. Более сложные зависимости будут наблюдаться, если ингибитор взаимодействует с двумя формами. Например, при блокировании катализа через интермедиаты X_2 и X_3 или X_1 , X_2 , X_3 картина ингибирования представлена на рис. 2.75.

Уравнение скорости будет иметь вид

$$\frac{E_0}{v_0} = \frac{K_1}{k_1 S_1} \left(1 + \frac{I}{K_i^{(1)}} \right) + \frac{1}{k_1} + \frac{K_2}{k_2 S_2} \left(1 + \frac{I}{K_i^{(2)}} \right) + \frac{1}{k_2}. \quad (2.152)$$

То есть результатом будет серия прямых, пересекающихся в верхнем левом квадранте.

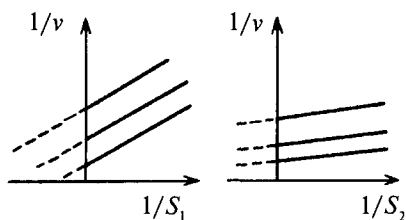


Рис. 2.74. Немультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует с интермедиатом X_2 .

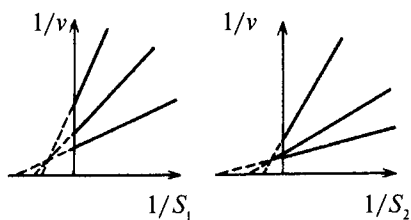


Рис. 2.75. Немультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует с интермедиатами X_2 и X_3 или X_1 , X_2 , X_3 .

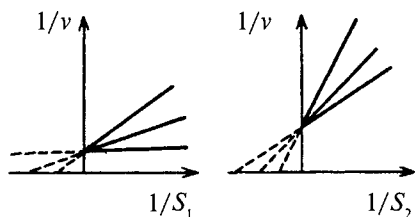


Рис. 2.76. Мультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует со свободной формой фермента X_1 .

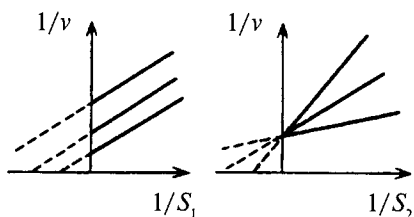


Рис. 2.77. Мультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует с формой X_2 .

Мультиплицирующие субстраты. Данному случаю соответствует следующая схема:



1. Если ингибитор взаимодействует с формой X_1 (свободной формой), скорость дается уравнением

$$X_1 + I \xrightleftharpoons{K_i} X_1 I ;$$

$$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k_1 S_1 S_2} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{K_2}{k S_2} + \frac{1}{K} . \quad (2.153)$$

Серия прямых по обоим субстратам пересекаются на оси $1/v$ (рис. 2.76).

При этом ингибитор конкурентен по обоим субстратам.

2. Ингибитор взаимодействует с формой X_2 (рис. 2.77):

$$X_2 + I \xrightleftharpoons{K_i} X_2 I ;$$

$$\frac{E_0}{v} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} + \frac{K_2}{k S_2} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + \frac{1}{K} . \quad (2.154)$$

3. Ингибитор взаимодействует только с тройным комплексом $ES_1 S_2$ (X_3) (рис. 2.78):

$$\frac{E_0}{n} = \frac{K_1 K_2}{k S_1 S_2} + \frac{K_2}{k S_2} + \frac{1}{K} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) . \quad (2.155)$$

При взаимодействии ингибитора с двумя или тремя формами могут иметь место более сложные случаи.

Для каждого механизма ингибирования характерен свой собственный вид зависимости скорости от концентрации субстра-

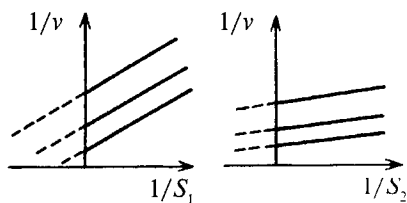


Рис. 2.78. Мультиплицирующие субстраты. Ингибитор взаимодействует только с тройным комплексом X_3 .

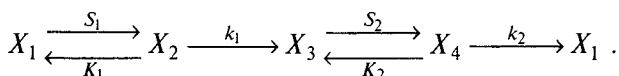
тов и ингибиторов. Другими словами, механизм ингибирования может быть строго идентифицирован исходя из данных по стационарной кинетике реакции.

Приведенный анализ иллюстрирует многообразие возможных экспериментально наблюдаемых зависимостей и многообразие кинетических

механизмов ингибирования многосубстратных реакций. Однако для случая нестероидных противовоспалительных средств — быстрых обратимых ингибиторов PGH-синтетазы — может быть строго выявлен однозначный механизм ингибирования.

Нестероидные противовоспалительные препараты — конкурентные вытеснители арахидоновой кислоты из активного центра PGH-синтетазы

В реакции окисления арахидоновой кислоты до простагландина H_2 арахидоновая кислота и донор электронов выступают как немultiплицирующие субстраты. Выше детально рассмотрены результаты исследования кинетики действия PGH-синтетазы и показана немultiпликативность этих двух субстратов. Кинетика действия PGH-синтетазы включает целый набор интермедиатов, однако без ущерба для общности рассмотрения, она может быть описана простейшей кинетической схемой



где E — свободная форма фермента; X_1 — комплекс фермента с арахидоновой кислотой; X_3 — комплекс фермента со вторым субстратом; k_1, k_2 — константы лимитирующих стадий химической трансформации.

Сопоставление экспериментально наблюдаемых зависимостей скорости реакции от концентраций субстратов и ингибитора (см. рис. 2.64–2.67) с теоретическими зависимостями показывает, что экспериментальные данные соответствуют графику рис. 2.71 и кинетической схеме (2.150). Из сопоставления следует единственный вывод: ингибитор взаимодействует со свободной формой фермента, конкурентно вытесняя арахидоновую кислоту из активного центра.

Следует отметить важную особенность механизма — симметричность относительно четных или нечетных индексов состояний активного центра. Каталитическое превращение субстратов в продукты реакции представляет собой замкнутый цикл. Индексация интермедиатов имеет условный характер, и ее удобно начинать с первого продукта любой необратимой

стадии. В схеме это может быть как интермедиат X_1 , так и интермедиат X_3 . Другими словами, формально эквивалентно, является ли первым субстратом S_1 арахидоновая кислота или восстановитель — донор электронов. Если предположить, что S_1 — донор электронов, то экспериментальные данные будут соответствовать графику, представленному на рис. 2.72. Согласно этому механизму ингибитор обратимо комплексуется интермедиатом X_3 , т.е. формой фермента, которая взаимодействует с арахидоновой кислотой. В этом случае ингибитор выводит из реакции интермедиат X_3 , который в комплексе с ингибитором теряет способность взаимодействовать с арахидоновой кислотой. Это замечание еще раз подчеркивает *однозначность главного вывода* — нестероидные противовоспалительные препараты конкурентно вытесняют арахидоновую кислоту из активного центра PGH-синтетазы.

Классификация нестероидных противовоспалительных соединений — ингибиторов PGH-синтетазы

Ингибирование первичной реакции образования простагландинов нестероидными противовоспалительными препаратами широко используется в клинической практике.

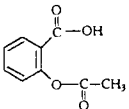
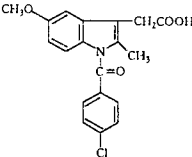
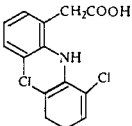
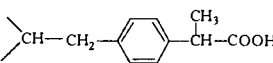
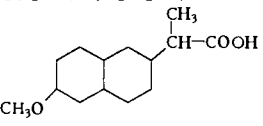
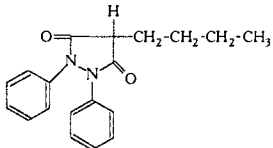
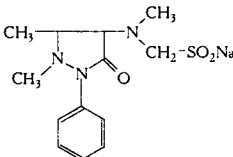
При детальном изучении кинетических закономерностей ингибирования обнаружено большое разнообразие в механизмах действия лекарственных препаратов на активность PGH-синтетазы. Данные по ингибированию фермента суммирует табл. 2.17. Видно, что существуют по крайней мере три класса противовоспалительных препаратов — ингибиторов PGH-синтетазы.

Аспирин является медленным и необратимым ингибитором фермента. С помощью изотопной метки было показано, что аспирин необратимо реагирует с PGH-синтетазой, при этом в результате реакции ацильная группа переносится на белок. Обсужденные выше кинетические данные подтверждают необратимый характер взаимодействия аспирина с PGH-синтетазой.

Определенную группу ингибиторов составляют вещества, быстро и обратимо блокирующие активность PGH-синтетазы (бруфен, напроксен, бутадиион). Эти соединения действуют как конкурентные ингибиторы по отношению к арахидоновой кислоте.

Достаточно необычными представляются эффекты медленного обратимого процесса взаимодействия индометацина и вольтарена с активным центром PGH-синтетазы. Как правило, низкомолекулярные соединения, обратимо образующие комплексы с белками, реагируют с ними достаточно быстро. Скорости комплексообразования достаточно велики, и равновесие устанавливается в микросекундном или миллисекундном диапазоне. Наиболее часто встречаются процессы, имеющие константу

**Закономерности ингибирования PGH-синтетазы нестероидными
противовоспалительными препаратами**

№ п/п	Структура и название соединения	Механизм ингибирования	Кинетические и равновесные параметры ингибирования (32°C)
1	 Аспирин	медленный, необратимый	$k = 0,17 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
2	 Индометацин	медленный, обратимый	$k_1 = (6,4 \pm 1,4) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ $k_{-1} = (1,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $K_i = (2,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $K_i = (9 \pm 1) \cdot 10^{-7} \text{ M} (4^\circ\text{C})$
3	 Вольтарен	медленный, обратимый	$k_1 = (7,2 \pm 1,4) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ $k_{-1} = (2 \pm 0,4) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $K_i = (2,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$
4	 Бруфен (ибупрофен)	быстрый, обратимый, конкурентный	$K_i = (1 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ M}$
5	 Напроксен	быстрый, обратимый, конкурентный	$K_i = (9,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$
6	 Бутадион	быстрый, обратимый, конкурентный	$K_i = (3,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-4} \text{ M}$
7	 Анальгин	обратимый, обратимый, конкурентный	$K_i = (9,8 \pm 2,2) \cdot 10^{-4} \text{ M}$

скорости около $10^7 \text{ М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Бимолекулярные стадии реакций с константами скоростей порядка $10^{10} \text{ М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ попадают в разряд реакций, скорость которых контролируется диффузией реагентов в растворе. За счет стерических эффектов или влияния электростатических взаимодействий диффузионно контролируемый процесс с участием белковой молекулы может быть замедлен и иметь константу скорости до $10^8 \text{ М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$.

Реакция образования комплекса индометацин — РГН-синтетаза имеет константу скорости бимолекулярного взаимодействия $6,3 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Это значение на семь порядков ниже диффузионно контролируемого предела. Однако в настоящее время накапливается все больше фактов, свидетельствующих в пользу того, что кинетика образования комплексов с низкомолекулярными лигандами может быть чувствительна к структуре органического лиганда. Так, введение в аспарагиновую кислоту метильной группы почти в 10^4 раз уменьшает константу скорости комплексообразования этого субстрата с активным центром аспаратаминотрансферазы. При переходе от профлавина к родамину GG, имеющему геометрически большую молекулу, процесс комплексообразования лиганда с активным центром α -химоотрипсина замедляется в 10^6 раз, в то время как константа равновесия практически не меняется.

Можно полагать, что похожий механизм имеет место и в случае обратимых ингибиторов РГН-синтетазы. Напроксен и бруксен, представляющие собой небольшие и в значительной степени плоские молекулы, достаточно легко достигают активного центра фермента. Вольтарен и индометацин, имеющие разветвленную структуру, проникают в активный центр фермента, преодолевая барьер конформационных изменений белка, несколько раздвигая полипептидные цепи биополимера.

В настоящее время можно в первом приближении выделить структурные элементы соединения, обеспечивающие ему высокий уровень ингибиторной способности. Сравнение структур соединений, представленных в табл. 2.17, показывает, что эффективными ингибиторами РГН-синтетазы являются молекулы, имеющие в своей структуре достаточно выраженную ароматическую гидрофобность и свободную карбоксильную группу.

Двухкомпонентное ингибирование.

Взаимозависимые и взаимонезависимые ингибиторы

Если на активный центр фермента действуют два вещества, то могут иметь место несколько кинетически различаемых случаев.

1. Оба ингибитора или активатора взаимодействуют с одним и тем же участком активного центра. Такие ингибиторы или активаторы называют *взаимозависимыми*.

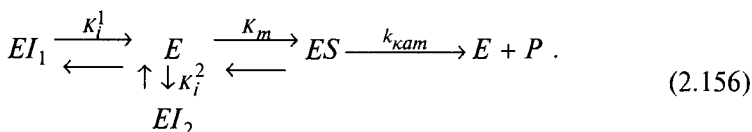
2. Вещества действуют независимо, то есть взаимодействуют с разными участками активного центра. Такие ингибиторы или активаторы называют *взаимонезависимыми*.

Исследование такого рода взаимозависимости или взаимонезависимости дает важную информацию о структуре активного центра и характере взаимодействия веществ с активным центром.

Рассмотрим несколько возможных случаев и несколько примеров.

Взаимозависимые конкурентные ингибиторы

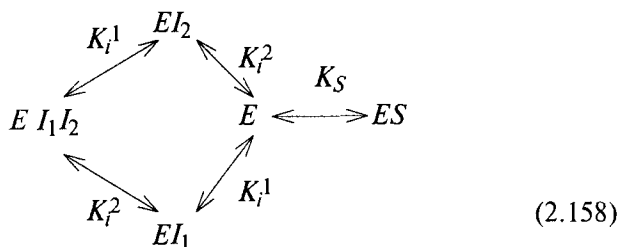
Кинетическая схема имеет вид



В этом случае ингибиторы влияют на кажущееся значение K_m и не затрагивают $k_{кат}$

$$K_m = K_m \left(1 + \frac{I_1}{K_i^1} + \frac{I_2}{K_i^2} \right). \quad (2.157)$$

Взаимонезависимые конкурентные ингибиторы



В этом случае

$$k_{кат} \neq f(I_1, I_2); \quad (2.159)$$

$$K_m = K_S \left(1 + \frac{I_1}{K_i^1} \right) \left(1 + \frac{I_2}{K_i^2} \right).$$

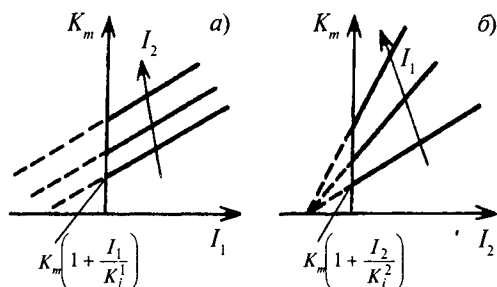
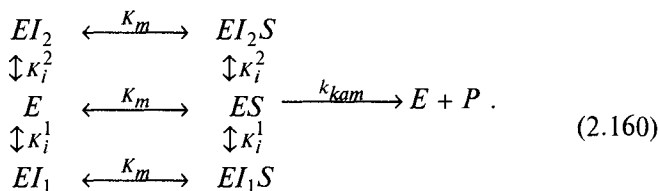


Рис. 2.79. Зависимости наблюдаемой константы Михаэлиса для двухкомпонентного ингибирования для случая взаимонезависимых (а) и взаимозависимых (б) конкурентных ингибиторов.

На рис. 2.79 приведено сравнение поведения K_m для случая взаимонезависимых и взаимозависимых конкурентных ингибиторов.

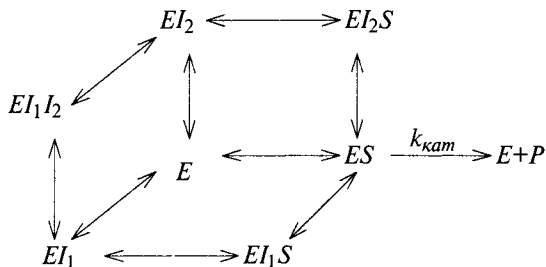
Взаимозависимые неконкурентные ингибиторы



В этом случае ингибиторы не влияют на K_m и специфически влияют на $k_{кам}$:

$$\begin{aligned}
 K_m &\neq f(I_1, I_2); \\
 k &= \frac{k_{кам}}{1 + \frac{I_1}{K_1} + \frac{I_2}{K_2}}.
 \end{aligned} \quad (2.161)$$

Взаимонезависимые неконкурентные ингибиторы



В этом случае

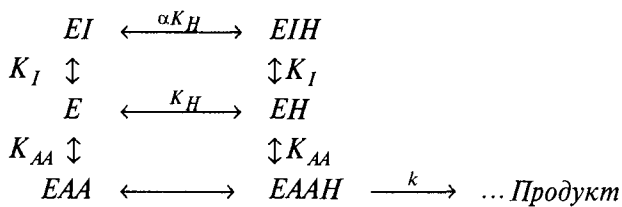
$$k = \frac{k_{\text{кам}}}{\left(1 + \frac{I_1}{K_i^1}\right) \left(1 + \frac{I_2}{K_i^2}\right)}; \quad (2.162)$$

$$K_m \neq f(I_1, I_2).$$

Взаимозависимые и взаимонезависимые неконкурентные ингибиторы могут быть дискриминированы так же, как и конкурентные ингибиторы, поскольку зависимости $k_{\text{кам}}$ от ингибиторов представлены теми же функциями, что и значение K_m , см. рис. 2.79.

Пример 2.14. Определить взаимозависимость и взаимонезависимость ингибитора и активатора при взаимодействии обратимых ингибиторов PGH-синтетазы и гемина — простетической группы активного центра.

Центры связывания гемина и нестероидных противовоспалительных препаратов на активном центре PGH-синтетазы взаимонезависимы. Как известно, простетической группой, осуществляющей окислительно-восстановительный катализ в активном центре PGH-синтетазы, является гемин. Не заключается ли ингибирующее действие противовоспалительных лекарственных препаратов в вытеснении гемина из активного центра фермента? Основанием для постановки этого вопроса является тот факт, что в комплексообразовании гемина принимает участие карбоксильная группа лиганда. Ответ на этот вопрос дает исследование зависимостей скоростей реакций от концентрации гемина при различных концентрациях ингибитора.



Рассмотрим кинетическую схему процесса:

Продуктивным является комплекс апофермента с гемом и арахидоновой кислотой $EAAH$, образующийся при взаимодействии указанных лигандов по взаимонезависимым центрам. Константы диссоциации комплексов заданы величинами K_{AA} и K_H . Нестероидные противовоспалительные параметры образуют комплекс с активным центром, конкурентно вытесняя арахидоновую кислоту (комплекс EI , константа диссоциации

комплекса K_I). Можно представить, что существует и тройной комплекс «активный центр фермента-гемин-ингибитор» (комплекс EIH). Мерой взаимозависимости ингибитора и гемина, их конкурентности является величина α . Если $\alpha = 1$, лиганды взаимонезависимы, т.е. образование комплекса «гемин — активный центр» происходит с одинаковой эффективностью, с одинаковым изменением свободной энергии, как в присутствии в активном центре ингибитора, так и в отсутствие. Если образование комплекса с одним из лигандов ухудшает комплексобразование другого, величина α должна быть существенно больше единицы.

В рамках равновесного приближения в предположении, что комплексы образуются относительно быстро (это справедливо для бруфена, бутадiona, анальгина, салициловой кислоты) кинетику процесса описывает система уравнений

$$\begin{aligned} v &= k EAAH ; \\ E_0 &= E + EI + EIH + EH + EAA + EAAH ; \\ K_{AA} &= \frac{E \times AA}{EAA} , \quad K_H = \frac{E \times H}{EAH} , \quad K_I = \frac{E \times I}{EI} ; \\ \alpha K_H &= \frac{EI \times H}{EIH} , \quad K_H = \frac{EAA \times H}{EAAH} . \end{aligned} \quad (2.163)$$

Решение этой системы приводит к уравнению скорости

$$v = \frac{kE_0 AAH}{K_{AA} K_H \left[1 + \frac{1}{K_I} \left(1 + \frac{H}{\alpha K_H} \right) + \frac{AA}{K_{AA}} \left(1 + \frac{H}{K_H} \right) + \frac{H}{K_H} \right]} , \quad (2.164)$$

или

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{kE_0} \left\{ \frac{K_M}{M} \left[1 + \frac{K_{AA}}{AA} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \right] + \left[1 + \frac{K_{AA}}{AA} \left(1 + \frac{I}{\alpha K_I} \right) \right] \right\} \quad (2.165)$$

Величина α регулирует два предельных режима работы системы.

Взаимозависимые лиганды. Если $\alpha \gg 1$ (в пределе при $\alpha \rightarrow \infty$), уравнение скорости принимает вид

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{kK_0} \left\{ \frac{K_H}{H} \left[1 + \frac{K_{AA}}{AA} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \right] + \left(1 + \frac{K_{AA}}{AA} \right) \right\} . \quad (2.166)$$

Из этого уравнения видно, что тангенс угла наклона зависимости $1/v$ от $1/H$ является функцией концентрации ингибитора и растет с ее увеличением, в то время как максимальная скорость реакции не зависит от концентрации ингибиторов. Теоретические зависимости $1/v$ от $1/H$ для взаимозависимых лигандов приведены на рис. 2.80а. Прямые имеют общую точку пересечения на оси ординат.

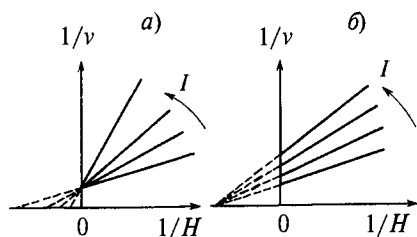


Рис. 2.80. Теоретические зависимости скорости реакции от концентрации простетической группы при ингибировании реакции ингибитором, конкурентным по отношению к субстрату.

a — простетическая группа и ингибитор — взаимозависимые лиганды; *б* — простетическая группа и ингибитор — взаимонезависимые лиганды.

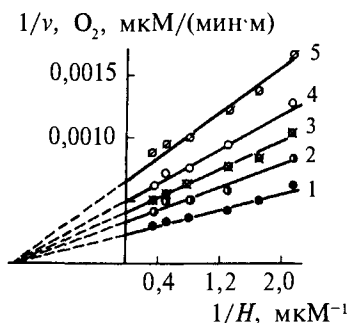


Рис. 2.81. Гемин- и бромфен взаимонезависимые лиганды активного центра РГН-синтетазы.

Зависимость скорости РГН-синтезной реакции от концентрации гемина при различных концентрациях бромфена в обратных координатах. Концентрации бромфена ($M \cdot 10^5$): 1 — 0; 2 — 1,1; 3 — 1,8; 4 — 3,3; 5 — 5,0. Условия: арахидоновая кислота — 0,625 мМ, адреналин — 1,1 мМ; 32°C, 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2, твин-20 — 0,1%.

Взаимонезависимые лиганды. Если $\alpha = 1$, уравнение скорости можно записать в виде

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{kE_0} \left\{ \left(1 + \frac{K_{AA}}{H} \right) \left[1 + \frac{K_{AA}}{AA} \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \right] \right\}. \quad (2.167)$$

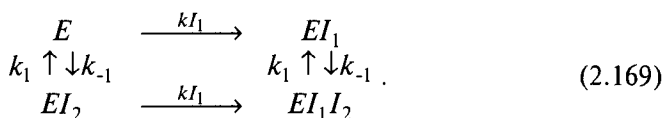
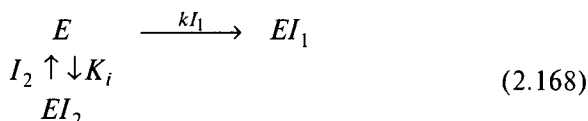
В этом случае как тангенсы углов наклона прямых $1/v$ от $1/H$, так и отрезки, отсекаемые на оси ординат, должны зависеть от концентрации ингибитора. Прямые имеют общую точку пересечения, лежащую на оси абсцисс в отрицательной области (рис. 2.80б).

Были изучены зависимости скорости РГН-синтезной реакции от концентрации гемина при различных концентрациях в реакционной смеси бромфена — быстрого и обратимого ингибитора РГН-синтетазы. Экспериментально наблюдаемые зависимости в обратных координатах представлены на рис. 2.81. Видно, что бромфен и гемин — взаимонезависимые лиганды активного центра РГН-синтетазы.

Таким образом, бромфен и гемин взаимодействуют с различными, структурно не перекрывающимися областями активного центра РГН-синтетазы.

Двухкомпонентное ингибирование для случая одновременного влияния обратимого и необратимого ингибитора

Влияние ингибиторов различных классов на активность РГН-синтетазы. Двухкомпонентное ингибирование — инактивация фермента Из анализа механизмов ингибирования РГН-синтетазы лекарственными препаратами следует, что существуют по крайней мере три класса ингибиторов фермента, различающихся по скорости и обратимости взаимодействия с активным центром. Исследование одновременного влияния двух ингибиторов различных классов на РГН-синтетазу позволяет получить весьма полезную информацию о характере взаимодействия фермент—ингибиторы. Взаимодействуют различающиеся ингибиторы с одним центром или имеются различные участки активного центра фермента и каждый класс ингибиторов взаимодействует со своим участком? Наиболее интересны результаты сравнения аспирина (медленного необратимого ингибитора) с быстрыми и обратимыми ингибиторами, такими, как бруфен, напроксен, анальгин. Рассмотрим две кинетические схемы:



В схеме (2.168) ингибиторы I_1 и I_2 конкурируют за активный центр фермента (взаимозависимые ингибиторы). Образование комплекса EI_2 превращает реакцию активного центра с ингибитором I_1 . Схема (2.169) соответствует взаимонезависимым ингибитора. Образование комплекса EI_2 абсолютно не сказывается на реакции активного центра с ингибитором I_1 . Очевидно, что эти схемы могут быть различимы на основе кинетического анализа и эксперимента.

Взаимозависимые ингибиторы. Кинетику процесса для схемы (2.168) описывают уравнения

$$\frac{dEI_1}{dt} = kI_1 E ; \quad (2.170)$$

$$E_0 = E + EI_2 + EI_1, \quad K_i = \frac{E \times I_2}{EI_2},$$

из которых следует дифференциальное уравнение

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{kI_1}{1 + I_2/K_i} E.$$

Интегрирование этого уравнения приводит к зависимости

$$E = E_0 \exp \left[\frac{-kI_1}{1 + I_2/K_i} t \right]. \quad (2.171)$$

Относительное изменение активности фермента в присутствии обоих ингибиторов будет описывать функция

$$\frac{A}{A_0} = \exp \left[\frac{-kI_1}{1 + I_2/K_i} t \right]. \quad (2.172)$$

Из (2.172) видно, что присутствие быстро обратимого ингибитора I_2 должно замедлить процесс необратимой инактивации фермента ингибитором I_1 . Начальная скорость инактивации определяется уравнением

$$v_0 = \frac{kI_1}{1 + I_2/K_i} A_0. \quad (2.173)$$

При бесконечно большой концентрации обратимого ингибитора ($I_2/K_i \rightarrow \infty$) скорость инактивации может быть практически равна нулю. В этом случае обратимый ингибитор выступает в роли протектора фермента против необратимой инактивации.

Взаимонезависимые ингибиторы. Кинетическую схему (2.169) описывает система уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dEI_1}{dt} &= kI_1 \times E - (k_i EI_1 I_2 - k_{-i} EI_2 I_1); \\ \frac{dEI_2 I_1}{dt} &= kI_1 \times EI_2 - (k_{-i} EI_2 I_1 - k_i EI_1 I_2); \\ E_0 &= E + EI_2 + EI_1 + EI_2 I_1; \\ K_i &= \frac{E \times I_2}{EI_2} = \frac{EI_1 \times I_2}{EI_2 I_1}. \end{aligned}$$

Из этих уравнений следует:

$$E + EI_1 = \frac{E_0}{1 + I_2/K_i}$$

или

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{dEI_1}{dt}.$$

Соответственно

$$\begin{aligned} \frac{dEI_1}{dt} + \frac{dEI_2 I_1}{dt} &= kI_1 (E + EI_2), \\ \frac{dEI_1}{dt} &= kI_1 \times E. \end{aligned}$$

Получаем дифференциальное уравнение

$$\frac{-dE}{dt} = kI_1 \times E ,$$

решение которого при начальном условии $t = 0, E = E_0$ можно записать в форме

$$E = E_0 e^{-kI_1 t} , \quad (2.174)$$

или

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kI_1 t} . \quad (2.175)$$

Принципиально важное отличие взаимонезависимых ингибиторов от взаимозависимых заключается в том, что для них показатель экспоненты в уравнении уменьшения активности фермента не зависит от концентрации обратимого ингибитора. Присутствие обратимого ингибитора никак не сказывается на кинетике инактивации фермента необратимым ингибитором.

Очевидно, что взаимозависимые и взаимонезависимые ингибиторы могут быть выявлены экспериментально путем сопоставления вида функций изменения активности фермента во времени в присутствии двух ингибиторов с уравнениями (2.172) и (2.175).

Результаты экспериментального исследования инактивации PGN-синтетазы аспирином в присутствии бруфена и салициловой кислоты приведены на рис. 2.82 и 2.83. PGN-синтазу инкубировали с раствором аспирина и бруфена (или салицилата) заданной концентрации, отбирали пробы и измеряли остаточную активность фермента. При измерении активности

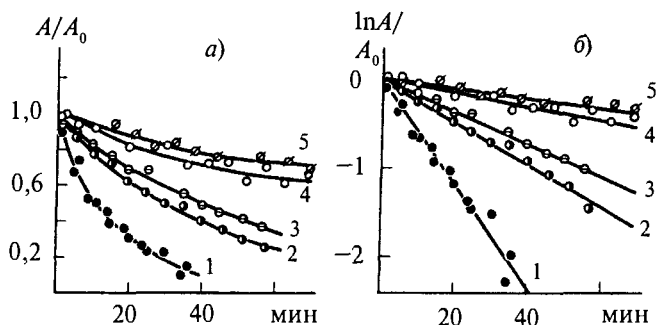


Рис. 2.82. Проектирование бруфеном инактивации PGN-синтетазы под действием аспирина. Зависимость остаточной активности PGN-синтетазы от времени инкубации с аспирином при различных концентрациях бруфена ($M \cdot 10^5$).

1 — 0; 2 — 1,1; 3 — 1,7; 4 — 5,8; 5 — 7,5. Условия: 20 мМ фосфатный буфер pH 7,2; твин-20 — 0,1%, аспирин — $5,5 \cdot 10^{-3}$ М.

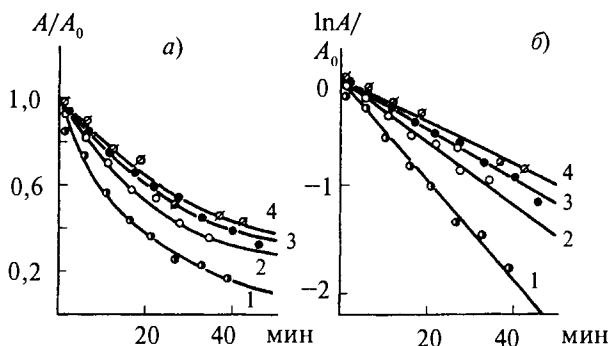


Рис. 2.83. Защита салицилатом натрия PGH-синтетазы от инактивации аспирином. Зависимость остаточной активности фермента от времени инкубации с аспирином при различных концентрациях салицилата ($M \cdot 10^2$). 1 — 0; 2 — 0,97; 3 — 1,9; 4 — 3,7. Условия: аспирин — $5,3 \cdot 10^{-3} M$, твин-20 — 0,1%, 20 mM фосфатный буфер pH 7,2; 32°C.

образец существенно разбавляли так, что ингибирующим действием обратимого ингибитора при измерении активности можно было практически пренебречь.

На рис. 2.82 и 2.83 видно, что быстрые обратимые ингибиторы замедляют реакцию аспирина с PGH-синтетазой. Кинетика процесса строго описывается уравнением (2.172). Это говорит о том, что аспирин и быстрые обратимые ингибиторы PGH-синтетазы конкурируют за один центр в процессе ингибирования и инактивации фермента. Образование комплекса «активный центр — обратимый ингибитор» блокирует взаимодействие (ацетилирование) активного центра аспирином.

Двухкомпонентное ингибирование—инактивация в открытой системе, в режиме «расхода» ингибитора и инактиватора

Аспирин — необратимый ингибитор (инактиватор) и бруфен (обратимый ингибитор) PGH-синтетазы — широко применяемые лекарственные средства. Интересно понять и предсказать, как они совместно будут действовать в организме. При этом принципиально важная кинетическая особенность, которую необходимо принять во внимание, заключается в том, что концентрация этих веществ, как и всех лекарств в организме, изменяется во времени (см. гл. 4, посвященную фармакокинетику).

Из кинетического анализа можно сделать интересный вывод, который заключается в том, что быстрые обратимые ингибиторы можно использовать в качестве протекторов против необратимой инактивации в открытых системах.

Обратимые ингибиторы РGH-синтетазы — протекторы против необратимой инактивации фермента аспирином. Представим систему, открытую для двух ингибиторов: аспирина I_1 — необратимого инактиватора фермента и быстрого обратимого ингибитора I_2 . Если предположить, что в начальный момент времени, $t = 0$, в системе заданы начальные концентрации компонентов $I_{1,0}$ и $I_{2,0}$ и скорость оттока этих соединений имеет линейный характер

$$\frac{-dI_1}{dt} = k_{I_1} I_1, \quad \frac{-dI_2}{dt} = k_{I_2} I_2, \quad (2.176)$$

то концентрации аспирина и ингибитора I_2 как функции времени можно представить уравнениями

$$I_1 = I_{1,0} e^{-k_{I_1} t}; \quad I_2 = I_{2,0} e^{-k_{I_2} t}. \quad (2.177)$$

Будем считать, что в начальный момент времени система характеризуется общей концентрацией РGH-синтетазы E_0 , при этом в системе отсутствуют процессы ввода новых порций фермента. Физической моделью системы такого рода может служить желудок, в стенке которого происходит активный синтез простагландинов. Выявлен следующий факт: нарушение нормальных процессов синтеза простагландинов в стенке желудка связано с возникновением и развитием язвенной болезни.

Известно, что высокие дозы аспирина, мощного и необратимого ингибитора РGH-синтетазы, вызывают возникновение язвы желудка. После приема аспирина в желудке практически мгновенно возникает его усредненно высокая концентрация, которая со временем в результате метаболических и транспортных процессов уменьшается практически до нуля [см. (2.177)]. При этом аспирин блокирует РGH-синтазу в стенке желудка и на какое-то время, определяемое скоростью биосинтеза фермента, там прекращается биосинтез простагландинов. Очевидно, что в зависимости от дозы препарата, скорости его реакции с РGH-синтазой и скорости вывода из системы могут наблюдаться эффекты как полной, так и частичной инактивации фермента.

Важно отметить, что ulcerогенное (вызывающее язву) действие аспирина является одним из главных неблагоприятных воздействий этого препарата на организм. Свое фармакологическое действие аспирин оказывает не в стенке желудка, а в других органах и тканях, но ввод его в организм через желудок является самым распространенным. Большой медицинской проблемой является защита РGH-синтетазы стенки желудка от необратимой инактивации аспирином.

Проведенный анализ обсуждаемой кинетической модели с выявлением основных динамических характеристик системы и с выяснением возможной роли быстрых обратимых ингибиторов как протекторов против необратимой инактивации РGH-синтетазы аспирином показывает, что процесс в присутствии и в отсутствие быстрого обратимого ингибитора приводит к совершенно отличным кинетическим результатам.

Инактивация в отсутствие обратимого ингибитора. Кинетическая схема процесса имеет простейший вид

$$E \xrightarrow{I_1(t)} E_{in}, \quad (2.178)$$

где $I_1(t)$ представлено уравнением (2.176).

Дифференциальное уравнение, описывающее динамику процесса,

$$\frac{-dE}{dt} = k \times I_{1,0} E e^{-k_{I_1} t} \quad (2.179)$$

представляет собой уравнение с разделяющимися переменными. Интегрирование этого уравнения с использованием начального условия $t = 0$, $E = E_0$ приводит к функции

$$\frac{E}{E_0} = \exp \left[-\frac{k \times I_{1,0}}{k_{I_1}} (1 - e^{-k_{I_1} t}) \right]. \quad (2.180)$$

На рис. 2.84 представлены теоретические кривые зависимости E/E_0 от времени при различных дозах необратимого ингибитора. Из (2.180) и рис. 2.84 видно, что при $t \rightarrow \infty$ остаточная относительная активность фермента выходит на постоянный предельный уровень.

$$\left(\frac{E}{E_0} \right)_{t \rightarrow \infty} = e^{-\frac{k I_{1,0}}{k_{I_1}}}. \quad (2.181)$$

Величина этого предела зависит от концентрации аспирина.

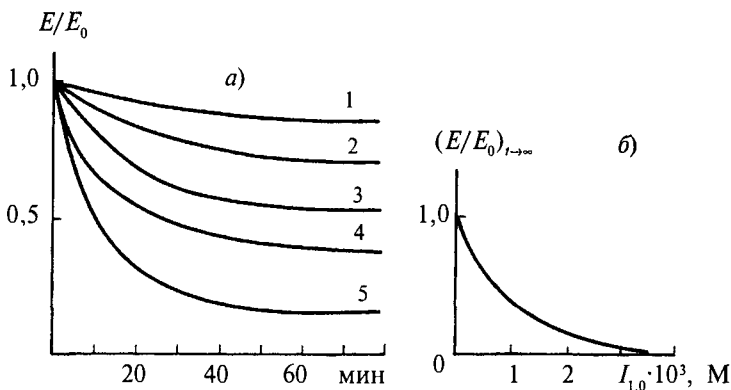


Рис. 2.84. Изменение активности фермента под действием необратимого ингибитора. *a* — зависимости от времени относительной активности фермента, инактивирующегося под действием необратимого ингибитора (в открытой по ингибитору системе) при различных начальных концентрациях необратимого ингибитора $I_{1,0}$ (мМ).

1 — 0,1; 2 — 0,3; 3 — 0,6; 4 — 1,0; 5 — 2,0; *б* — зависимости предельной относительной остаточной активности фермента от концентрации необратимого ингибитора. Расчеты сделаны по уравнению (2.180) при использовании следующих параметров: $k = 50 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$; $k_{I_1} = 0,05 \text{ мин}^{-1}$.

При малых дозах $(E/E_0)_{t \rightarrow \infty}$ близко к единице, т.е. ингибитор практически не успевает инактивировать фермент, при больших дозах аспирин инактивирует фермент практически на 100%.

Инактивация в присутствии быстрого обратимого ингибитора. Кинетику процесса можно представить схемой



где $I_1(t)$ и $I_2(t)$ — экспоненциальные функции, заданные уравнениями (2.176).

Для простоты примем, что характерные времена вывода аспирина и обратимого ингибитора одинаковы ($\tau = 1/k_{I_1}$). Система уравнений, описывающая динамику процесса, будет иметь вид

$$\begin{aligned} \frac{dE_{in}}{dt} &= kI_1(t)E; \\ E_0 &= E \left[1 + \frac{I_2(t)}{K_i} \right] + E_{in}; \\ K_i &= \frac{E \times I_2(t)}{EI_2(t)}; \\ I_1(t) &= I_{1,0}e^{-k_{I_1}(t)}; \quad I_2(t) = I_{2,0}e^{-k_{I_2}(t)}. \end{aligned} \quad (2.183)$$

Из этих уравнений следует

$$\begin{aligned} E &= \frac{1}{[1 + I_2(t)/K_i]} (E_0 - E_{in}); \\ \frac{dE_{in}}{dt} &= kI_1(t) \frac{(E_0 - E_{in})}{[1 + I_2(t)/K_i]}. \end{aligned} \quad (2.184)$$

Если ввести новую переменную $y = E_0 - E_{in}$, то подстановка этого уравнения в (2.183) приводит к дифференциальному уравнению

$$-\frac{dy}{dt} = \frac{kI_{1,0}e^{-k_{I_1}(t)}}{1 + \frac{I_{2,0}e^{-k_{I_2}(t)}}{K_i}} y.$$

Интегрирование этого уравнения с использованием начального условия $t = 0$, $E_{in} = 0$, $y = E_0$ приводит к функции

$$\frac{E}{E_0} = \exp \left[\left(\frac{kI_{1,0}K_i}{k_{I_{1,0}}I_{2,0}} - 1 \right) \ln \left(1 + \frac{e^{-k_{I_1}t} I_{2,0}}{K_i} \right) - \frac{k \times I_{1,0}K_i}{k_{I_1} I_{2,0}} \ln \left(1 + \frac{I_{2,0}}{K_i} \right) \right]. \quad (2.185)$$

Рассмотрим два важных асимптотических случая. В начальный момент времени в силу быстрого обратимого взаимодействия ингибитора I_2 с активным центром фермента относительная концентрация активного фермента в системе понижена:

$$\left(\frac{E}{E_0} \right)_{t=0} = \frac{1}{1 + I_{2,0}/K_i}. \quad (2.186)$$

При этом в условиях $I_{2,0} \gg K_i$ активность фермента близка к нулю. Однако с течением времени концентрация активного фермента будет возрастать за счет того, что система освобождается от ингибитора I_2 .

При больших временах протекания процесса предельная относительная концентрация активного фермента может быть представлена функцией

$$\left(\frac{E}{E_0} \right)_{t \rightarrow \infty} = \exp \left[- \frac{kI_{1,0}K_i}{k_{I_1} I_{2,0}} \ln \left(1 + \frac{I_{2,0}}{K_i} \right) \right]. \quad (2.187)$$

Предельная остаточная активность определяется в первую очередь величиной безразмерного отношения $I_{2,0}/K_i$ или величиной отношения концентраций обоих ингибиторов $I_{2,0}/I_{2,0'}$.

Из уравнения (2.187) следует, что если $I_{1,0}/K_i \gg 1$, то фермент может практически полностью восстановить свою активность (при $I_{2,0}/K_i \rightarrow \infty$, $E/E_0 \rightarrow \infty \rightarrow 1$).

Аналогично, если $I_{2,0}/I_{1,0} \gg 1$, показатель экспоненты в уравнении (2.187) приближается к нулю, то соответственно E/E_0 приближается к единице. На рис. 2.85 представлены зависимости от времени относительной концентрации активного фермента, рассчитанные при различных значениях $I_{2,0}/K_i$. В обсуждаемой системе фермент относительно быстро способен восстановить значительную долю своей активности.

В начальный момент времени концентрация свободного фермента может существенно уменьшиться за счет взаимодействия фермента с быстрым обратимым ингибитором. Однако затем в системе падает концентрация как I_1 , так и I_2 . Это приводит к тому, что довольно быстро фермент восстанавливает свою активность. Таким образом, быстрые обратимые ингибиторы (бруфен, бутадиион, анальгин, напроксен, салициловая кислота) могут служить протекторами против необратимой инактивации РН-синтетазы.

Рассмотренная кинетическая модель объясняет наблюдаемый экспе-

риментально феномен защиты обратимыми ингибиторами от ряда неблагоприятных физиологических эффектов действия аспирина. Так, известно, что аспирин практически полностью блокирует тромбообразование и первичные процессы агрегации тромбоцитов. Объясняется это ингибирующим влиянием аспирина на PGH-синтетазу тромбоцитов. Ферменты синтеза тромбоксана — лимитирующие ферменты агрегации тромбоцитов.

Введение аспирина в кровь полностью ингибирует агрегацию тромбоцитов, при этом агрегация не восстанавливается ни через 2 ч, ни через 48 ч после введения лекарства. Поскольку аспирин является необратимым ингибитором PGH-синтетазы, последующее восстановление агрегационных свойств крови определяется, по-видимому, процессом синтеза фермента *de novo* и требует достаточно большого времени. Если в кровеносное русло вводится индометацин — обратимый ингибитор PGH-синтетазы, он полностью блокирует агрегацию тромбоцитов, однако через двое суток агрегационные свойства крови полностью восстанавливаются.

При совместном применении аспирина и индометацина через 2 ч после их введения действие ингибиторов еще сохраняется и тромбоциты не способны агрегировать под действием различных индукторов агрегации. Через 48 ч способность тромбоцитов агрегировать восстанавливается, как и при введении одного индометацина. Этот эффект полностью объясняется в рамках рассмотренной модели.

Необратимую инактивацию PGH-синтетазы в стенке желудка связывают с язвотызывающим действием аспирина. Проведенный анализ показывает, что быстрые обратимые ингибиторы PGH-синтетазы, такие, как бруфен, бутадиион, анальгин, напроксен, салициловая кислота, должны обладать протектирующими свойствами против аспирининдуцируемой язвы желудка.

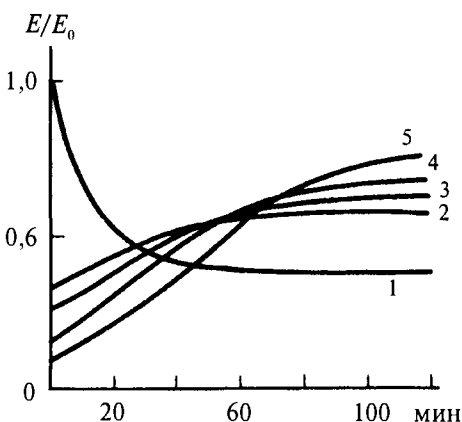


Рис. 2.85. Зависимости от времени относительной активности фермента, инактивирующегося под действием необратимого ингибитора в присутствии быстро обратимого ингибитора в открытой по ингибиторам системе. Параметр $I_{2,0}/K_i$.

1 — 0 (система в отсутствие быстро обратимого ингибитора); 2 — 2; 3 — 3; 4 — 5; 5 — 10. Расчеты сделаны по уравнению (2.185) при использовании следующих параметров:

$$k = 50 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}; k_{I_1} = 0,05 \text{ мин}^{-1}; I_{1,0} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}.$$

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как отличить обратимый ингибитор от необратимого? 2. Напишите кинетическую схему и уравнение, описывающие кинетику потери активности фермента под действием необратимого ингибитора. 3. По каким кинетическим законам действуют медленные обратимые ингибиторы? Приведите примеры медленных обратимых ингибиторов. 4. Напишите обобщенную схему и основные кинетические уравнения для обратимого ингибирования односубстратных реакций. Как отличить конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное ингибирование? 5. Напишите кинетические схемы и уравнения, описывающие обратимое ингибирование двухсубстратных реакций. 6. Какие ингибиторы ферментов — лекарственные препараты, — вы знаете? 7. Что такое взаимозависимые и взаимонезависимые ингибиторы? Напишите основные уравнения, описывающие двухкомпонентное ингибирование.

2.8. Инактивация ферментов

Вчера нами был изолирован и посажен в банку фермент... Уже сегодня фермент выглядит совсем спокойным и скисшим. Но я-то знаю их брата! — Стоит только чуть-чуть приоткрыть крышку, фермент тут же вырвется наружу — и ищи-свищи его потом. Я лучше подержу его еще пару-тройку денечков, чтобы он окончательно прокис, ну а пока... пока кормлю его фишашками (ферменты их терпеть не могут).

Шарль О'Тан

Схемы инактивации, описываемые экспоненциальной функцией

Биополимерные молекулы являются термодинамически неустойчивыми и, как правило, с течением времени изменяют свою пространственную структуру и свойства. Если эти изменения отражаются на функциональных характеристиках молекулы, изучение изменения во времени функциональной активности должно дать информацию о состоянии биополимерной молекулы. Наиболее отчетливо это проявляется при изучении ферментов. Каталитическая активность является мерой состояния активного центра фермента и соответственно белковой молекулы в целом. В большинстве случаев процесс инактивации может быть описан как переход между двумя состояниями белка активного E_a и неактивного E_i :



Как правило, это необратимые процессы, хотя в некоторых случаях можно наблюдать обратимую инактивацию ферментов. С точки зрения химической кинетики эта реакция представляет собой обратимую мономолекулярную реакцию

$$\begin{cases} \frac{dE_a}{dt} = -k_{12} E_a + k_{21} E_i \\ E_0 = E_a + E_i \end{cases}$$

Соответственно кинетика процесса характеризуется одним характеристическим временем

$$\tau^{-1} = k_i = k_{12} + k_{21}. \quad (2.189)$$

В кинетике реакции проявляется наиболее быстрый процесс. Так, если $k_{12} \gg k_{21}$, то изменение во времени концентрации активного состояния фермента описывает уравнение

$$E_a = E_0 e^{-k_{12}t}. \quad (2.190)$$

Таким образом, константа скорости инактивации $k_i = k_{12}$ является характеристикой состояния биополимера. Если происходят какие-либо структурные изменения полимера, то они могут проявиться в константе скорости перехода E_a в E_i . Процесс, приводящий к инактивации фермента, может иметь различную физико-химическую природу. Наиболее общим и наиболее часто наблюдаемым эффектом является тепловая денатурация белка, представляющая собой существенную перестройку макромолекулы, изменение третичной и частично вторичной структуры.

Состояние молекул белка в растворе характеризуется набором конформеров, обратимо переходящих друг в друга. Конформационные переходы молекулы определяются в значительной степени двумя параметрами — рН и температурой. При повышении температуры происходит «плавление» некоторых участков белковой молекулы. Если такого рода процессы достигают значительной глубины, могут происходить необратимые изменения структуры, в большинстве случаев приводящие к потере функциональной активности. Этот процесс обычно называют тепловой денатурацией. При каждом значении рН белок характеризуется соответствующим распределением зарядов, создаваемым ионогенными группами. При очень низ-

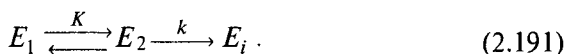
ких или высоких значениях рН распределение зарядов может существенно «поляризовать» молекулу белка, приводить к появлению изомеров, способных необратимо конформировать с разрушением структуры активного центра.

При изучении такого рода процессов важная информация получена релаксационными методами. Как правило, конформационные изменения сопровождаются изменением окружения ароматических аминокислот — тирозина и триптофана (~290 нм). Это проявляется в изменении спектров поглощения и флуоресценции и позволяет следить за изменениями белка. Обратимые конформационные изменения, индуцируемые изменением температуры или рН, протекают в диапазоне 0,1–100 мс, необратимые денатурационные изменения в зависимости от условий имеют характеристические времена 1–10³ мин.

Помимо денатурационных воздействий тепла или рН, инактивация ферментов может быть вызвана применением денатурирующих агентов, разрушающих вторичную структуру белка, таких, как мочевина или гуанидинхлорид. Иногда, особенно при инактивации ферментов, включающих в активные центры тиольные группы, существенную роль играют окислительные процессы с участием кислорода.

Если обратимые конформационные изменения протекают относительно быстро и в каждый момент времени конформационные равновесия успевают устанавливаться, кинетика инактивации будет описываться одноэкспоненциальным уравнением, однако в наблюдаемую константу скорости инактивации будут входить константы равновесия конформационных изменений.

Рассмотрим простейшую кинетическую схему инактивации с участием равновесия конформеров:



где E_1 , E_2 , E_i — конформационные состояния белка, при этом E_i не обладает функциональной активностью.

Данную кинетическую схему описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dE_i}{dt} = kE_2 \\ K = E_1/E_2 \\ E_0 = E_1 + E_2 + E_i \end{cases}$$

Из уравнения материального баланса следует:

$$\begin{aligned} \frac{dE_2}{dt}(1+K) + \frac{dE_i}{dt} &= 0; \\ -\frac{dE_2}{dt} &= \frac{k}{1+K} E_2. \end{aligned}$$

Соответственно кинетика процесса описывается одним характеристическим временем

$$\begin{aligned} k_i &= \tau^{-1} = \frac{k}{1+K}; \\ E_2 &= E_0 \exp[-k_i t]. \end{aligned} \quad (2.192)$$

где k_i — наблюдаемая константа скорости инактивации.

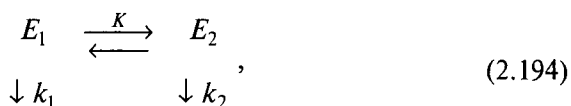
В зависимости от термодинамических характеристик процесса наблюдаемая константа скорости инактивации отражает или не отражает равновесие, предшествующее скоростью определяющей стадии:

1. Если переход системы $E_1 \leftrightarrow E_2$ является термодинамически выгодным, то $K \ll 1$, $k_i = k$.

2. Если образование конформера E_2 термодинамически невыгодно, то $K \gg 1$, т.е.

$$k_i = \frac{k}{K}. \quad (2.193)$$

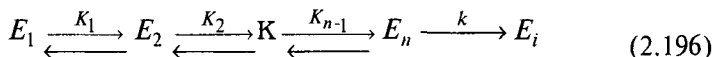
Термодинамически невыгодная быстрая равновесная стадия существенно уменьшает скорость денатурации белка. В случае, если инактивации подвержены оба конформера



наблюдаемая константа скорости инактивации будет дана уравнением

$$k_i = \tau^{-1} = \frac{k_1 + Kk_2}{1+K}. \quad (2.195)$$

В несколько более общем виде для системы с участием n конформеров



наблюдаемая константа скорости инактивации имеет вид

$$k_i = \tau^{-1} = \frac{k}{1 + K_{n-1} \{1 + K_{n-2} [1 + \dots + K_2 (1 + K_1)]\}} \quad (2.197)$$

Если конформационные изменения термодинамически невыгодны, наблюдаемая константа скорости инактивации отражает множество конформационных изменений белка:

$$k_i = \frac{k}{\prod_{j=1}^{n-1} K_j} \quad (2.198)$$

С механистической точки зрения тепловая денатурация белков, по-видимому, протекает именно таким образом. Соответственно наблюдаемая константа скорости является мерой конформационных изменений, и из исследования инактивационных процессов можно получить информацию о конформационных состояниях молекулы белка.

С другой стороны, очевидно, что эффекты, приводящие к изменению скорости инактивации, например стабилизации или дестабилизации белка, могут проявляться как на лимитирующей стадии реакции, так и на стадии равновесных конформационных изменений, оказывая влияние на константы равновесия.

рН-зависимость инактивации

Природа инактивирующего воздействия может быть различной. Для целей инактивации могут быть использованы тепло,

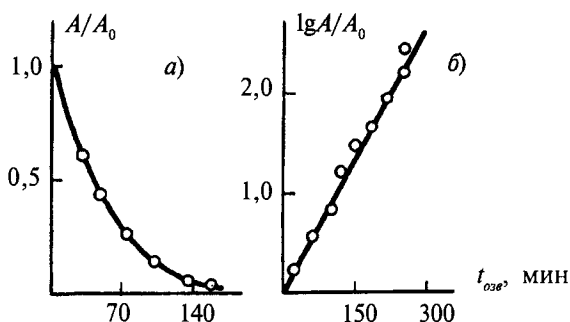


Рис. 2.86. Кинетика инактивации α -химотрипсина под действием ультразвука.

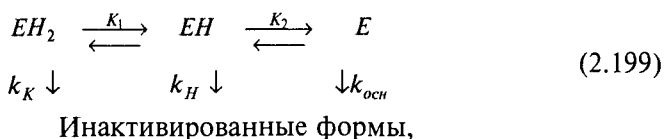
a — изменение активности; *б* — линейная анаморфоза в полулогарифмических координатах и определение k_i .

кавитационный ультразвук, радиоактивное излучение.

Инактивация α -химотрипсина под действием кавитационного ультразвука. Интересные экспериментальные результаты получены при изучении конформационных изменений белка, сопряженных с изменением рН и перераспределением зарядов на белковой глобуле. Как правило, инактивация ферментов существенно возрастает или замедляется в сильнокислых или

щелочных растворах. Была изучена кинетика инактивации химотрипсина под действием ультразвука. В диапазоне концентраций фермента 10^{-7} – 10^{-6} М кинетика инактивации достаточно строго описывается одноэкспоненциальным уравнением (рис. 2.86). Исследование кинетики инактивации α -химотрипсина ультразвуком показало, что скорость инактивации резко падает при кислых и щелочных значениях рН раствора. На рис. 2.87 приведена зависимость константы скорости инактивации фермента в поле кавитационного ультразвука как функции концентрации ионов водорода.

Простейшая кинетическая схема, согласующаяся с экспериментальными данными, имеет вид



где E , EH , EH_2 — основное, нейтральное и кислотное состояния молекулы белка соответственно; $k_{осн}$, k_H и k_K — константы скорости инактивации, характеризующие эти состояния; K_1 , K_2 — равновесные константы переноса протона. Данную кинетическую схему описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dE_i}{dt} = k_K EH_2 + k_H EH + k_{осн} E \\ E_0 = EH_2 + EH + E + E_i \\ K_1 = \frac{EH \times H^+}{EH_2}, \quad K_2 = \frac{E \times H^+}{EH} \end{cases}$$

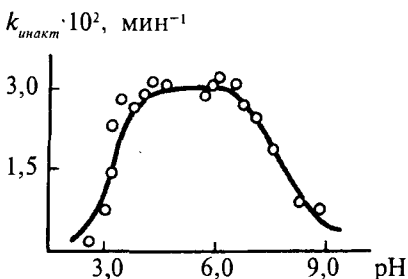


Рис. 2.87. рН-зависимость константы скорости инактивации α -химотрипсина в поле кавитационного ультразвука.

Соответственно наблюдаемая константа скорости инактивации имеет вид

$$k_i = \frac{k_K \frac{H^+}{K_1} + k_H + k_{осн} \frac{K_2}{H^+}}{1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}} \quad (2.200)$$

или

$$\rho = \frac{k_i}{k_H} = \frac{1 + \frac{k_K H^+}{k_H K_1} + \frac{k_{осн} K_2}{k_H H^+}}{1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}} \quad (2.201)$$

При кислых или щелочных значениях рН, когда система полностью переходит в состояние *E* или *EH*₂, инактивация существенно замедляется. Это означает, что $k_H \gg k_K$ и $k_H \gg k_{осн}$. Соответственно уравнение (2.201) может быть записано в виде

$$\rho = \frac{1}{1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}} \quad (2.202)$$

1. Если $H^+ \ll K_1$, $H^+ \ll K_2$, то $k_i = \frac{k_H H^+}{K_2}$, т.е. константа скорости инактивации линейно растет с увеличением концентрации ионов водорода (кривая на рис. 2.87, правая часть).

2) Если $H^+ \gg K_2$, $H^+ \ll K_1$, то $k_i = k_H$, т.е. константа скорости инактивации не зависит от рН (горизонтальный участок, рис. 2.87).

3) Если $H^+ \gg K_1$, $H^+ \gg K_2$, то $k_i = \frac{k_H K_1}{H^+}$, т.е. константа скорости инактивации падает с ростом рН (левая часть кривой на рис. 2.87). Из экспериментальных данных, представленных в логарифмических координатах, в соответствии с известными методами [Березин, Клесов, 1976], могут быть найдены рК ионогенных групп, контролирующих инактивацию фермента. Эти величины равны 3,3 и 8,3. Было сделано предположение, что эти ионогенными группами являются карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты-194 и α-аминогруппа остатка изолейцина-16, образующие солевой мостик, поддерживающий конфор-

мацию активного центра α -химотрипсина. Известно, что разрушение этого солевого мостика за счет протонирования карбоксильной группы или за счет депротонирования аминогруппы ведет к существенному изменению конформации активного центра фермента, приводящему к нарушению каталитической функции.

Однако в процессе инактивации ультразвуком эти конформационные состояния активного центра более устойчивы. Показано, что инаktivация α -химотрипсина в поле кавитационного ультразвука происходит за счет разрушения триптофана-215, входящего в активный центр α -химотрипсина. По-видимому, в развернутом, каталитически неактивном состоянии активного центра триптофан-215 становится менее доступным свободным радикалам, которые возникают под действием ультразвука и приводят к инаktivации фермента.

Схемы инаktivации, описываемые суммой двух экспонент

Достаточно распространены случаи, в которых кинетика инаktivации описывается не простой экспоненциальной функцией типа (2.190), а более сложным уравнением. Например, на рис. 2.88 представлены экспериментальные данные по кинетике инаktivации гидрогеназы при инкубации фермента на воздухе при 30°C. Эта кинетическая кривая описывается функцией вида

$$A = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} \quad (2.203)$$

Параметры a_1 , a_2 , $1/\tau_1$ и $1/\tau_2$ могут быть найдены при использовании полулогарифмических координат (рис. 2.89).

Двухфазная кинетика инаktivации — характерная черта гидрогеназы из различных источников. Кинетические закономерности такого рода могут быть объяснены общим механизмом инаktivации, включающим существование двух форм фермента, различающихся активностью и устойчивостью к денатурирующим воздействиям

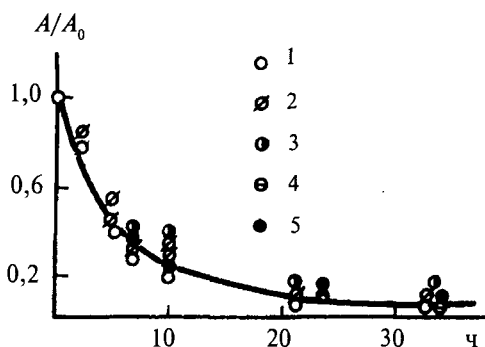


Рис. 2.88. Кинетика инаktivации гидрогеназы при инкубации фермента на воздухе при 30°C.

pH: 1 — 5; 2 — 6; 3 — 7; 4 — 8; 5 — 9.

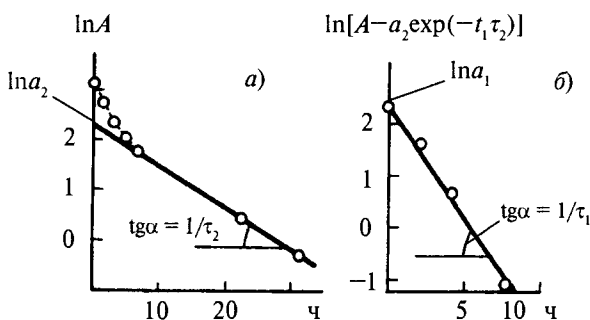
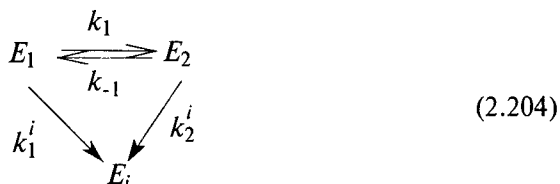


Рис. 2.89. Определение параметров a_1 , a_2 , $1/\tau_1$ и $1/\tau_2$ из данных рис. 2.88 в полулогарифмических координатах.

a — определение параметров «медленной» экспоненты; b — определение параметров «быстрой» экспоненты.



где k_1 , k_{-1} — константы скорости превращения активных форм фермента друг в друга; k_1^i , k_2^i — константы скорости инактивации фермента.

Кинетику процесса описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dE_i}{dt} = k_1^i E_1 + k_2^i E_2 \\ \frac{dE_1}{dt} = k_{-1} E_2 - (k_1 + k_1^i) E_1 \\ E_0 = E_i + E_1 + E_2 \end{cases} \quad (2.205)$$

Из этих уравнений следует:

$$E_2 = \frac{1}{k_{-1}} \left[\frac{dE_1}{dt} + (k_1 + k_1^i) E_1 \right]; \quad \frac{dE_i}{dt} = -\frac{dE_1}{dt} - \frac{dE_2}{dt}.$$

Таким образом, система уравнений может быть сведена в линейное дифференциальное уравнение второго порядка

$$\frac{d^2 E_1}{dt^2} + (k_1 + k_{-1} + k_1^i + k_2^i) \frac{dE_1}{dt} + [k_1^i k_{-1} + k_2^i (k_1 + k_1^i)] E_1 = 0. \quad (2.206)$$

Характеристическое уравнение имеет два действительных корня λ_1 и λ_2 :

$$\lambda^2 + (k_1 + k_{-1} + k_1^i + k_2^i) \lambda + [k_1^i k_{-1} + k_2^i (k_1 + k_1^i)] = 0. \quad (2.207)$$

$$\lambda_{1,2} = -\frac{(k_1 + k_{-1} + k_1^i + k_2^i)}{2} \pm \sqrt{\frac{(k_1 + k_{-1} + k_1^i + k_2^i)^2}{4} - [k_1^i k_{-1} + k_2^i (k_1 + k_1^i)]}. \quad (2.208)$$

Решение дифференциального уравнения (2.206) имеет вид

$$E_1(t) = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t}. \quad (2.209)$$

Параметры C_1 и C_2 определяются из начальных условий и зависят от исходных концентраций и констант скоростей механизма (2.204).

Инвариантными характеристиками процесса являются кинетические параметры λ_1 и λ_2 . Концентрация E_2 как функция времени:

$$E_2(t) = \frac{\lambda_1 + k_1 + k_1^i}{k_{-1}} C_1 e^{\lambda_1 t} + \frac{\lambda_2 + k_1 + k_1^i}{k_{-1}} C_2 e^{\lambda_2 t}. \quad (2.210)$$

Как видно, концентрация формы E_2 описывается суммой двух экспоненциальных членов, показатели экспонент которых те же корни λ_1 и λ_2 характеристического уравнения (2.207). Изменение во времени регистрируемой на опыте активности фермента описывается уравнением

$$A(t) = \alpha_1 E_1(t) + \alpha_2 E_2(t) \quad (2.211)$$

и соответственно определяется параметрами λ_1 и λ_2 .

Определяемые из эксперимента величины τ_1 и τ_2 [см. (2.203) и рис. 2.88, 2.89] связаны с параметрами λ_1 и λ_2 уравнением

$$\tau_{1,2} = 1/\lambda_{1,2} \quad (2.212)$$

и соответственно с элементарными константами механизма реакции достаточно сложным уравнением (2.207). Как корни квадратного уравнения параметры λ_1 и λ_2 связаны с элементарными константами соотношениями

$$\begin{aligned} -(\lambda_1 + \lambda_2) &= k_1 + k_{-1} + k_1^i + k_2^i, \\ \lambda_1 \lambda_2 &= k_1^i k_{-1} + k_2^i (k_1 + k_1^i). \end{aligned} \quad (2.213)$$

Из приведенных уравнений видно, что определение элементарных констант из одной кинетической кривой невозможно. Кинетическая схема включает четыре константы, в то время как экспериментальных кинетических параметров λ_1 и λ_2 только два. Однако если константы скорости схемы (2.204) существенно различаются по абсолютным величинам и имеется информация, что какие-то процессы практически не идут, ситуация существенно упрощается.

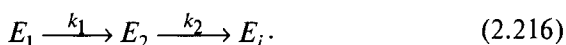
1. Если равновесие в схеме (2.204) сильно «заморожено», $k_1 = 0$, $k_{-1} = 0$. В этом случае схема процесса имеет вид



Фермент в исходном состоянии представлен двумя формами, которые инактивируются независимо друг от друга:

$$\frac{1}{\tau_1} = k_1^i, \quad \frac{1}{\tau_2} = k_2^i. \quad (2.215)$$

2. Если $k_1^i = 0$, $k_{-1} = 0$, имеет место последовательный механизм инактивации фермента

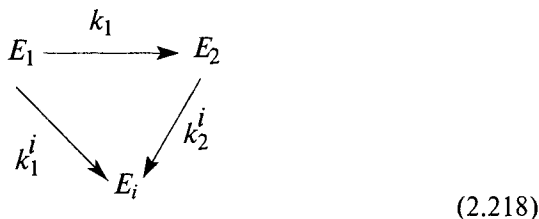


В этом случае

$$1/\tau_1 = k_1, \quad 1/\tau_2 = k_2^i. \quad (2.217)$$

Согласно этому механизму в процессе инактивации фермента происходит образование каталитически активной, но нестабильной формы фермента.

3. Если $k_{-1} = 0$, схема инактивации имеет вид



и

$$1/\tau_1 = k_1 + k_1^i, \quad 1/\tau = k_2^i. \quad (2.219)$$

Можно сделать важный вывод: вне зависимости от конкретных деталей механизма и соотношения элементарных констант

двухэкспоненциальный характер инактивации показывает, что механизм инактивации включает две различающиеся по активности или устойчивости формы фермента.

Таким образом, обсуждаемая выше инаktivация гидрогеназы в присутствии кислорода протекает с участием по крайней мере двух состояний фермента. В механизме катализа гидрогеназами кинетический процесс, характеризуемый временем τ_2 , в отсутствие кислорода практически не имеет места. В этих условиях кинетика процесса, характеризуемая параметром τ_1 , отражает, по-видимому, тепловую денатурацию белка. В присутствии кислорода появляется второй экспоненциальный член в кинетике инактивации. В этих условиях происходят, по-видимому, процессы окисления функционально важных групп активного центра фермента, что влечет за собой его необратимую инактивацию.

Диссоциативный механизм инактивации ферментов

Специфическую группу кинетических закономерностей инактивации обнаруживают олигомерные ферменты, инаktivация которых происходит через промежуточную диссоциацию олигомера на субъединицы. Закономерности этой группы ферментов исследованы О. Полтаракм и Е. Чухрай.

Оказалось, что часто ферменты в димерной или, в общем случае в олигомерной форме стабильнее, чем составляющие их субъединицы. Для фермента из двух субъединиц диссоциация имеет вид

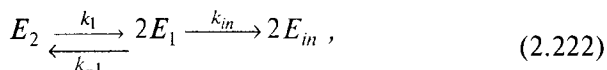


Константа равновесия дается уравнением

$$K = (E_1)^2 / E_2 , \quad (2.221)$$

где E_1 — мономер, E_2 — димер.

Для многих ферментов при повышении температуры константа равновесия при диссоциации олигомера увеличивается. Это означает, что с повышением температуры растет концентрация мономера и уменьшается концентрация димера. Если димер существенно стабильнее, чем мономер, кинетическую схему инактивации можно представить в виде



где E_{in} — денатурированная неактивная форма фермента.

Процесс инактивации фермента описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dE_{in}}{dt} = k_{in} E_1; \\ \frac{dE_1}{dt} = k_1 E_2 - k_{in} E_1 - 2k_{-1} E_1^2; \\ E_0 = E_2 + 2E_1 + 2E_{in}. \end{cases}$$

Точное аналитическое решение этой системы невозможно вследствие наличия нелинейности в виде квадратного члена $k_{-1} E_1^2$. Был развит ряд приближений, позволяющих достаточно точно описать процесс инактивации, идентифицировать механизм и получить его кинетические характеристики.

Для случая диссоциации термоинактивации типичная зависимость относительной активности фермента от времени при условии, что димер каталитически активен, представлена на рис. 2.90.

Экспериментальные данные в этом случае удобно представить в полулогарифмических координатах в виде зависимости $\ln v/v_0$ от t , где v_0 — скорость реакции в начальный момент времени, v — скорость реакции (активность фермента) во времени t . Типичным является характерный излом на этой зависимости. Абсцисса точки пересечения ассимптот первого и второго участка кривой дает характеристическое время τ .

Принципиальный вопрос заключается в том, как диссоциативную инактивацию отличить от инактивации, протекающей по другим механизмам? Ответ достаточно прост. Он следует из механизма инактивации. Наличие бимолекулярного члена в уравнениях

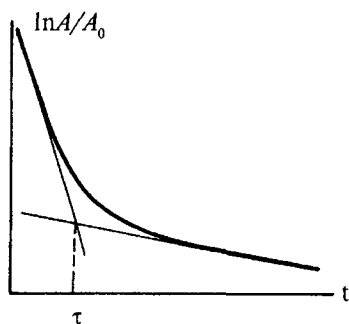


Рис. 2.90. Типичная зависимость термоинактивации относительной активности фермента от времени в случае диссоциативного механизма инактивации.

скорости должно приводить к зависимости инактивационных кривых от общей концентрации фермента, вводимого в реакцию. Это характерно только для диссоциативных механизмов инактивации. Было показано, что характер кинетической кривой зависит от концентрации фермента и закономерно изменяется при вариации его начальной концентрации.

Сложный характер кинетической кривой инактивации должен наблюдаться в сравнительно узком интервале концентраций. При $E_0 \gg K$ равновесно сдвинуто в сто-

рону димера и излом практически не наблюдается, при $E_0 \ll K$ фермент находится почти полностью в мономерной форме и излом также отсутствует. Появление излома можно ожидать лишь при концентрациях фермента, сопоставимых с K . Таким образом, зависимость кинетики инактивации от концентрации фермента является критерием диссоциативной инактивации. На рис. 2.91 приведены кинетические кривые термоинактивации ацилазы X при различных температурах. Видно, что при температуре 62,5°C сложная кривая инактивации «вырождается» в простую экспоненциальную функцию. Это соответствует условию $K \gg E_0$. Зависимость кинетических кривых инактивации от концентрации белка для этого фермента представлена на рис. 2.92. Видно, что характер инактивации зависит от концентрации фермента.

Согласно Полтораку и Чухрай параметры процесса могут быть определены при использовании следующего уравнения, полученного на основе ряда приближений:

$$K = 4E_0 \frac{(v_0 - v_\tau)^2}{v_0 v_\tau}, \quad (2.223)$$

где v_τ — скорость реакции (активность фермента) при времени излома τ .

Значение константы скорости диссоциации можно найти на основе следующего приближенного уравнения:

$$2\left(\frac{v}{v_0}\right) - \frac{1}{2}\left(\frac{v}{v_0}\right)^2 = \frac{3}{2} - k_1 t \quad (2.224)$$

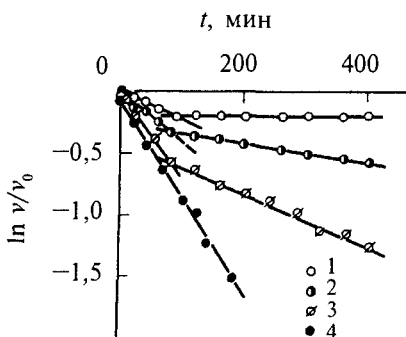


Рис. 2.91. Кинетика термоинактивации ацилазы X .

Условия: рН 7,2 и температура 55°C (1), 57,5°C (2), 60°C (3), 62,5°C (4) [Полтораку, Чухрай, 1986].

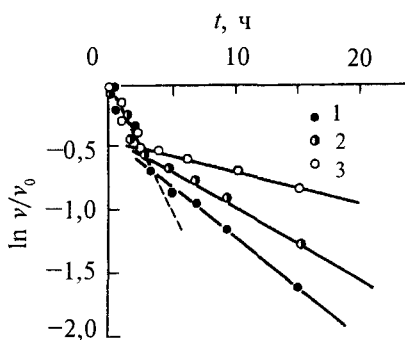


Рис. 2.92. Кинетика термоинактивации почечной ацилазы X при 55°C и рН 7,2.

$E_0 = 0,5$ (1), 0,7 (2), 1 (3) мг/мл [Полтораку, Чухрай, 1986].

из зависимости функции, представленной левой частью этого уравнения от времени. Соответственно k_{-1} определяется из значения K или при использовании приближенного уравнения

$$\frac{1}{t} \ln \frac{v}{v_0} = -k_1 + \frac{4}{3} k_{-1} k_1^2 E_0 t^2. \quad (2.225)$$

Значение константы скорости инактивации k_{in} удобно определять при условии, когда процесс диссоциации практически закончился, при $t > \tau$. В этих условиях справедливы уравнения

$$\begin{aligned} -\frac{d \ln E_2}{dt} &= k_{эфф}; \\ k_{in} &= \frac{k_{эфф}(v_0 + v_\tau)}{2(v_0 - v_\tau)}. \end{aligned} \quad (2.226)$$

Для почечной ацилазы X на основании экспериментальных данных, представленных на рис. 2.91 и 2.92, а также при дополнительном исследовании рН-зависимости найдены следующие параметры: $K/E_0 = 1$ (60°C); 0,2 (55°C); 10^{-3} (37°C); $k_1 = 1,9 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$; $k_1/k_{in} = 8,4$ (рН 5,8); 6,51 (рН 9,35); 11,6 (рН 7,2).

Инактивация фермента в процессе реакции.

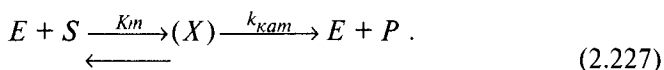
Кинетическое описание и дискриминация механизмов

Известны ферментативные реакции, для которых наблюдается потеря активности ферментом в процессе ферментативного превращения. Так, арилсульфатаза полностью инактивируется в течение ферментативной реакции. Аналогичные эффекты наблюдались при исследовании кинетики катализа бактериальными гидрогеназами. Интерес к изучению кинетики ферментативных реакций с истощением системы по субстрату и с инактивацией фермента в процессе реакции в значительной степени стимулировало исследование простагландинсинтетазы — полиферментного комплекса, осуществляющего превращение арахидоновой кислоты в простагландины.

Исследование закономерностей инактивации фермента в процессе реакции представляет специальный интерес, поскольку инактивация фермента может составлять один из механизмов регуляции ферментативной активности. Изучение кинетики и механизма инактивации ферментов составляет одну из задач биокинетики. Выше были рассмотрены закономерности инактивации ферментов, в которых концентрация субстрата постоянна, не является переменной величиной. Однако в большинстве случаев в процессе протекания ферментативной реакции в закры-

тых системах весьма существенное влияние на динамику реакции оказывает истощение системы по субстрату.

Механизм ферментативной реакции превращения субстрата S в продукт P включает образование промежуточных соединений фермента с субстратом X :



В общем случае в системе находятся четыре компонента E , S , X , P , концентрации которых изменяются во времени и взаимодействие между которыми может приводить к инаktivации фермента. Можно представить несколько механизмов, по которым происходит инаktivация фермента.

1. «Элементарная» стадия инаktivации представляет собой мономолекулярный процесс, протекающий с постоянной частотой, с интенсивностью отказов k_i :



С физической точки зрения этот процесс может представлять, например, тепловую денатурацию фермента.

2. Инаktivация может протекать через промежуточное фермент-субстратное соединение



в условиях, когда свободная форма фермента E существенно стабильнее промежуточного соединения.

3. Инаktivация фермента происходит через взаимодействие с субстратом



Протекающая параллельно с ферментативным процессом бимолекулярная реакция фермента с субстратом приводит к накоплению в системе неактивной формы фермента E_i .

4. Взаимодействием, приводящим к инаktivации фермента, может быть параллельная реакция с продуктом каталитического превращения. В простейшем случае эта реакция представляет собой бимолекулярный процесс



Очевидно, что для различных механизмов инаktivации динамика изменения концентраций компонентов в системе будет различна. Экспериментальное исследование кинетики реакций должно дать информацию о механизме инаktivации.

В соответствии с методологией кинетического исследования ниже дано кинетическое описание ферментативных реакций, протекающих в соответствии со схемой Михаэлиса-Ментен с учетом инактивации фермента по одному из указанных выше механизмов при истощении системы по субстрату в процессе ферментативного превращения; сопоставление кинетических зависимостей для различных механизмов инактивации с целью дискриминации различных механизмов, приводящих к потере каталитической активности; выявление общих закономерностей процессов, не зависящих от механизма инактивации, и решение обратной задачи — определение истинных характеристик ферментативной реакции и процесса инактивации фермента.

Мономолекулярная инактивация свободной формы фермента

Рассмотрим кинетику процесса для ферментативной реакции, в которой инактивация фермента протекает через свободную форму фермента. Кинетику процесса в условиях стационарности по фермент-субстратному промежуточному соединению и избытка субстрата $S_0 \gg E_0$ описывает система уравнений

$$\begin{cases} -\frac{dS}{dt} = k_{\text{кам}} X \\ \frac{dE_i}{dt} = k_i E \\ E_0 = E + X + E_i \\ K_m = \frac{E \times S}{X} \end{cases}.$$

Из уравнений следует:

$$E = E_0 e^{-k_i t}. \quad (2.232)$$

Интегрирование дифференциального уравнения с разделяющимися переменными при начальных условиях $t = 0$, $P = 0$ приводит к неявной функции, отражающей изменение концентрации продукта в зависимости от времени и параметров реакции:

$$K_m \ln \frac{S_0}{S_0 - P} = \frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i} (1 - e^{-k_i t}). \quad (2.233)$$

Представляется полезным введение безразмерной переменной, степени конверсии субстрата:

$$\alpha = \frac{S_0 - S}{S_0} . \quad (2.234)$$

С учетом этого соотношения интеграл будет иметь вид

$$\alpha - \frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha) = \frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i S_0} (1 - e^{-k_i t}) . \quad (2.235)$$

При $t \rightarrow \infty$ степень конверсии субстрата выходит на предельный уровень $\alpha_{\text{lim}} \leq 1$, который связан с начальными концентрациями фермента, субстрата и кинетическими характеристиками процессов уравнением

$$- \frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha_{\text{lim}}) = \frac{V_m}{k_i S_0} - \alpha_{\text{lim}} , \quad (2.236)$$

где V_m — максимальная скорость ферментативной реакции при данной концентрации фермента.

На рис. 2.93 приведены зависимости правой и левой частей уравнения (2.236) как функции α при различных значениях K_m/S_0 и $k_{\text{кам}} E_0/k_i S_0$. Точка пересечения этих функций дает значения α_{lim} . Видно, что чем меньше значение K_m/S_0 , тем ближе α_{lim} к величине $k_{\text{кам}} E_0/k_i S_0$.

Рассмотрим ряд наиболее важных частных случаев.

1. Степень конверсии субстрата мала, $\alpha \ll 1$. Разложение логарифмической функции уравнения (2.235) в ряд относительно α и пренебрежение членами высшего порядка малости приводят к уравнению

$$\alpha = \frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i (S_0 + K_m)} (1 - e^{-k_i t})$$

или

$$\alpha = \frac{v_0}{k_i S_0} (1 - e^{-k_i t}) , \quad (2.237)$$

где v_0 — начальная стационарная скорость реакции.

На рис. 2.94 приведены зависимости степени конверсии от безразмерного времени $\tau = k_i t$ при

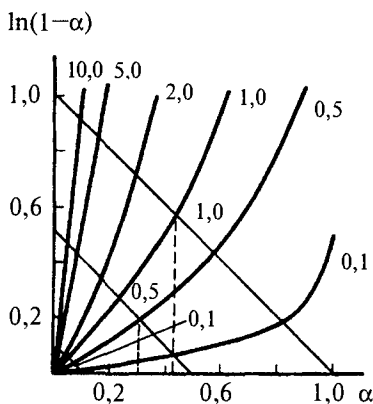


Рис. 2.93. Зависимости левой (кривые линии) и правой (прямые линии) частей уравнения (2.236) от α .

Цифры на прямых дают значения $(k_{\text{кам}} E_0)/(k_i S_0)$, на кривых — K_m/S_0 .

различных начальных концентрациях фермента. В процессе протекания реакции степень конверсии субстрата не достигает единицы и выходит на предельное значение, определяемое начальной стационарной скоростью реакции и константой скорости инактивации фермента:

$$\alpha_{\lim_{t \rightarrow \infty}} = \frac{k_{\kappa am} E_0}{k_i (S_0 + K_m)} = \frac{v_0}{k_i S_0}. \quad (2.238)$$

В этих условиях предельная степень конверсии субстрата или предельный выход продукта линейно зависят от концентрации вводимого в реакцию фермента.

Кинетические кривые накопления продукта или степени конверсии субстрата, снятые при различных концентрациях фермента, должны спрямляться в полулогарифмических координатах, при этом тангенс угла наклона прямой равен константе скорости инактивации фермента. Кинетические кривые, полученные при различных концентрациях фермента, могут быть трансформированы в одну прямую линию.

2. При степенях конверсии субстрата, близких к единице, логарифмический член уравнения (2.235) должен заметно превышать степень конверсии субстрата

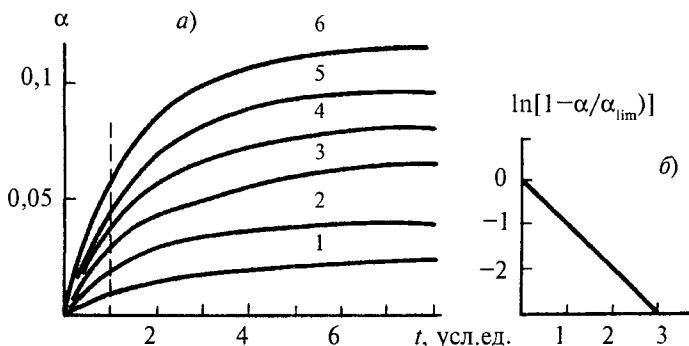


Рис. 2.94. Кинетические кривые изменения степени конверсии субстрата (накопление продукта) для системы с инактивацией свободной формы фермента при низких степенях конверсии субстрата [см. уравнение (2.237)].

а — соотношения начальных концентраций фермента: $E_{01} = E_{02}/2 = E_{03}/3 = E_{04}/4 = E_{05}/5 = E_{06}/6$ (кривые 6, 5, 4, 3, 2, 1 соответственно); б — линеаризация данных рис. 2.94а в полулогарифмических координатах.

$$-\frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha) \gg \alpha,$$

или

$$(1 - \alpha)e^{\frac{S_0}{K_m} \alpha} < 1. \quad (2.239)$$

На рис. 2.95 приведен численный расчет левой части неравенства (2.239) как функции α при различных значениях параметра K_m/S_0 . Видно, что неравенство (2.239) может выполняться лишь при α , весьма близких к единице (заштрихованная область), при этом данное условие выполняется лучше при высоких значениях K_m/S_0 .

С учетом (2.239) зависимость степени конверсии от времени дается уравнением

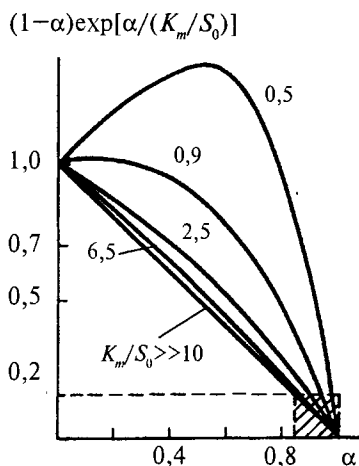


Рис. 2.95. Численный расчет левой части неравенства (2.239) как функции степени конверсии субстрата при различных значениях K_m/S_0 (цифры на кривых).

$$\alpha = 1 - \exp\left[\frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i K_m} (e^{-k_i t} - 1)\right] \quad (2.240)$$

или

$$-\ln(1 - \alpha) = a_{\text{lim}} (1 - e^{-k_i t}), \quad (2.241)$$

где

$$a_{\text{lim}} = \frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i K_m}.$$

Соответственно кинетические кривые линеаризуются в полупологарифмических координатах

$$\ln\left[1 + \frac{\ln(1 - \alpha)}{a_{\text{lim}}}\right] = -k_i t \quad (2.242)$$

при всех использованных концентрациях фермента.

Предельная степень конверсии субстрата является следующей функцией концентрации фермента:

$$\alpha_{\text{lim}} = 1 - e^{-\frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i K_m}}. \quad (2.243)$$

Таким образом, при увеличении концентрации фермента предельный выход стремится к единице.

3. Важный частный случай реализуется в условиях

$$\tau = k_i t \ll 1 \text{ или } k_{\text{кам}} E_0 \gg k_i S_0. \quad (2.244)$$

Разложение экспоненциальной функции (2.235) в ряд относительно τ приводит к уравнению

$$\alpha - \frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha) = \frac{V_m}{S_0} t, \quad (2.245)$$

которое представляет собой «классическое» уравнение Михаэлиса в интегральной форме. При $\tau \ll 1$ инактивацией фермента можно пренебречь. На основе использования интегрального уравнения (2.245) определяются кинетические параметры действия фермента V_m и K_m при использовании, например, анаморфозы:

$$-\frac{\ln(1 - \alpha)}{\alpha} = \frac{V_m}{K_m} \frac{t}{\alpha} - \frac{S_0}{K_m}. \quad (2.246)$$

Мономолекулярная инактивация фермента, протекающая через фермент-субстратный комплекс

Рассмотрим кинетические закономерности ферментативной реакции при условии, что инактивация протекает мономолекулярно через фермент-субстратный комплекс [см. (2.229)]. В условиях стационарности по промежуточному соединению и при избытке субстрата $S_0 \gg E_0$ кинетику процесса описывает система дифференциальных и алгебраических уравнений

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = (k_{\text{кам}} + k_i)X \\ \frac{dE_i}{dt} = k_i X \\ E_0 = E + X + E_i \\ K_m = \frac{E \times S}{X} \end{cases}$$

Из этих уравнений следует, что концентрация инактивированной формы фермента связана с концентрацией субстрата соотношением

$$E_i = \frac{k_i}{k_{\text{кам}} + k_i} (S_0 - S).$$

Соответственно концентрацию промежуточного соединения можно вычислить по уравнению

$$X = \frac{E_0 - \frac{k_i}{k_{\kappa am} + k_i}(S_0 - S)}{1 + K_m/S}.$$

При переходе к безразмерной переменной степени конверсии субстрата данное уравнение представляется в виде

$$\begin{aligned} & \frac{K_m/S_0}{1 - \frac{k_i S_0}{(k_i + k_{\kappa am})E_0}} \ln \frac{1 - \frac{k_i S_0}{(k_i + k_{\kappa am})E_0} \alpha}{1 - \alpha} - \\ & - \frac{1}{\frac{k_i S_0}{(k_i + k_{\kappa am})E_0}} \ln \left[1 - \frac{k_i S_0}{(k_i + k_{\kappa am})E_0} \right] = \frac{(k_i + k_{\kappa am})E_0}{S_0} t. \end{aligned} \quad (2.247)$$

Видно, что левая часть этого уравнения определяется двумя безразмерными комплексами констант

$$a \equiv \frac{k_i S_0}{(k_i + k_{\kappa am})E_0} \quad \text{и} \quad b \equiv \frac{K_m}{S_0}. \quad (2.248)$$

Рассмотрим ряд принципиально важных частных случаев.

1. Скорость инактивации фермента существенно превышает максимальную скорость ферментативной реакции $k_i S_0 \gg (k_{\kappa am} + k_i)E_0$:

$$\alpha = \frac{(k_i + k_{\kappa am})E_0}{k_i S_0} \left(1 - e^{-\frac{k_i}{1 + K_m/S_0}} \right). \quad (2.249)$$

В процессе реакции степень конверсии субстрата выходит на предельное значение

$$\alpha_{\lim} = \frac{1}{a} = \frac{(k_i + k_{\kappa am})E_0}{k_i S_0} \ll 1. \quad (2.250)$$

Экспериментальным критерием выполнения этого приближения является величина предельного выхода продукта ($\alpha_{\lim} \ll 1$). В этих условиях из соответствующей линеаризации экспериментальных данных в полулогарифмических координатах

натах на основе уравнения (2.249) может быть найдена эффективная константа скорости инактивации фермента (рис. 2.96)

$$k_{\text{набл}} = \frac{k_i}{1 + K_m/S_0} \quad (2.251)$$

При этом должен наблюдаться эффект «стабилизации» фермента при низких концентрациях субстрата. При «насыщении» фермента субстратом ($S_0 \gg K_m$) эффективная константа скорости инактивации выходит на предельное значение, определяемое константой скорости инактивации фермент-субстратного промежуточного соединения (рис. 2.97).

2. При использовании высоких концентраций фермента, когда степень конверсии равна единице, справедливо соотношение $k_{\text{кат}} E_0 \gg k_i S_0$. При этом уравнение (2.217) трансформируется в интегральную форму уравнения Михаэлиса [см. (2.245)], из которого можно найти значения V_m и K_m ферментативной реакции. В этих условиях инактивация фермента не проявляется в кинетике реакции.

3. Ферментативная реакция протекает в режиме максимальной скорости практически во всем диапазоне изменений концентрации субстрата $b = K_m/S_0 \ll 1$. В этих условиях вне зависи-

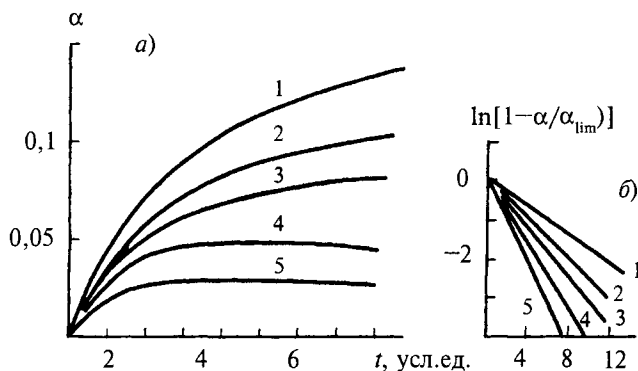


Рис. 2.96. Кинетические кривые изменения степени конверсии субстрата (накопления продукта) для систем с мономолекулярной инактивацией через фермент-субстратный комплекс (или с бимолекулярной инактивацией субстратом) при различных начальных концентрациях субстрата в условиях $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$.

a — соотношения начальных концентраций субстрата $S_{01} = S_{02}/1,5 = S_{03}/2 = S_{04}/3 = S_{05}/5$ (кривые 5, 4, 3, 2, 1 соответственно); *б* — линеаризация данных рис. 48а в полулогарифмических координатах.

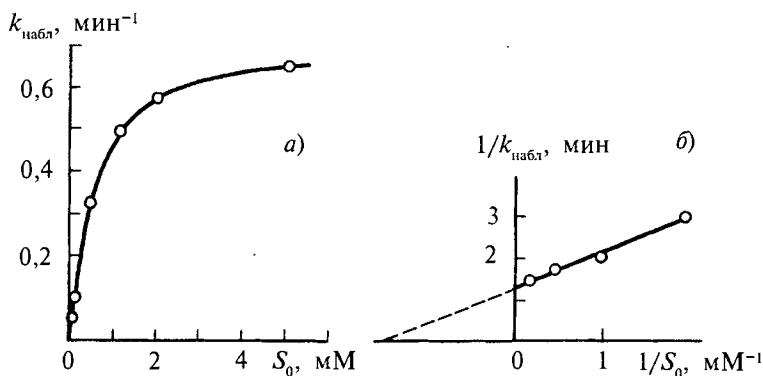


Рис. 2.97. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации фермента от начальной концентрации субстрата в реакции гидролиза нитрокатехола арилсульфатазой *A* (вычислено из данных работы Stinshaff, 1972) (а); линейризация данных *a* в обратных координатах (б).

мости от степени конверсии субстрата кинетика процесса описывается уравнением

$$\alpha = \frac{k_{\text{кам}} E_0}{k_i S_0} (1 - e^{-k_i t}), \quad (2.252)$$

согласно которому все кинетические кривые, снятые при различных концентрациях фермента и субстрата в полулогарифмических координатах этого уравнения, должны «совмещаться» в одну прямую линию, характеризуемую константой скорости инактивации k_i .

4. Ферментативная реакция протекает в бимолекулярном режиме $b = \frac{K_m}{S_0} \gg 1$. Динамику изменения степени конверсии суб-

страта описывает уравнение

$$\alpha = \frac{e^{\frac{V_m}{K_m} \left[1 - \frac{k_i S_0}{(k_{\text{кам}} + k_i) E_0} \right] t} - 1}{e^{\frac{V_m}{K_m} \left[1 - \frac{k_i S_0}{(k_{\text{кам}} + k_i) E_0} \right] t} - \frac{k_i S_0}{(k_{\text{кам}} + k_i) E_0}}. \quad (2.253)$$

В этих условиях в зависимости от соотношения α с единицей реакция может в пределе приводить к выходу, равному единице либо меньше единицы:

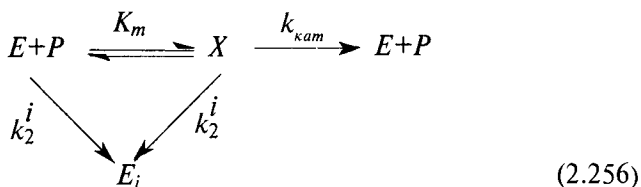
$$\begin{cases} a < 1, \quad \alpha_{\lim} = 1 \\ a > 1, \quad \alpha_{\lim} = \frac{1}{\alpha} = \frac{(k_{kam} + k_i)E_0}{k_i S_0} \end{cases} \quad (2.254)$$

Кинетические кривые, полученные в условиях $\alpha_{\lim} < 1$, должны линеаризоваться в координатах уравнения

$$\ln \frac{1 - \frac{\alpha}{\alpha_{\lim}}}{1 - \alpha} = \frac{V_m}{K_m} (1 - \alpha_{\lim}) t, \quad (2.255)$$

(обычно справедливо $k_i \ll k_{kam}$), на основании которого может быть найден параметр V_m/K_m .

Влияние субстрата на инактивацию фермента. В зависимости от соотношения констант инактивации свободной формы фермента E и фермент-субстратного комплекса субстрат, присутствующий в реакционной среде, может выступать в качестве как стабилизирующего, так и дестабилизирующего фактора. Рассмотрим кинетическую схему с учетом возможности мономолекулярной инактивации как фермента (константа скорости k_1^i), так и фермент-субстратного комплекса (константа скорости k_2^i):



При условии, что реакция протекает в избытке субстрата ($S_0 \gg E_0$) и при небольшой глубине ($\alpha \ll 1$) (предполагается, что за время инактивации фермента его концентрация практически не меняется), кинетика процесса по различным компонентам описывается уравнениями:

$$X(t) = \frac{E_0 S_0}{K_m + S_0} e^{-\frac{k_1^i + k_2^i \frac{S_0}{K_m}}{1 + S_0/K_m} t}; \quad (2.257)$$

$$E(t) = \frac{S_0}{1 + S_0/K_m} e^{-\frac{k_1^i + k_2^i \frac{S_0}{K_m}}{1 + S_0/K_m} t}; \quad (2.258)$$

$$E_i(t) = E_0 \left(1 - e^{-\frac{k_1^i + k_2^i \frac{S_0}{K_m}}{1 + S_0/K_m} t} \right); \quad (2.259)$$

$$P(t) = k_2 \int_0^t X dt = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m k_i + k_1^i S_0} \left(1 - e^{-\frac{k_1^i + k_2^i \frac{S_0}{K_m}}{1 + S_0/K_m} t} \right). \quad (2.260)$$

Видно, что изменения во времени всех компонентов реакции описываются одной и той же экспоненциальной функцией, и кинетические зависимости различаются лишь предэкспоненциальными множителями и постоянными.

Характеристическое время реакции имеет вид

$$k_{набл} = \tau^{-1} = \frac{k_1^i + k_2^i \frac{S_0}{K_m}}{1 + S_0/K_m}. \quad (2.261)$$

Анализ этого уравнения показывает, что в зависимости от соотношения констант k_1^i , k_2^i , K_m и S_0 субстрат может как ускорять, так и предотвращать инактивацию фермента.

1. Если инаktivации подвергается преимущественно свободная форма фермента $k_1^i \gg k_2^i$ ($k_2^i \approx 0$), то

$$\tau^{-1} = \frac{k_1^i}{1 + S_0/K_m}. \quad (2.262)$$

В этом случае увеличение концентрации субстрата уменьшает скорость инаktivации фермента. При $S_0 \gg K_m$ субстрат существенно препятствует инаktivации (случай «защиты» фермента).

2. Если инаktivации подвергается лишь промежуточное соединение $k_1^i \gg k_2^i$ ($k_2^i \approx 0$), то

$$\tau^{-1} = \frac{k_2^i S_0}{K_m + S_0}. \quad (2.263)$$

При $S_0 \ll K_m$ константа скорости инаktivации фермента линейно зависит от концентрации субстрата, при $S_0 \gg K_m$ скорость

инактивации не зависит от S_0 и определяется константой скорости k_2^i .

3. Если инактивации подвергаются свободный фермент и промежуточное соединение с одинаковыми частотами ($k_2^i = k_1^i$), то

$$\tau^{-1} = k_1^i + k_2^i, \quad (2.264)$$

следовательно, субстрат не влияет на инактивацию фермента.

Бимолекулярная инактивация при взаимодействии фермента с субстратом

Система уравнений, описывающая динамику изменений концентрации компонентов для механизма, согласно которому инактивация фермента протекает бимолекулярно при взаимодействии с субстратом [см. (2.230)], может быть представлена в виде

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = k_{\text{кам}} X + k_i E \times S \\ \frac{dE_i}{dt} = k_i E \times S \\ E_0 = E + X + E_i \\ K_m = \frac{E \times S}{X} \end{cases}.$$

Из этих уравнений следует, что концентрация инактивированной формы фермента связана с текущей концентрацией субстрата соотношением

$$E_i = \frac{S_0 - S}{1 + \frac{k_{\text{кам}}}{1 + \frac{k_{\text{кам}}}{k_i K_m}}}.$$

Основное дифференциальное уравнение, описывающее изменение степени конверсии субстрата во времени, можно выразить следующим образом:

$$\left[\frac{1}{(1-\alpha)(1-\alpha a)} + \frac{1}{b(1-\alpha a)} \right] d\alpha = \left(\frac{k_{\text{кам}}}{K_m} + k_i \right) E_0 dt, \quad (2.265)$$

где

$$a \equiv \frac{k_i S_0}{\left(k_i + \frac{k_{kam}}{K_m}\right) E_0}; \quad b \equiv \frac{K_m}{S_0}.$$

Интегрирование этого уравнения при начальных условиях $t = 0$, $\alpha = 0$ приводит к функции

$$\frac{1}{a-1} \ln(1-\alpha) - \left(\frac{1}{a-1} + \frac{1}{ab}\right) \ln(1-\alpha a) = \left(k_i + \frac{k_{kam}}{K_m}\right) E_0 t. \quad (2.266)$$

Анализ полученного уравнения показывает, что оно математически изоморфно уравнению, исследованному выше для случая мономолекулярной инактивации через фермент-субстратный комплекс. Следовательно, на основе простого формально-кинетического анализа эти два механизма дискриминированы быть не могут, и для анализа механизма инактивации необходимо привлекать качественно другие результаты.

Соответственно все частные случаи, рассмотренные выше для механизма инактивации через фермент-субстратный комплекс, могут быть реализованы также для механизма, включающего стадию бимолекулярной инактивации фермента субстратом.

Бимолекулярная инактивация при взаимодействии фермента с продуктом реакции

В условиях стационарности по фермент-субстратному промежуточному соединению и при существенном избытке субстрата по сравнению с ферментом система уравнений, описывающая изменение во времени концентрации компонентов реакции с учетом бимолекулярной стадии (2.231), может быть записана в виде

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = k_{kam} X - k_i E \times P \\ \frac{dE_i}{dt} = k_i E \times P \\ E_0 = E + X + E_i \\ K_m = \frac{E \times S}{X} \end{cases}.$$

Из уравнений следует:

$$\frac{dP}{dE_i} = \frac{k_{\text{кам}}}{K_m k_i} \frac{S_0 - P}{P} - 1. \quad (2.267)$$

Интегрирование этого уравнения приводит к зависимости концентрации инаktivированной формы E_i от концентрации продукта или степени конверсии субстрата

$$E_i = \frac{P}{a+1} - \frac{aS_0}{(a+1)^2} \ln \left(1 - \frac{a+1}{aS_0} P \right);$$

$$E_i = -\frac{S_0}{a+1} \alpha - \frac{aS_0}{(a+1)^2} \ln \left(1 - \frac{a+1}{a} \alpha \right), \quad (2.268)$$

где

$$a \equiv \frac{k_{\text{кам}}}{K_m k_i}.$$

Основное дифференциальное уравнение, описывающее изменение степени конверсии субстрата во времени, представляет собой уравнение с разделяющимися переменными

$$\frac{S_0(1-\alpha) + K_m}{(1-\alpha)(E_0 - E_i)} d\alpha = k_{\text{кам}} dt, \quad (2.269)$$

где E_i — функция, данная уравнением (2.268).

Интеграл левой части уравнения (2.269) представляет собой весьма сложную функцию и в виде конечного числа элементарных функций не берется.

При исследовании механизма реакции и сопоставлении теоретических уравнений с экспериментальными данными ценную информацию несут частные случаи общего интеграла, которые могут быть реализованы в экспериментальных условиях.

Пусть реакция протекает при низких концентрациях фермента в условиях $\alpha \ll 1$ и $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$. В этих условиях при $E_i \rightarrow E_0$, $t \rightarrow \infty$, $\alpha \rightarrow \alpha_{\text{lim}}$. Соответственно справедливо равенство

$$-\frac{S_0}{a+1} \alpha_{\text{lim}} - \frac{aS_0}{(a+1)^2} \ln \left(1 - \frac{a+1}{a} \alpha_{\text{lim}} \right) = E_0. \quad (2.270)$$

При a , соизмеримых с единицей или существенно больших единицы, справедливо неравенство

$$\frac{a+1}{a} \alpha_{\text{lim}} \ll 1$$

Разложение логарифмической функции уравнения (2.270) относительно этого параметра приводит к следующей зависимости предельной степени конверсии субстрата (предельного выхода продукта) от концентрации фермента, субстрата и кинетических характеристик реакции:

$$\alpha_{\text{lim}} = \sqrt{\frac{2k_{\text{кам}}E_0}{k_i K_m S_0}}. \quad (2.271)$$

В условиях $\alpha \ll 1$, $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$ дифференциальное уравнение (2.269) может быть записано в виде

$$\frac{d\alpha}{1 + \frac{S_0}{2aE_0}\alpha^2} = \frac{k_{\text{кам}}E_0}{S_0 + K_m} dt, \quad (2.272)$$

интегрирование которого дает

$$\alpha = \sqrt{\frac{2k_{\text{набл}}E_0}{k_i K_m S_0}} \left(\frac{1 - e^{-\frac{\sqrt{2k_i S_0 K_m k_{\text{кам}} E_0}}{S_0 + K_m} t}}{1 + e^{-\frac{\sqrt{2k_i S_0 K_m k_{\text{кам}} E_0}}{S_0 + K_m} t}} \right). \quad (2.273)$$

или

$$\alpha = \alpha_{\text{lim}} \frac{1 - e^{-k_{\text{набл}} t}}{1 + e^{-k_{\text{набл}} t}}.$$

Проведение реакции при больших концентрациях фермента в условиях

$$\frac{aE_0}{S_0} = \frac{k_{\text{кам}}E_0}{K_m k_i S_0} \gg 1 \quad (2.274)$$

трансформирует уравнение (2.269) в уравнение Михаэлиса, интегральная форма которого позволяет определить характеристики ферментативной реакции v_m и K_m .

Дискриминация механизмов инактивации и определение кинетических характеристик реакции

Выше рассмотрены кинетические закономерности ферментативных реакций, на динамику протекания которых оказывает влияние процесс инактивации фермента. Видно, что кинетические уравнения для различных механизмов инактивации в ряде случаев имеют разный вид, что дает возможность при сопостав-

лении экспериментальных данных с теоретическими уравнениями установить механизм инактивации фермента.

1. *Критерием инактивации фермента в процессе реакции является зависимость выхода продукта (степень конверсии субстрата) от концентрации фермента.* При этом нужно быть уверенным, что реакция проводится в условиях $S_0 \gg E_0$ и «запределивание» реакции не связано с сильным обратным ингибированием процесса продуктом реакции. Последнее условие может быть проверено обычными тестами на обратимость.

2. *Связь степени конверсии субстрата со степенью инактивированности фермента.* Для реакций, протекающих с инактивацией фермента в процессе реакции, степень конверсии субстрата связана со степенью инактивированности фермента β (см. табл. 2.18).

$$\beta = E_i/E_0.$$

На рис. 2.98 приведены расчетные кривые $\beta(\alpha)$ для различных механизмов инактивации. Видно, что при заданных кинетических параметрах предельные выходы, наблюдаемые при $\beta = 1$, располагаются в следующей последовательности: $\alpha_{\text{lim II, III}} > \alpha_{\text{lim IV}} > \alpha_{\text{lim I}}$.

3. *Проведение реакции при низких степенях конверсии субстрата, низких концентрациях фермента.* При $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$ ($\alpha_{\text{lim}} < 0,2$) кинетика накопления продукта (степени конверсии субстрата) для всех

Таблица 2.18

Связь между степенью инактивированности фермента β и степенью конверсии субстрата α для различных механизмов инактивации

Механизм			
I. $E \xrightarrow{k_i} E_i$	II. $X \xrightarrow{k_i} E_i$	III. $E + S \xrightarrow{k_i} E_i$	IV. $E + P \xrightarrow{k_i} E_i$
$\beta_I = \frac{k_i S_0}{k_{kam} E_0} \times$ $\times \frac{K_m}{S_0} \ln(\alpha - 1)$	$\beta_{II} = \frac{k_i S_0}{(k_{kam} + k_i) E_0} \alpha$	$\beta_{III} = \frac{S_0}{\left(1 + \frac{k_{kam}}{k_i K_m}\right) E_0}$	$\beta_{IV} = -\frac{S_0}{E_0} \frac{\alpha}{a+1} -$ $-\frac{S_0}{E_0} \frac{a}{a+1} \times$ $\times \ln\left(1 - \frac{a+1}{a} \alpha\right)$ $a = \frac{k_{kam}}{k_i K_m}$

рассмотренных случаев описывается максимально простыми экспоненциальными уравнениями. Величина α_{lim} достаточно надежно определяется как предел изменения концентраций продукта или субстрата. Из спрямления экспериментальных данных в поллогарифмических координатах могут быть найдены величины $k_{\text{набл}}$ — кинетического параметра, определяющего протекание инактивации фермента во времени. В табл. 2.19 приведены значения $k_{\text{набл}}$ и α_{lim} как функций кинетических характеристик отдельных стадий и начальных концентраций субстрата и фермента. В случае инактивации фермента продуктом экспериментальные данные не должны линейизоваться в соответствии с простым экспоненциальным уравнением, однако могут быть линейизованы в координатах уравнения (2.273). Следует заметить, что искажения кинетических кривых весьма

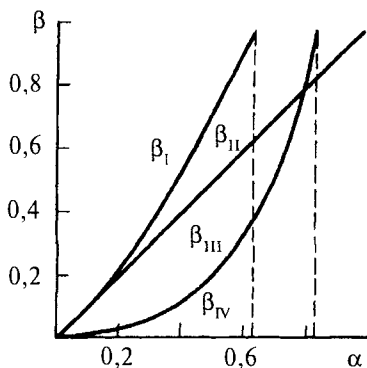


Рис. 2.98. Зависимость степени инактивированности фермента от степени конверсии субстрата для различных механизмов инактивации.

При численном расчете принималось $S_0/E_0 = 10^5$, $k_{\text{кам}}/k_i = 10^3$, $K_m/S_0 = 1$ (для β_I), $k_{\text{кам}}/(K_m k_i) = 10^5$ (для β_{III} , β_{IV}).

в соответствии с простым экспоненциальным уравнением, однако могут быть линейизованы в координатах уравнения (2.273). Следует заметить, что искажения кинетических кривых весьма

Таблица 2.19

Экспериментально определяемые параметры для реакций, протекающих с инактивацией фермента при низких предельных степенях конверсии субстрата ($\alpha_{\text{lim}} \ll 1$)

Механизм	$k_{\text{набл}}$	α_{lim}
I. $E \xrightarrow{k_i} E_i$	k_i	$\frac{k_{\text{кам}}}{k_i(S_0 + K_m)} S_0$
II. $X \xrightarrow{k_i} E_i$	$\frac{k_i S_0}{S_0 + K_m}$	$\frac{k_{\text{кам}}}{k_i S_0} E_0$
III. $E + S \xrightarrow{k_i} E_i$	$\frac{k_i K_m S_0}{K_m + S_0}$	$\frac{k_{\text{кам}}/K_m + k_i}{k_i S_0} E_0$
IV. $E + P \xrightarrow{k_i} E_i$	$\frac{\sqrt{2k_i S_0 K_m k_{\text{кам}} E_0}}{S_0 + K_m}$	$\sqrt{\frac{2k_{\text{кам}} E_0}{k_i S_0 K_m}}$

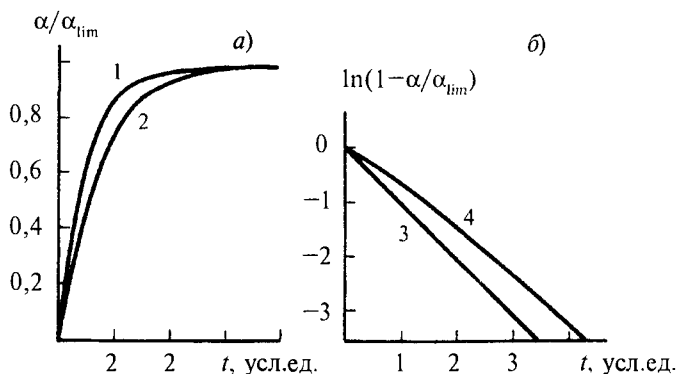


Рис. 2.99. Сравнение кинетической кривой, наблюдаемой при инактивации фермента по механизмам I—III [кривые 1, 3 вычислены по уравнениям (2.237)], и кинетической кривой при инактивации продуктом [кривые 2, 4, вычисленные по уравнению (2.273)].

небольшие (рис. 2.99), и в большинстве случаев точность, по-видимому, не позволяет отличить механизм IV от I—III на основе исследования формы одной кинетической кривой в условиях $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$.

Разграничение механизмов инактивации возможно при изучении зависимости $k_{\text{наб}}$ и α_{lim} от начальных концентраций фермента и субстрата. Предельный выход для механизмов I—III линейно зависит от концентрации фермента, в то время как для механизма инактивации при взаимодействии с продуктом выход линейно зависит от $\sqrt{E_0}$. Показатель экспонент, описывающих временную функцию инактивации для механизма IV, также зависит от концентрации фермента, при этом для механизмов I—III наблюдаемая константа скорости не является функцией начальной концентрации фермента. Таким образом, на основании этих критериев может быть идентифицирован механизм IV.

Если экспериментально обнаружено, что $k_{\text{наб}}$ зависит от концентрации субстрата, то механизм мономолекулярной инактивации фермента можно исключить из рассмотрения. Так, например, из данных, приведенных на рис. 2.97, следует, что механизм инактивации арилсульфатазы протекает с участием фермент-субстратного комплекса или при бимолекулярном взаимодействии фермента с субстратом, а не через свободную форму фермента. С другой стороны, экспериментальное обнаружение независимости $k_{\text{наб}}$ от S_0 не является однозначным доказательством справедливости механизма I, поскольку такая зависимость может иметь

место для механизмов II и III в условиях большого избытка субстрата по сравнению с константой Михаэлиса. В этих условиях принципиально важным является определение параметров V_m и K_m .

4. *Проведение реакции при больших концентрациях фермента.* Из данного выше анализа следует, что при достаточно больших концентрациях фермента степень конверсии субстрата равна единице, и при дальнейшем увеличении концентрации фермента процессами его инактивации можно пренебречь. Из интегральной формы уравнения Михаэлиса, которое описывает динамику процесса в этих условиях, могут быть найдены параметры V_m и K_m . Количественные критерии, которые должны быть выполнены при переходе к «классическому» уравнению Михаэлиса, представлены в табл. 2.20. Левые части неравенств, приведенных в таблице, функционально связаны с величинами α_{lim} , определяемыми при проведении реакции при низких концентрациях фермента.

Таким образом, экспериментальным критерием пренебрежимости процесса инактивации фермента является использование концентраций фермента, в 30–100 раз превышающих концентрации, для которых наблюдается 10% предельная конверсия субстрата.

Использование найденных величин V_m и K_m при сопоставлении зависимости $k_{набл}$ от S_0 с экспериментальными данными позволяет идентифицировать механизм мономолекулярной инактивации свободной формы фермента. При S_0 , соизмеримом с K_m для механизма I, не должна наблюдаться зависимость $k_{набл}$ от концентрации субстрата.

Наибольшие сложности представляет дискриминация механизмов II и III. Из кинетических данных, полученных в обсуждаемых выше приближениях, следует, что они различены быть не

Таблица 2.20

Критерии трансформации кинетических уравнений, описывающих динамику реакции с инактивацией фермента в процессе реакции в форму уравнения Михаэлиса

Механизм	I. $E \xrightarrow{k_i} E_i$	II. $X \xrightarrow{k_i} E_i$	III. $E + S \xrightarrow{k_i} E_i$	IV. $E + P \xrightarrow{k_i} E_i$
Критерий	$\frac{k_{kam}E_0}{k_iS_0} \gg 1$	$\frac{k_{kam}E_0}{k_iS_0} \gg 1$	$\frac{\left(\frac{k_{kam}}{K_m} + k_i\right)E_0}{k_iS_0} \gg 1$	$\frac{k_{kam}E_0}{K_mk_iS_0} \gg 1$

могут, и для их анализа необходима постановка качественно новых экспериментов.

5. *Предынкубация фермента с компонентами реакции.* Начальная стационарная скорость реакции является линейной функцией концентрации фермента и может служить мерой изменения концентрации фермента в процессе его инактивации. Эксперименты по предынкубации фермента с различными компонентами системы могут достаточно строго дискриминировать механизмы инактивации. Очевидно, что фермент, мономолекулярно инактивирующийся по механизму I, в отсутствие субстрата должен менять свою активность экспоненциально, при этом $k_{набл}$ должно быть равно k_i .

Для бисубстратных реакций инкубацию можно провести отдельно с каждым из субстратов. Это позволяет дискриминировать механизмы II и III. Если инкубация с каждым из субстратов не приводит к инактивации фермента, то механизм инактивации не может быть представлен уравнением (2.230) и инактивация протекает через промежуточный фермент-субстратный комплекс X.

6. *Использование интегральных уравнений.* Анализ, проведенный указанным выше способом, позволяет идентифицировать механизм инактивации и определить кинетические характеристики системы V_m , K_m , k_i . Дополнительной проверкой сделанных выводов может быть линеаризация экспериментальных данных $\alpha(t)$ в координатах, следующих из интегральных уравнений, описывающих динамику процессов. Для мономолекулярной инактивации свободной формы фермента необходимо использовать уравнение (2.235). При этом предполагается промежуточное вычисление функции

$$y = \alpha - \frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha)$$

и определение предельных значений $\alpha_{\lim} = \frac{k_{кам} E_0}{k_i S_0}$ при различных концентрациях фермента

$$\ln \left[1 - \frac{\alpha - \frac{K_m}{S_0} \ln(1 - \alpha)}{\alpha_{\lim}} \right] = -k_i t. \quad (2.275)$$

Для механизма (2.228) вся совокупность данных $\alpha(t)$ при различных E_0 должна быть представлена в виде одной прямой в координатах уравнения (2.275).

Для механизма инактивации через фермент-субстратный комплекс при условии, что величина α определена экспериментально через α_{lim} при низких степенях конверсии и может быть вычислена согласно (2.249), любая кинетическая кривая может быть линеаризована в координатах уравнения

$$\frac{1}{t} \ln(1 - \alpha a) = \frac{1}{1 + \frac{a-1}{ab}} \frac{\ln(1 - \alpha)}{t} - \frac{\frac{(k_{kam} + k_i)}{K_m} E_0 (a-1)}{1 + \frac{a-1}{b}}.$$

Это же уравнение может быть использовано для бимолекулярной инактивации субстратом (механизм III).

В случае механизма IV экспериментальные данные, полученные при невысоких степенях конверсии субстрата, должны линеаризоваться в соответствии с интегральным уравнением

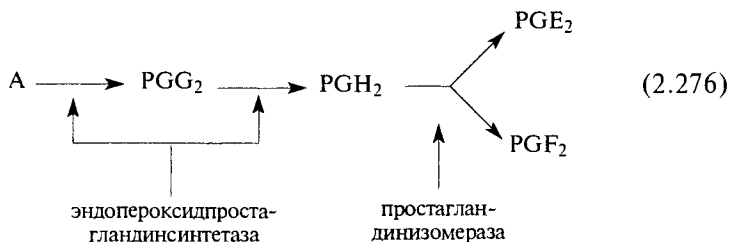
$$\ln \left(\frac{1 + \frac{\alpha}{\alpha_{lim}}}{1 - \frac{\alpha}{\alpha_{lim}}} \right) = \frac{\sqrt{2k_i S_0 K_m k_{kam} E_0}}{S_0 + K_m} t. \quad (2.275')$$

Таким образом, выше рассмотрены кинетические закономерности реакций, протекающих с истощением системы по субстрату с одновременной инактивацией фермента, проанализированы различные механизмы инактивации, рассмотрены подходы для разграничения различных механизмов инактивации и определения кинетических характеристик системы из экспериментальных данных. Проиллюстрируем этот подход на примере изучения эндопероксидпростагландинсинтетазы — лимитирующего фермента синтеза простагландинов.

Кинетика и механизм инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы — лимитирующего фермента синтеза простагландинов

Полиферментный комплекс синтеза простагландинов осуществляет превращение арахидоновой кислоты (AA) в простагландины (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$) и включает по крайней мере два фермента — эндопероксидпростагландинсинтетазу (ЕС 1.14.99.1) и простагландинизомеразу (ЕС 5.3.99.3) (схема 2.276).

Наиболее сложным и медленным процессом, определяющим скорость образования простагландинов, является реакция, катализируемая первым ферментом цепи. Свидетельством тому является факт, что стационарная



концентрация продукта первого фермента (PGH_2) при проведении реакции в биферментной системе близка к нулю и в реакционной смеси PGH_2 практически не обнаруживается.

Зависимость степени конверсии кислорода от концентрации фермента. В большинстве работ по изучению биоспецифического синтеза простагландинов отмечается факт инактивации фермента в процессе реакции. Были исследованы кинетические закономерности действия эндопероксидпростагландинсинтетазы по динамике истощения кислорода. На рис. 2.100а приведены типичные кривые изменения степени конверсии кислорода α во времени при различных концентрациях микросомального белка, содержащего эндопероксидпростагландинсинтетазу. Предельная степень конверсии субстрата (α_{lim}) зависит от концентрации вводимого в реакцию фермента. Это указывает на то, что в системе имеет место либо сильное обратимое ингибирование продуктом реакции, либо необратимая инактивация фермента в ходе ферментативной реакции. В отдельных экспериментах было показано, что в данном случае уменьшение скорости реакции до нуля связано с инактивацией фермента. Так, при введении в прореагировавшую реакционную смесь, в которой скорость реакции равна нулю ($\alpha_{\text{lim}} < 1$), новой порции фермента реакция возобновляется с исходной начальной скоростью.

Зависимость предельного превращения субстрата (предельного выхода продукта α_{lim}) от концентрации фермента имеет вид кривой с насыщением (рис. 2.100). Требуется определить, по какому механизму протекает инактивация фермента. Протекает ли инактивация мономолекулярно через свободную форму фермента (механизм I), фермент-субстратный комплекс (механизм II), бимолекулярно через взаимодействие с субстратом (механизм III) или с продуктом реакции (механизм IV)? С этой целью были проведены эксперименты по исследованию кинетики реакции при малых степенях конверсии кислорода и опыты по предынкубации фермента с компонентами реакционной смеси.

Исследование кинетики реакции при малых степенях конверсии кислорода. Кинетика изменения степени конверсии кислорода (накопления продукта) α (при $\alpha_{\text{lim}} < 0,2$) для всех рассмотренных случаев описывается максимально простыми экспоненциальными уравнениями. Величина α_{lim} достаточно надежно определяется как предел изменения концентрации продукта или субстрата. Из спрямления экспериментальных данных в полугарифмических координатах может быть найдена величина $k_{\text{ноб}}$ — ки-

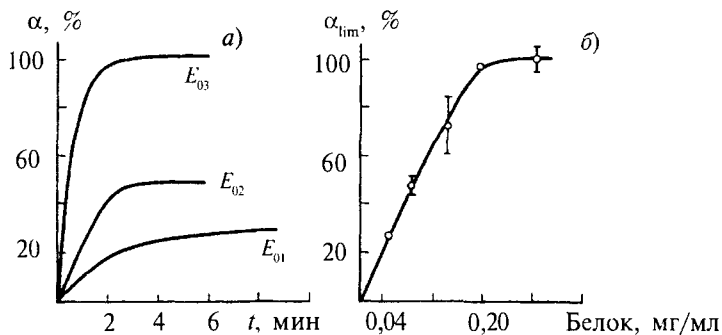


Рис. 2.100. Типичная зависимость степени конверсии кислорода α в эндопероксидсинтетазной реакции при различных концентрациях фермента (а) и зависимость предельной степени конверсии кислорода α_{lim} от концентрации белка (б).

Условия: арахидоновая кислота — $5 \cdot 10^{-4}$ М; гидрохинон — $2,3 \cdot 10^{-4}$ М, гемин — $3,3 \cdot 10^{-6}$ М; твин-20 — 0,4%; микросомальный белок E_{01} — 0,046 мг/мл; E_{02} — 0,096 мг/мл; E_{03} — 0,196 мг/мл; 0,05 М трис-НСl буфер; рН 8,0; объем реакционной смеси 1 мл; температура 31°C.

нетического параметра, определяющего протекание инактивации фермента во времени.

Разграничение механизмов инактивации возможно при изучении зависимостей $k_{\text{наб.1}}$ и α_{lim} от начальных концентраций фермента и субстрата. В то время как предельный выход для механизмов I–III линейно зависит от концентрации фермента, для механизма инактивации при взаимодействии

с продуктом выход линейно зависит от $\sqrt{E_0}$. Показатель экспонент, описывающих временную функцию инактивации для механизма IV, также зависит от концентрации фермента, при этом для механизмов I–III наблюдаемая константа скорости не является функцией начальной концентрации фермента. Таким образом, на основании этих критериев может быть идентифицирован механизм IV.

Результаты исследования кинетики окисления арахидоновой кислоты в условиях $\alpha_{\text{lim}} \ll 1$ приведены на рис. 2.101а. Степень конверсии кислорода представляет собой экспоненциальную функцию времени, при этом $k_{\text{наб.1}}$, определенное как тангенс угла наклона прямой (рис. 2.101б) равно $1,6 \pm 0,2 \text{ мин}^{-1}$ и не зависит от концентрации фермента (рис. 2.102). Предельная степень конверсии линейно увеличивается с ростом начальной концентрации фермента (рис. 2.103). Для сравнения на рис. 2.103 приведены

также данные в координатах $\alpha_{\text{lim}} - \sqrt{E_0}$.

Предынкубация фермента с компонентами реакционной смеси. Исключив из рассмотрения предполагаемых механизмов инактивации механизм IV (инактивацию продуктом реакции), проводили опыты по предынкубации фермента с различными компонентами системы для того, чтобы сделать

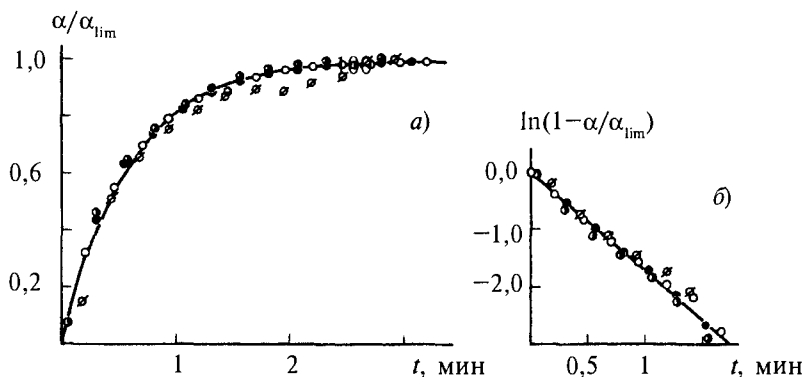


Рис. 2.101. Зависимость степени конверсии кислорода от времени при различных концентрациях эндопероксидсинтетазы в области малых степеней конверсии (а); спрямление кинетической кривой в координатах $[\ln(1 - \alpha/\alpha_{\text{lim}}) t]$ (б).

Условия: арахидоновая кислота — $1 \cdot 10^{-3}$ М; адреналин — $9,8 \cdot 10^{-4}$ М; гемин $3,8 \cdot 10^{-6}$ М; твин-20 — 0,8%; 0,05 М трис-НСl буфер; рН 8,0; 32°C; солюбилизованный микросомальный белок E_{01} — 0,016 мг/мл (перечеркнутая точка); E_{02} — 0,032 мг/мл (○); E_{03} — 0,048 мг/мл (●); E_{04} — 0,096 мг/мл (точка, закрашенная наполовину).

выбор в пользу одного из механизмов I–III. Фермент, мономолекулярно инактивирующийся по механизму I, в отсутствие субстрата должен менять свою активность экспоненциально, при этом $k_{\text{набл}}$ должно быть равно k_i .

Для бисубстратных реакций инкубацию можно провести отдельно

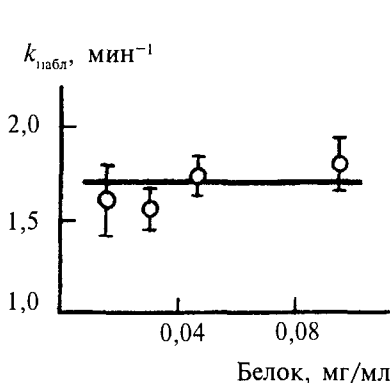


Рис. 2.102. Зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации эндопероксидсинтетазы от концентрации белка в области малых степеней конверсии субстрата (условия, как на рис. 2.101).

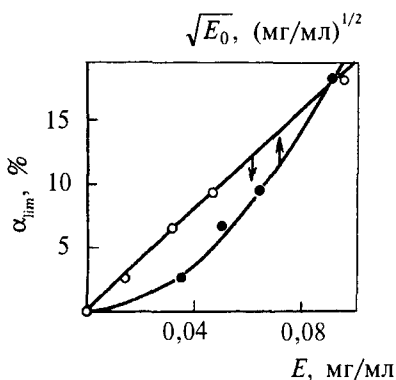


Рис. 2.103. Зависимость предельной степени конверсии кислорода от концентрации белка с малой степенью конверсии субстрата (условия, как на рис. 2.101).

с каждым из субстратов. Это позволяет дискриминировать механизмы II и III.

Апофермент (эндопероксидпростагландинсинтетазу в отсутствие гема) инкубировали с одним из субстратов (кислородом, арахидоновой кислотой или донором электрона), после чего вносили остальные компоненты, необходимые для протекания реакции, и измеряли начальную стационарную скорость поглощения кислорода. Данные по кинетике изменения активности фермента при предынкубации с различными компонентами системы приведены на рис. 2.104. Фермент не инактивируется в отсутствие субстратов и кофакторов (это позволяет исключить из рассмотрения механизм I), а также в присутствии кислорода и арахидоновой кислоты. Видно, что фермент инактивируется в системе, содержащей гемин и кислород. Константа скорости инактивации, найденная из данных по предынкубации фермента (см. рис. 2.104), равна $1,5 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$ и в первом приближении находится в хорошем соответствии с величиной, найденной в независимой серии экспериментов из интегральной кинетики поглощения кислорода при низких степенях конверсии субстрата (см. рис. 2.101б).

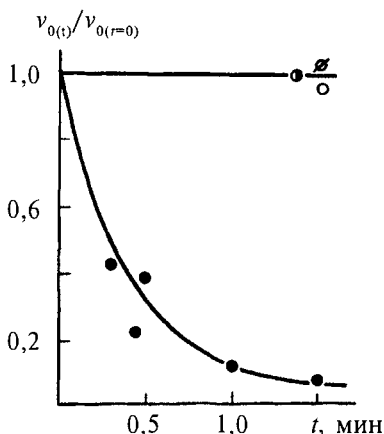


Рис. 2.104. Кинетика инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы в условиях предынкубации с различными компонентами системы.

Условия определения активности: арахидоновая кислота — $1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; адреналин — $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; гемин — $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; солибилизованный микросомальный белок — $0,016 \text{ мг/мл}$; $0,05 \text{ М}$ трис-НСl буфер; рН 8,0; твин-20 — 0,25%. Условия предынкубации (белок в буфере для определения активности): гемин — $3,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ (•); адреналин — $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ (точка, закрашенная наполовину) арахидоновая кислота $1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ (перечеркнутая точка).

Регуляторная роль инактивации фермента в процессе реакции

Очевидно, что инактивация (или активация) лимитирующего фермента может играть ключевую роль с точки зрения регуляции системы в целом. В некоторых случаях инактивационный процесс имеет ярко выраженный регуляторный характер. Представляет интерес проанализировать, каково влияние процесса инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы на динамику образования и расхода простагландинов. Рассмотрим кинетическую модель процесса



Предположим что, участвуя в регуляторном процессе, простагландины расходуются, при этом скорость расхода пропорциональна их концентрации в системе. При условии, что скорость процесса строго лимитируется первым ферментом цепи, концентрация PGH_2 много меньше константы Михаэлиса изомеразной реакции (см. ниже). Константа Михаэлиса для арахидоновой кислоты весьма мала, поэтому первый фермент цепи практически во всем диапазоне времени работает в режиме максимальной скорости. В этих условиях кинетику изменения концентраций компонентов в системе описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{d\text{PGH}_2}{dt} = k_1 E_1(t) - \frac{V_{2m}}{K_{2m}} \text{PGH}_2 \\ \frac{d\text{PGE}_2}{dt} = \frac{V_{2m}}{K_{2m}} \text{PGH}_2 - k \text{PGE}_2 \\ E_1(t) = E_0 e^{-k_i t} \end{cases} \quad (2.278)$$

где k_i — каталитическая константа первого фермента; V_{2m}/K_{2m} — отношение максимальной скорости и константы Михаэлиса второго фермента; k — константа скорости первого порядка дальнейшего превращения PGE_2 ; k_i — константа скорости инактивации эндопероксидпростагландинсинтетазы; E_0 — начальная концентрация первого фермента.

Динамику изменения концентрации простагландинов описывают уравнения

$$\text{PGH}_2 = \frac{k_1 E_0}{k_i - \frac{V_{2m}}{K_{2m}}} \left(e^{-\frac{V_{2m}}{K_{2m}} t} - e^{-k_i t} \right), \quad (2.279)$$

$$\text{PGE}_2 = \frac{V_{2m}}{K_{2m}} \frac{V_{1m}}{k_i - \frac{V_{2m}}{K_{2m}}} \left[\frac{e^{-k_i t}}{k_i - k} - \frac{e^{-\frac{V_{2m}}{K_{2m}} t}}{\frac{V_{2m}}{K_{2m}} - k} \left(\frac{1}{\frac{V_{2m}}{K_{2m}} - k} - \frac{1}{k_i - k} \right) e^{-kt} \right]. \quad (2.280)$$

Из этих уравнений следует, что процесс инактивации первого фермента цепи приводит к «импульсному» характеру действия системы. Концентрация PGH_2 и PGE_2 возрастают после инициа-

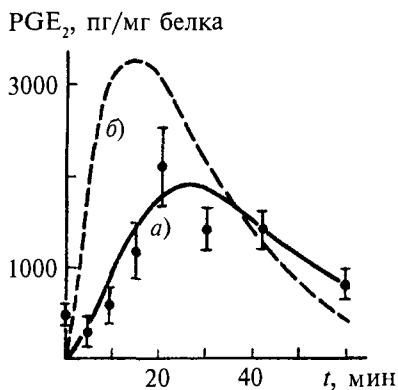


Рис. 2.105. Кинетика изменения концентрации PGE_2 в костной ткани после стрессового механического воздействия (а), кривая вычислена по (2.280) при использовании параметров $V_{1m} = 665$ пг/(мг белка · мин); $V_{2m}/K_{2m} = 0,059$ мин $^{-1}$; $k = 0,076$ мин $^{-1}$; $k_i = 0,091$ мин $^{-1}$; теоретическая кривая изменения концентрации PGH_2 (б), вычисленная по (2.279) при использовании указанных выше параметров.

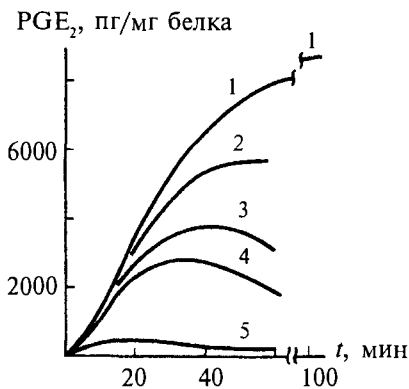


Рис. 2.106. Влияние инактивации фермента на вид кинетических кривых изменения концентрации PGE_2 .

Кривые построены по уравнению (2.279) с параметрами: $V_{1m} = 665$ пг/(мг белка · мин); $V_{2m}/K_{2m} = 0,059$ мин $^{-1}$; $k = 0,076$ мин $^{-1}$ при разных значениях k_i (мин $^{-1}$): 1 — 0,00; 2 — 0,01; 3 — 0,03; 4 — 0,05; 5 — 0,05.

ции реакции, проходят через максимум и уменьшаются до нулевого уровня. Эффекты «импульсного» характера изменения концентраций простагландинов наблюдаются экспериментально. На рис. 2.105 приведены экспериментальные данные [Somjen, Binderman, Berger, 1980], описывающие динамику изменения PGE_2 в культуре костной ткани после стрессового механического воздействия.

Наблюдаемая кинетическая кривая достаточно хорошо описывается уравнением (2.280) (сплошная кривая), приведена также теоретическая кривая (пунктирная линия) изменения в системе концентрации PGH_2 [уравнение (2.279)], вычисленная на основе использования параметров, найденных при математическом моделировании кривой образования PGE_2 . Таким образом, использование кинетического подхода позволяет предсказывать динамику образования и расхода экспериментально труднодетектируемого промежуточного соединения на основе исследования кинетики накопления продукта реакции.

На рис. 2.106 прослежено влияние процесса инактивации первого фермента на динамику образования и расхода PGE_2 . На этом

же рисунке приведены теоретические кривые для процессов в отсутствие инактивации ($k_i = 0$) и серия кривых с последовательным увеличением константы скорости инактивации фермента. Видно, что отсутствие процесса инактивации приводит к исключительно высокой концентрации сильнодействующего физиологически активного соединения, при этом в рамках предположений используемой модели его концентрация достигает стационарного состояния и не меняется во времени. Очевидно, что это может вызвать весьма глубокие неблагоприятные физиологические эффекты. Можно думать, что для регуляции этих эффектов система обеспечила себя «защитным» механизмом, связанным с инактивацией первого фермента синтеза простагландинов. В открытой системе, когда происходит ввод нового количества фермента, например, за счет биосинтеза, инактивация фермента в процессе реакции является механизмом стабилизации продукта реакции на постоянном уровне (см. § 2.10).

Инактивация ферментных систем

Ферменты в полиферментных цепях в общем случае обладают различной устойчивостью к инактивирующим факторам. Достаточно часто экспериментатор имеет дело с лабильными комплексными ферментными системами, изменяющими свои характеристики при хранении и инкубации в необходимых условиях. При проведении таких работ необходимо ответить на следующие вопросы: а) каков диапазон времени, в котором можно не опасаться заметных изменений характеристик системы, б) какая стадия исследуемой реакции определяет скорость всего процесса, в) какой участок полиферментной цепи является самым лабильным, инактивирующимся с наибольшей скоростью. Ответить на эти вопросы можно, проведя исследование кинетики инактивации системы.

Рассмотрим линейную полиферментную цепь. Для простоты примем, что исследуемая реакция осуществляется биферментной системой. Сделанные выводы можно распространить и на более сложные линейные цепи. Стационарную скорость биферментной реакции в условиях, когда первый фермент не является строго лимитирующим, можно представить в виде

$$v_0 = \frac{S_0}{\frac{K_{1m}}{V_{1m}} + \frac{K_{2m}}{V_{2m}}}, \quad (2.281)$$

где K_{1m} , K_{2m} , V_{1m} , V_{2m} — соответственно константы Михаэлиса и максимальные скорости на первой и второй стадиях. Предполо-

жим, что каждый из ферментов инактивируется экспоненциально, с постоянной интенсивностью, характеризуемой константами скорости инаktivации k_1 и k_2 . В этом случае максимальные скорости на каждой из стадий являются функциями времени:

$$V_{1m} = k_{\text{кам},1} E_{10} e^{-k_1 t} = A_1 e^{-k_1 t}; \quad (2.282)$$

$$V_{2m} = k_{\text{кам},2} E_{20} e^{-k_2 t} = A_2 e^{-k_2 t}.$$

Измеряемая опытным путем активность системы с течением времени будет меняться и с учетом этих уравнений будет иметь вид

$$v = \frac{S_0 A_1 A_2 e^{-(k_1 + k_2)t}}{K_{1m} A_2 e^{-k_2 t} + K_{2m} A_1 e^{-k_1 t}}. \quad (2.283)$$

Если исследуются относительные изменения скорости v/v_0 , нормированные на начальную скорость, зависимость от времени дается уравнением

$$\frac{v}{v_0} = \frac{\left(1 + \frac{A_1/K_{1m}}{A_2/K_{2m}}\right) e^{-k_1 t}}{1 + \frac{A_1/K_{1m}}{A_2/K_{2m}} e^{-(k_1 + k_2)t}}. \quad (2.284)$$

Видно, что зависимость, которую можно изучить экспериментально, определяется отношением, характеризующим активность ферментов в полиферментной цепи,

$$\frac{A_1/K_{1m}}{A_2/K_{2m}} = \frac{V_1/K_{1m}}{V_2/K_{2m}} = \alpha \quad (2.285)$$

и разностью констант скоростей инаktivации обоих ферментов.

Соответственно из анализа кинетики инаktivации можно получить информацию о величине этих параметров и решить вопрос о том, какая стадия является лимитирующей и какой фермент цепи является наиболее неустойчивым с точки зрения инаktivировующего воздействия.

Рассмотрим несколько частных случаев.

1. Фермент, в исходном состоянии определяющий скорость полиферментной реакции, является наиболее лабильным. Если первый фермент цепи лимитирует скорость процесса, т.е. $V_{1m}/K_{1m} \ll V_{2m}/K_{2m}$ и $k_1 \gg k_2$, то уравнение (2.283) трансформируется к виду

$$\frac{v}{v_0} = e^{-k_1 t}. \quad (2.286)$$

Кинетика инактивации описывается экспонентой, при этом характеристическое время инактивации определяется константой скорости инактивации этого лабильного фермента.

Совершенно аналогична ситуация, если второй фермент является лимитирующим и инактивируется много быстрее $V_{1m}/K_{1m} \gg \gg V_{2m}/K_{2m}$, $k_2 \gg k_1$. Общее изменение скорости в этом случае также будет дано экспонентой, показатель которой включает константу скорости инактивации фермента, лимитирующего процесс,

$$\frac{v}{v_0} = e^{-k_2 t} \quad (2.287)$$

Очевидно, что система сохраняет свои характеристики практически без изменений при условии, что время работы с ней существенно меньше характеристического времени инактивации

$$t \ll \tau = 1/k_{набл}, \quad (2.288)$$

где $k_{набл}$ — наблюдаемая константа скорости инактивации.

2. Фермент, определяющий скорость реакции, является достаточно стабильным, а второй фермент цепи сравнительно быстро инактивируется. Понятно, что до этого момента, пока скорость действия нелимитирующего фермента существенно превышает скорость лимитирующего, инактивация первого не должна сказаться на общей скорости процесса. Однако при больших глубинах инактивации лабильный фермент может стать скоростьюопределяющим, т.е. может произойти смена лимитирующей стадии процесса.

Например, если скорость реакции определяется действием первого фермента цепи, т.е. $V_{1m}/K_{1m} \ll V_{2m}/K_{2m}$, а скорость инактивации выше у второго $k_2 \gg k_1$, изменение активности системы описывается уравнением

$$\frac{v}{v_0} = \frac{\frac{V_{2m}/K_{2m}}{V_{1m}/K_{1m}} e^{-k_2 t}}{1 + \frac{V_{2m}/K_{2m}}{V_{1m}/K_{1m}} e^{-k_2 t}} \quad (2.289)$$

Кинетическая кривая инактивации отличается от простой экспоненциальной функции, и на ней наблюдается период индукции (рис. 2.107). Среднее время инактивации

$$\tau = \int_0^t \frac{v}{v_0}(t) dt = \frac{\ln \frac{V_{2m}/K_{2m}}{V_{1m}/K_{1m}}}{k_2} \quad (2.290)$$

Если «операционное» время системы существенно меньше τ , характеристики системы следует считать практически неизменными и инактивационными процессами можно пренебречь. Важную информацию несет форма кинетической кривой инактивации. Если инактивация протекает по простому экспоненциальному закону, можно утверждать, что наиболее лабильным является фермент, определяющий скорость полиферментной реакции. Если кинетическая кривая инактивации имеет сигмоидальный вид и характеризуется периодом индукции (см. рис. 2.107), можно с определенной уверенностью утверждать, что наиболее лабильным является фермент, не определяющий скорость процесса в целом.

Пример 2.15. Определить наиболее лабильный участок полиферментной цепи для инактивации электронно-транспортной цепи фотосинтеза (рис. 2.108).

При решении ряда задач принципиален вопрос, какой именно фермент (или группа ферментов) полиферментной цепи является наиболее лабильным. Ответ на этот вопрос заключается в исследовании специфических активностей каждого фермента цепи и сравнении констант инактивации.

Полиферментные цепи иногда можно шунтировать, включая в ферментативный процесс различные участки цепи. Это может служить удобным методом изучения системы и ее стабилизации при шунтировании наиболее слабого звена цепи. Рассмотрим это более подробно на примере исследования системы фотоокисления воды в механизме фотосинтеза.

Кинетика инактивации электронно-транспортной цепи фотосинтеза (рис. 2.108) имеет двухфазный характер и описывается суммой двух экспоненциальных членов (рис. 2.109)

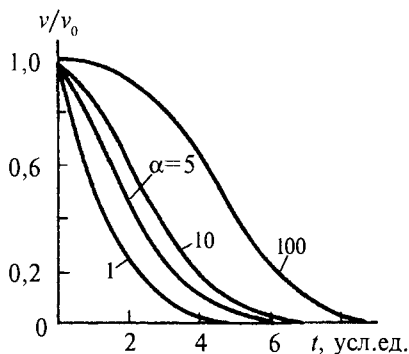


Рис. 2.107. Кинетика инактивации ферментной системы со сменой лимитирующей стадии. Значения α даны уравнением (2.285).

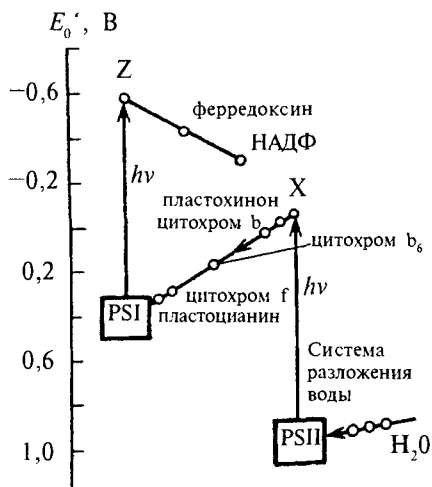


Рис. 2.108. Электронно-транспортная цепь фотосинтеза.

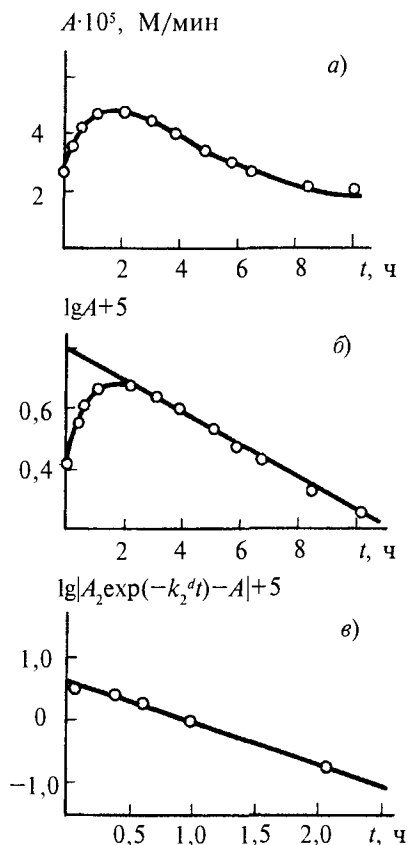


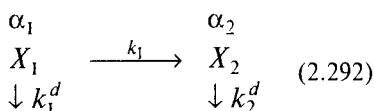
Рис. 2.109. Кинетика изменения фотосинтетической активности хлоропластов в процессе старения (а), определение τ_2 и A_2 (б), определение τ_1 и A_1 (в).

старения до определенного момента происходит некоторое увеличение активности суспензии изолированных хлоропластов. Это говорит о том, что активность электронно-транспортной цепи хлоропластов в состоянии X_2 в реакции фотоокисления воды феррицианидом калия выше ее активности в состоянии X_1 ($\alpha_2 > \alpha_1$). Можно предположить, что по крайней мере два механизма приводят к увеличению активности хлоропластов. Первый заключается в том, что в процессе старения увеличивается проницаемость фотосинтетических мембран хлоропластов для ферроцианида, т.е. в мембране образуется канал или серия каналов, открывающих доступ к фотохимическим реакционным центрам. В этом случае процесс, характеризуемый константой k_1 , представляет собой протекающее во времени структурно-ин-

$$A = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}, \quad (2.291)$$

где A — измеряемая на опыте активность цепи по реакции фоторазложения воды и фотовосстановления ферроцианида калия.

Простейшая кинетическая схема, описывающая эту зависимость, включает два состояния электронно-транспортной цепи, которые различаются по стабильности и активности:



неактивные электронно-транспортные цепи,

где X_1 , X_2 — структурно и функционально различающиеся состояния электронно-транспортной цепи хлоропластов; α_1 , α_2 — парциальные активности этих состояний; k_1 — константа скорости трансформации состояния X_1 в X_2 ;

k_1^d , k_2^d — константы скорости необратимой инактивации каждого из состояний.

Связь кинетической константы k_1 с инаktivацией процесса образования трансмембранного градиента pH . Как следует из данных, приведенных на рис. 2.109а, в процессе

формационное изменение фотосинтетических мембран хлоропластов, приводящее к увеличению скорости диффузии ферроцианида калия к реакционным центрам.

Второе объяснение увеличения активности хлоропластов связано с инактивацией процесса образования на фотосинтетической мембране трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$) и связанного с ним процесса фотофосфорилирования. Действительно, трансмембранный электрохимический потенциал, основной вклад в который в случае хлоропластов вносит трансмембранный градиент pH, в значительной мере определяет скорость электронно-транспортных процессов и фотофосфорилирования. Понижение градиента pH и разобшение фотофосфорилирования, как, например, при действии разобшающих агентов, температуры, приводит к стимуляции электронного транспорта и ингибированию фотофосфорилирования.

Таким образом, активация хлоропластов в процессе старения может быть обусловлена понижением трансмембранного градиента pH в процессе инактивации. Этот эффект в некотором смысле аналогичен эффекту действия разобшителей электронного переноса и фотофосфорилирования.

Чтобы определить, какой из двух возможных механизмов активации имеет место на самом деле, был поставлен ряд экспериментов. Проведенное исследование влияния концентрации ферроцианида калия на начальную активность хлоропластов и на кинетическую кривую их инактивации показало, что начальная активность хлоропластов и изменение активности в процессе их инактивации не зависят от концентрации ферроцианида калия в используемом диапазоне концентраций акцептора (0,2–0,7 мМ). Это позволяет сделать вывод о том, что процесс активации не связан с диффузионными эффектами.

С целью проверки второго возможного механизма активации было проведено сравнение кинетики потери хлоропластами активности в процессе старения с кинетикой уменьшения трансмембранного протонного градиента на фотосинтетической мембране (рис. 2.110). Кинетика изменения трансмембранного градиента pH в процессе инактивации хлоропластов действительно коррелирует с процессом, характеризуемым τ_1 : $\tau_{\Delta pH} = 0,50 \pm 0,17$ с; $\tau_1 = 0,72 \pm 0,08$ ч, 30°C.

Таким образом, можно сделать вывод, что активация хлоропластов в процессе старения связана с потерей способности фотосинтетической мембраны хлоропластов к образованию протонного градиента и, следовательно, фосфорилирующей активности. Следует заметить, что поскольку $\tau_{\Delta pH} = \tau_1 = 1/(k_1 + k_1^d)$ имеют близкие (в пределах ошибки эксперимента) значения, можно сделать вывод о том, что константа k_1 существенно превышает константу k_1^d , в силу чего необратимая инактивация хлоропластов проходит через состояние электронно-транспортной цепи X_2 и связана в первую очередь с процессом, характеризуемым константой k_1^d . Этот процесс и приводит к полной потере хлоропластами их активности по отношению к реакциям электронного транспорта.

Исследование механизма процесса необратимой инактивации изолиро-

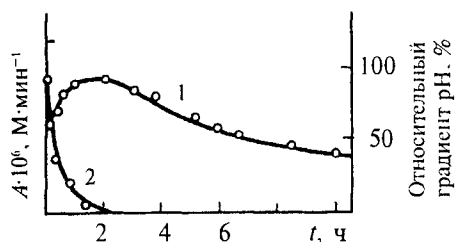


Рис. 2.110. Сравнение кинетики инактивации хлоропластов (1) с кинетикой уменьшения трансмембранного градиента pH (2).

класса I был взят феррицианид калия, класса II — 2,6-дихлорфенолиндофенол, класса III — *n*-бензохинон. Помимо этого, в качестве акцептора исключительно фотосистемы II была использована смесь дибромтимохитона с феррицианидом калия (концентрация дибромтимохинона $5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$).

Результаты по изучению влияния природы акцепторов в условиях измерения активности хлоропластов на характер кинетики процесса инактивации представлены в табл. 2.21. Видно, что характер кинетики процесса необратимой инактивации хлоропластов не зависит от природы используемого акцептора. Отсюда можно сделать важный вывод: процесс необратимой инактивации электронно-транспортной цепи хлоропластов в процессе старения определяется общим для всех акцепторов ее участком, т.е. фотосистемой II. Для более детального местонахождения наиболее лабильного участка электронно-транспортной цепи фотосинтеза было проведено сравнение кинетических кривых изменения активности хлоропластов по отношению к 2,6-дихлорфенолиндофенолу в процессе старения в отсутствие и в присутствии донора электрона фото-

ванных хлоропластов. Были исследованы акцепторы трех классов: акцепторы класса I — гидрофильные соединения, восстанавливающие преимущественно (при низких значениях потенциала) исключительно фотосистемой I; акцепторы класса II — липофильные соединения, восстанавливающиеся в основном фотосистемой II; акцепторы класса III — соединения дуалистического характера, являющиеся одновременно разобщителями электронного транспорта и фотофосфорилирования. В качестве акцепторов

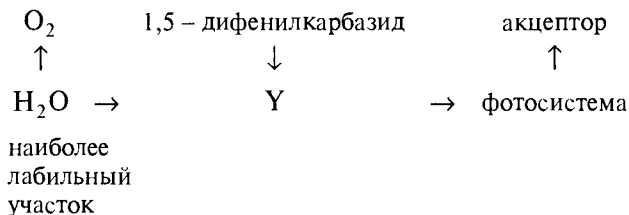
Таблица 2.21

Зависимость константы скорости процесса необратимой инактивации хлоропластов от характера акцептора, используемого при измерении их активности

Акцептор	k^d_2 по отношению	
	к акцептору, ч^{-1}	к контролю с $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_3$, ч^{-1}
<i>n</i> -бензохинон	$0,20 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,03$
Смесь феррицианида калия с дибромтимохиноном	$0,19 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,02$
2,6-дихлорфенолиндофенол	$0,66 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,03$

системы II — 1,5-дифенилкарбазида. Результаты позволяют сделать два важных вывода.

1. Поскольку в присутствии 1,5-дифенилкарбазида процесс необратимой инактивации протекает медленнее (τ_2 в отсутствие и в присутствии 1,5-дифенилкарбазида равно соответственно $1,5 \pm 0,1$ и $4,2 \pm 0,2$ ч, 32°C), самым лабильным участком фотосистемы II является марганецсодержащая система разложения воды, причем в пункте, находящемся до переносчика, акцептирующего электрон с 1,5-дифенилкарбазида,



2. Помимо инактивации системы разложения воды — самого быстрого инактивационного процесса, при старении хлоропластов происходит потеря их способности к фотоокислению 1,5-дифенилкарбазида. Последний процесс, протекающий заметно медленнее, чем процесс инактивации системы разложения воды, по-видимому, связан с инактивацией фотосинтетического аппарата реакционного центра фотосистемы II.

Таким образом, в процессе необратимой инактивации хлоропластов происходит в первую очередь инактивация марганецсодержащей системы разложения воды. Причина, вызывающая процесс инактивации разложения воды, пока неясна. Процесс инактивации, вероятно, может быть связан с действием липолитических ферментов и выделяющихся жирных кислот, как это предполагает наиболее развитая в настоящее время гипотеза старения хлоропластов, а также с денатурационными изменениями в мембране. Вполне возможно и наложение этих двух процессов. Однако если процесс инактивации связан с действием липаз, то действие этих ферментов и продуктов их гидролиза приводит к инактивации в первую очередь системы непосредственного окисления воды и уже затем системы, окисляющей 1,5-дифенилкарбазид.

Итак, в результате исследования кинетики и механизма инактивации электронно-транспортной цепи хлоропластов в процессе старения показано, что процесс трансформации исходного состояния электронно-транспортной цепи X_1 в промежуточное X_2 связан с инактивацией способности фотосинтетической мембраны к образованию трансмембранного градиента рН, а процесс необратимой инактивации состояния X_2 — с инактивацией системы разложения воды. Позитивной особенностью рассмотренной кинетической модели является возможность расчленить сложный процесс инактивации электронно-транспортной цепи хлоропластов на отдельные стадии и исследовать влияние различных факторов непосредственно на индивидуальные стадии.

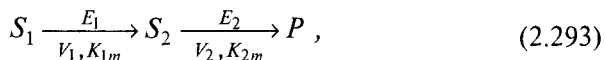
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Напишите кинетические схемы и уравнения мономолекулярной инактивации ферментов, инактивации с учетом равновесия конформеров белка. 2. Напишите кинетическую схему и уравнения для рН-зависимостей инактивации. Как будет выглядеть зависимость наблюдаемой константы скорости инактивации, если наиболее стабильна нейтральная форма фермента? 3. Опишите диссоциативный механизм инактивации олигомерных ферментов. 4. Какие механизмы инактивации ферментов в процессе реакции вы знаете? Как можно дискриминировать эти механизмы? 5. Каков механизм субстрат-индуцированной инактивации фермента? Какова его регуляторная роль?

2.9. Полиферментные системы. Сопряженные ферментные реакции

Реакции в полиферментных системах с кинетической точки зрения можно рассматривать как последовательные процессы, специфической особенностью которых является катализ ферментами каждой из стадий реакции. Определенные успехи в настоящее время существуют в кинетическом описании и математическом моделировании реакций в полиферментных системах. Несмотря на кажущуюся сложность процессов в полиферментных системах, для анализа кинетики реакций весьма оправдано использование некоторых упрощающих анализ приближений. Рассмотрим наиболее существенные закономерности реакций в такого рода системах.

Простейшая кинетическая схема, включающая образование активного промежуточного метаболита, может быть представлена как



где S_1 — исходный субстрат; S_2 — промежуточный метаболит; P — продукт реакции; E_1 и E_2 — ферменты, участвующие на первой и второй стадиях соответственно.

Предполагается, что скорости ферментативных реакций на первой и второй стадии реакции описываются уравнением Михаэлиса. Символами V_{1m} , V_{2m} и K_{1m} , K_{2m} обозначены максимальные скорости и константы Михаэлиса каждой стадии. Предполагается также, что в системе гомогенно распределены субстраты и ферменты, т.е. нет образования специфических комплексов между ферментами, и градиенты субстратов и продукта по всему объе-

му равны нулю. При постоянстве концентрации исходного субстрата ($S_1 = S_0 = \text{const}$) или в условиях его превращения на небольшую глубину кинетику реакции описывает следующая система уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dS_2}{dt} = v_0 - \frac{V_{2m}S_2}{K_{2m} + S_2} \\ \frac{dP}{dt} = \frac{V_{2m}S_2}{K_{2m} + S_2} \end{cases} \quad (2.294)$$

Здесь v_0 — скорость реакции на первой стадии, постоянная и не зависящая от времени величина, заданная уравнением

$$v_0 = \frac{V_{1m}S_0}{K_{1m} + S_0}.$$

Уравнения (2.294) представляют собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными, которые могут быть проинтегрированы:

$$\int_0^{S_2} \frac{(K_{2m} + S_2)dS_2}{v_0 K_{2m} + S_2(v_0 - V_{2m})} = t,$$

$$1 - \frac{K_{2m}}{v_0} \ln \left[1 + \frac{S_2}{K_{2m}} \left(1 - \frac{V_{2m}}{v_0} \right) \right] + S_2 = (v_0 - V_{2m})t. \quad (2.295)$$

Уравнение (2.295) имеет смысл при условии

$$1 + \frac{S_2}{K_{2m}} \left(1 - \frac{V_{2m}}{v_0} \right) \geq 0, \quad (2.296)$$

что приводит к неравенству

$$S_2 \leq \frac{K_{2m}}{\frac{V_{2m}}{v_0} - 1}. \quad (2.297)$$

Таким образом, концентрация промежуточного субстрата ограничена, и это ограничение определяется константой Михаэлиса второго фермента и отношением максимальной скорости второй реакции к скорости первой.

Рассмотрим наиболее важный частный случай, когда максимальная скорость второй стадии существенно превышает скорость первой ($V_{2m} \gg v_0$). В этих условиях уравнение (2.295) принимает вид

$$\ln\left(1 - \frac{S_2}{K_{2m}} \frac{V_{2m}}{v_0}\right) + \frac{S_2}{K_{2m}} = -\frac{V_{2m}}{K_{2m}} t. \quad (2.298)$$

При $V_{2m} \gg v_0$, $S_2/K_{2m} \ll 1$, и в этих условиях справедливо неравенство

$$\ln\left(1 - \frac{S_2}{K_{2m}} \frac{V_{2m}}{v_0}\right) \gg -\frac{S_2}{K_{2m}}. \quad (2.299)$$

С учетом этого неравенства уравнение (2.298) приводит к следующей зависимости концентрации промежуточного субстрата от времени:

$$S_2(t) = \frac{K_{2m}}{V_{2m}} v_0 \left(1 - e^{-\frac{V_{2m}}{K_{2m}} t}\right). \quad (2.300)$$

Рис. 2.111 иллюстрирует зависимость от времени $S_2(t)$ при различных соотношениях между параметрами V_{2m}/K_{2m} и V_{2m}/v_0 .

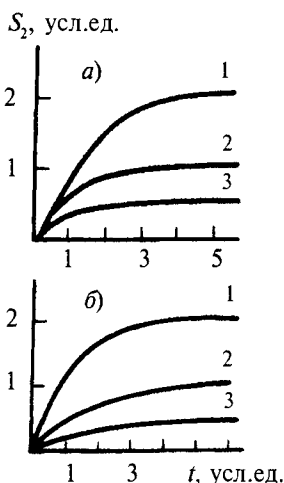


Рис. 2.111. Зависимость от времени концентрации промежуточного субстрата в биферментной системе.

a — при различных значениях параметра V_{2m}/K_{2m} (усл.ед.): (1) — 1; (2) — 2; (3) — 4; *б* — при различных значениях параметра V_{2m}/v_0 (усл.ед.): (1) — 1; (2) — 2; (3) — 4.

Зависимость концентрации продукта от времени можно найти, подставив уравнение (2.300) в (2.294) и проинтегрировав полученное дифференциальное уравнение с учетом того, что в указанных условиях $S_2 \ll K_{2m}$

$$P(t) = v_0 t + \frac{v_0 K_{2m}}{V_{2m}} \left(e^{-\frac{V_{2m}}{K_{2m}} t} - 1 \right). \quad (2.301)$$

На рис. 2.112 приведены кинетические кривые накопления продукта в биферментной системе. Кривая продукт — время имеет период индукции и асимптотически приближается к прямой с тангенсом угла наклона, равным стационарной скорости процесса. Период индукции τ определяется кинетическими характеристиками второго фермента:

$$\tau = \frac{K_{2m}}{V_{2m}}. \quad (2.302)$$

В более общем случае, когда величина S_2 соизмерима с K_{2m} (это эквива-

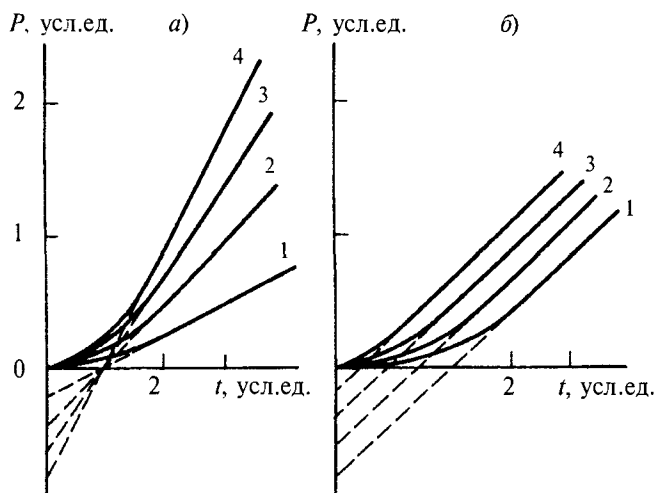


Рис. 2.112. Кинетические кривые продукт — время в биферментной системе (уравнения 2.301).

a — $V_{2m}/K_{2m} = \text{const}$: v_0 (усл.ед.): (1) — 1; (2) — 2; (3) — 3; (4) — 4; *б* — $v_0 = \text{const}$: v_{2m}/K_{2m} (усл.ед.): (1) — 1; (2) — 2; (3) — 3; (4) — 4.

лентно утверждению, что V_{2i} соизмеримо с v_0), период индукции связан с кинетическими параметрами реакции более сложными соотношениями. Однако наличие периода индукции на кривой продукт — время указывает на участие в механизме реакции по крайней мере одного промежуточного метаболита.

Важной особенностью обсуждаемой реакции является возможность образования стационарного состояния, в котором концентрация промежуточного метаболита постоянна и практически не меняется во времени. В стационарном состоянии $dS_2/dt = 0$, откуда

$$S_{2cm} = \frac{V_{1m}S_0K_{2m}}{V_{2m}(K_{1m} + S_0) - V_{1m}S_0}. \quad (2.303)$$

Из этого уравнения вытекает условие возможности установления стационарного состояния. Поскольку $S_{2cm} > 0$, то должно выполняться неравенство

$$V_{2m} > \frac{V_{1m}S_0}{K_{1m} + S_0}$$

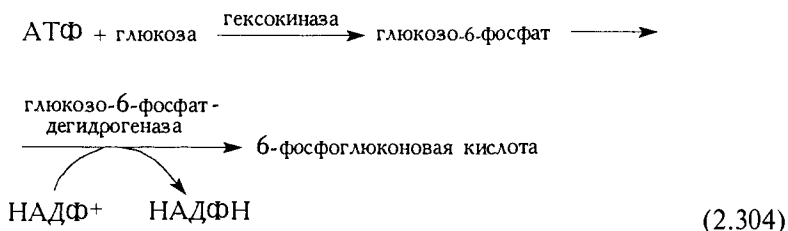
или

$$V_{2m} > v_0.$$

Стационарное состояние возможно, если максимальная скорость второй стадии реакции больше скорости первой.

Сопряженные ферментативные реакции часто используются для количественного определения концентраций многих биорганических соединений. В качестве примера можно привести методики определения АТФ в системе гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, АТФ в системе пируваткиназа-лактатдегидрогеназа, определение гликогена с помощью амилоглюкозидазы — глюкозидазы, определение дофамина и п-ацетилдофамина, неорганического пирофосфата, лецитина, креатинина и креатина и ГДФ.

Рассмотрим кинетику реакции в системе гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа



На рис. 2.113 приведена кинетическая кривая накопления НАДФН, образующегося в результате окисления промежуточного глюкозо-6-фосфата. Кинетика накопления продукта достаточно строго описывается уравнением (2.302). Значение параметра V_{2m}/K_{2m} , найденное из этой кривой, равно $1,38 \text{ мин}^{-1}$. Важно отметить, что из кинетической кривой, приведенной на рис. 2.113, можно определить и стационарную концентрацию промежуточного глюкозо-6-фосфата. Из уравнения (2.301) следует, что при больших временах реакции ($t \gg \tau$) концентрация продукта становится линейной функцией времени

$$P = v_0 (t - \tau), \quad (2.305)$$

$t \rightarrow \infty$

где v_0 — стационарная скорость реакции, τ — период индукции, дан-

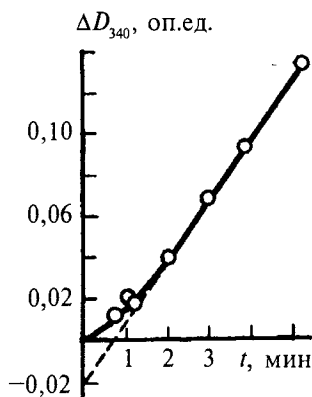
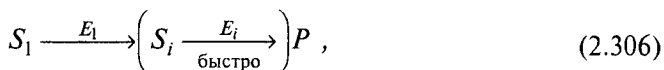


Рис. 2.113. Зависимость концентрации НАДФН от времени в системе гексокиназа — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

ный уравнением (2.302). С учетом того, что $S_{2cm} = v_0 \tau$, видно, что отрезок, отсекаемый асимптотической прямой $P(t)$ на оси ординат, по абсолютной величине равен стационарной концентрации промежуточного субстрата. Из данных рис. 2.113 следует, что стационарная концентрация глюкозо-6-фосфата в системе равна $3,5 \cdot 10^{-6}$ М.

Из уравнения (2.305) видно, что стационарная скорость реакции зависит от концентрации первого субстрата, в данном случае АТФ. С помощью кинетических данных, полученных в условиях $АТФ_0 < K_{1m}$ и калибровочного графика, можно определить неизвестную концентрацию АТФ в исследуемом образце.

Большинство реакций с участием последовательно работающих ферментов контролируется первым ферментом цепи. Как правило, этот фермент обладает самыми низкими кинетическими характеристиками и катализирует наиболее необратимую, термодинамически выгодную реакцию. Часто этот фермент является регуляторным, т.е. его активность регулируется взаимодействиями аллостерического характера с некоторыми последующими компонентами цепи. Кинетическое поведение такого рода систем полностью определяется кинетическими характеристиками этого фермента. Схема (2.306) достаточно хорошо описывает поведение таких реакций:



где S_i — некоторый промежуточный метаболит; E_i — фермент, катализирующий превращение этого метаболита.

Рассмотрим поведение реакции в двух режимах.

1. Первая стадия является строголимитирующей, ее кинетические характеристики существенно более низкие. Формально это эквивалентно условиям, в которых концентрация исходного субстрата поддерживается постоянной. Материальный баланс по субстрату учитывает только концентрацию первого метаболита.

После некоторого переходного периода реакция переходит в стационарный режим, в котором концентрация промежуточного метаболита дается уравнением

$$S_{1cm} = \frac{V_{1m} S_0 K_{im}}{V_{im} (K_{1m} + S_0) - V_{1m} S_0}, \quad (2.307)$$

где V_{1m} , V_{im} — максимальные скорости на первой и i -й стадиях; K_{1m} , K_{im} — соответствующие константы Михаэлиса.

Условием установления стационарного состояния является выполнение неравенства

$$V_{im} > v_0, \quad i = 2, \dots, n, \quad (2.308)$$

где V_{im} — максимальная скорость реакции на i -й стадии; v_0 — скорость первой стадии.

Стационарная скорость накопления продукта, который образуется на последней, n -й стадии, определяется «работой» первого фермента

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{cm} = \frac{V_{1m} S_0}{K_{1m} + S_0}. \quad (2.309)$$

2. Можно представить, что кинетические характеристики двух стадий соизмеримы. В этом случае необходимо в материальном балансе учитывать концентрацию i -го метаболита. Концентрация этого метаболита дается уравнением

$$2S_{icm} = S_0 + \frac{K_{1m} + \frac{V_{1m}}{V_{im}} K_{im}}{1 - V_{1m}/V_{im}} - \sqrt{\left(S_0 + \frac{K_{1m} + \frac{V_{1m}}{V_{im}} K_{im}}{1 - V_{1m}/V_{im}}\right)^2 - 4 \frac{S_0 K_{im}}{(V_{im}/V_{1m}) - 1}}. \quad (2.310)$$

Из анализа этих уравнений можно сделать весьма интересный вывод: если скорость первой стадии реакции является строгими лимитирующей, т.е. справедливы неравенства

$$v_0 \ll V_{im} \text{ или } V_{1m} \ll V_{im}, \quad (2.311)$$

стационарная концентрация промежуточного метаболита существенно меньше константы Михаэлиса в реакции превращения этого метаболита, соответственно все ферменты цепи, за исключением первого, «работают» в строго бимолекулярном режиме, а не в режиме максимальной скорости или в смешанном режиме.

Действительно, если $V_{1m} \ll V_{im}$, то из уравнения (2.310) следует:

$$S_{icm} = \frac{S_0 \frac{V_{1m} K_{im}}{V_{im} - V_{1m}}}{S_0 + \frac{V_{1m} K_{im} + V_{im} K_{1m}}{V_{im} - V_{1m}}}. \quad (2.312)$$

При этом максимально возможная концентрация метаболита, реализуемая при «насыщении» системы исходным субстратом,

$$S_{icm, макс} = \frac{K_{im}}{(V_{im}/V_{1m}) - 1}, \quad (2.313)$$

т.е. $S_{icm, макс} \ll K_{im}$ при $V_{1m} \ll V_{im}$.

В более общем случае с учетом всех промежуточных метаболитов, когда все стадии полиферментного процесса, включая первую стадию (случай линейной системы уравнений), протекают в бимолекулярном режиме, стационарную кинетику реакций описывают уравнения

$$S_{ncm} = \frac{S_0}{1 + \frac{V_{nm}}{K_{nm}} \sum_{i=1}^{n-1} \frac{K_{im}}{V_{im}}} ; \quad (2.314)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{S_0}{\sum_{i=1}^n \frac{K_{im}}{V_{im}}} . \quad (3.315)$$

Анализ уравнения (2.315) приводит к выводу: наибольшее влияние на общую скорость процесса оказывают ферменты, имеющие наименьший параметр V_{im}/K_{im} . В пределе, если существует фермент, для которого отношение K_{im}/V_{im} много больше по сравнению с другими ферментами, уравнение скорости приобретает вид

$$\left(\frac{dP}{dt} \right)_{cm} = \frac{V_{im}}{K_{im}} S_0 . \quad (2.316)$$

Возникает вопрос о критериях, которые позволили бы определить, какая стадия сложного процесса является скоростьюопределяющей. Уравнения (2.314) и (2.315) дают однозначный теоретический критерий определения лимитирующей стадии. Скорость процесса линейно зависит от концентрации фермента, определяющего скорость реакции, и практически не зависит от концентрации остальных ферментов.

При увеличении скорости наиболее медленной стадии или, наоборот, при уменьшении скорости быстрой стадии может происходить смена лимитирующей стадии. Если в общую скорость реакции наибольший вклад вносят два наиболее плохо работающих фермента, уравнение стационарной скорости имеет вид

$$v_{cm} = \frac{S_0 V_{im} V_{jm}}{K_{im} V_{jm} + K_{jm} V_{im}} . \quad (2.317)$$

В условиях $V_{im} K_{jm} \ll V_{jm} K_{im}$ скорость процесса определяется i -й стадией реакции. В этой области должна наблюдаться линейная зависимость скорости процесса от концентрации j -го фермента. В области соизмеримых значений $V_{im} K_{jm}$ и $V_{jm} K_{im}$ оба фермента вносят вклад в скорость процесса и наблюдается отклонение от

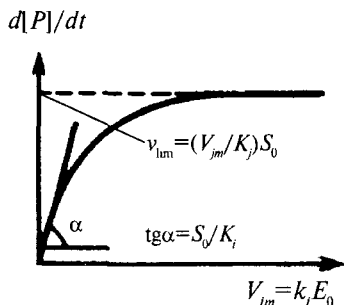


Рис. 2.114. Зависимость стационарной скорости реакции от концентрации фермента, лимитирующего общую скорость процесса на начальном участке кривой.

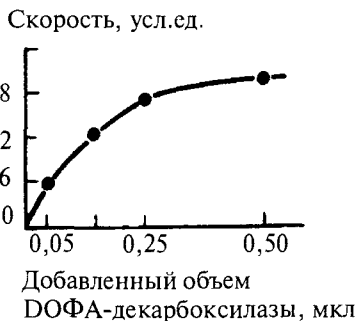


Рис. 2.115. Зависимость скорости реакции в системе ДОФА-декарбоксилаза—катехол-О-метилтрансфераза от концентрации ДОФА-декарбоксилазы.

линейной зависимости процесса по i -му ферменту. Наконец, при соотношении $V_{im}K_{jm} \gg V_{im}K_{im}$ скорость реакции не зависит от концентрации фермента E_i и лимитирующей становится j -я стадия превращения субстрата.

Рис. 2.114 иллюстрирует теоретическую зависимость скорости от концентрации фермента, лимитирующего скорость процесса при низких концентрациях. На рисунке приведены экспериментальные данные по зависимости скорости реакции от концентрации ДОФА-декарбоксилазы в системе ДОФА-декарбоксилаза-катехол-О-метилтрансфераза. Исследовалась реакция получения 3Н-3-О-метилдофамина с целью разработки радиоэнзиматического метода определения 3,4-диоксифенилаланина. При добавлении в систему до 0,05 мкл раствора ДОФА-декарбоксилазы этот фермент определяет скорость реакции, в присутствии декарбоксилазы в концентрации, соответствующей 0,5 мкл и выше, лимитирующей стадией является перенос метильной группы с помощью катехол-О-метилтрансферазы (рис. 2.115).

Вторая группа критериев, позволяющих выявить лимитирующую стадию процесса, связана с анализом относительных концентраций субстрата и промежуточных метаболитов. Субстрат лимитирующей стадии в стационарном состоянии будет иметь относительно большую концентрацию. С другой стороны, если обсуждаемая стадия реакции является быстрой и нелимитирующей, субстрат этой стадии будет в сравнительно низкой концентрации. При этом если максимальная скорость реакции на этой

стадии существенно меньше максимальной скорости лимитирующей стадии, концентрация промежуточного метаболита будет существенно меньше константы Михаэлиса быстроработающего фермента.

Указанные критерии могут быть весьма полезны при интерпретации кинетических данных, описывающих протекание различных сопряженных ферментативных реакций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Напишите кинетические схемы и уравнения, описывающие кинетику реакции в биферментной системе при условии постоянства концентрации первого субстрата. Каковы зависимости от времени субстрата S_2 и продукта реакции? Какой процесс характеризует период индукции? 2. Каковы условия установления стационарного состояния в биферментной системе? 3. Каковы критерии определения лимитирующей стадии в биферментной системе?

2.10. Кинетика действия ферментов в открытых системах

Слова наносят тайному смыслу урон, все высказанное немедленно становится слегка иным, слегка искаженным, слегка глуповатым — что же, и это неплохо, и с этим я от души согласен: так и надо, чтобы то, что для одного бесценная мудрость, для другого звучало как вздор.

Г. Гессе

Ферменты в нативном состоянии действуют как катализаторы химических реакций в открытых системах. Изучение поведения ферментов в открытых системах имеет важное значение как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Развитие экспериментальных и теоретических методов изучения кинетики действия ферментов в этих условиях существенно способствует пониманию многих особенностей катализа ферментами, поскольку открытые системы с ферментами можно рассматривать как простые модели клеточных реакций.

Под *открытыми* системами понимают системы, в которых происходит обмен компонента с окружающей средой. В данном разделе рассмотрим два типа систем.

1. *Открытая по субстрату и продуктам.* Концентрация фермента в системе предполагается постоянной, а субстрата и про-

дукты вводятся в реакцию и выводятся из зоны действия катализатора по специфическому закону обмена.

2. *Открытая по ферменту.* Предполагается, что концентрация субстрата в системе стабилизирована каким-либо механизмом, а концентрация фермента является переменной величиной. Например, осуществляется биосинтез фермента и его вывод из системы или инактивация.

Типичным представителем системы первого типа является реактор с иммобилизованным ферментом. Экспериментальное изучение и практическое использование иммобилизованных ферментов связаны с применением различного рода исследовательских и промышленных реакторов. Оптимизация реакторов и их описание для определения кинетических параметров ферментов составляют основу современных знаний по кинетике действия ферментов в открытых системах. Эта область достаточно быстро прогрессирует, поскольку опирается, с одной стороны, на богатый теоретический опыт исследования кинетики ферментативных реакций и с другой — крайне необходима при оптимизации ряда принципиально новых технологических процессов, использующих ферменты.

При анализе кинетических закономерностей в ферментативных реакторах широкое теоретическое и экспериментальное развитие получили идеальные модели реакторов. В определенном смысле проточные реакторы с иммобилизованными в них ферментами можно рассматривать как физические модели процессов, имеющих место при протекании ферментативных реакций в клетках. Степень идеализации моделей и соответственно степень приближения к реальной ситуации может варьировать в широких пределах. Закономерности, которые наблюдаются в реакторах с иммобилизованными ферментами, могут быть перенесены на открытые ферментативные системы чисто биологического характера.

Для исследования кинетики действия ферментов в открытых системах наиболее изучены и нашли применение следующие типы реакторов:

1. *Проточный безградиентный реактор* (проточный реактор идеального перемешивания) представляет собой замкнутый объем, содержащий фермент, в который с постоянной скоростью подается раствор субстрата и отводится раствор продуктов и непрореагировавшего субстрата. Существенная особенность — идеальное перемешивание компонентов реакции внутри этого объема так, что отсутствуют градиенты веществ внутри реакционного объема. Для этой цели исследовательские реакторы с иммобилизованными ферментами снабжаются обычно механической ме-

шалкой, осуществляющей идеальное безградиентное перемешивание фермента и субстрата по всему объему реактора.

2. *Проточный реактор с идеальным вытеснением* — объем равномерно заполненный ферментом, в который с постоянной скоростью подается раствор субстрата. При этом в стационарном состоянии устанавливается постоянный градиент субстрата и продукта реакции, который определяется скоростью потока вводимого субстрата.

3. *Мембранный реактор* — замкнутый объем с ферментом, массоперенос субстрата в который осуществляется путем диффузии его через полупроницаемую мембрану постоянной толщины. Наибольший интерес с точки зрения биологической кинетики представляют реакторы именно этого типа. В данной главе рассмотрена кинетика действия ферментов в клетках. При этом в первом приближении клетка рассматривается как мембранный микрореактор.

Основные принципы описания кинетики каталитических реакций в открытых по субстрату системах

Рассмотрим некоторый элементарный объем, в котором протекает катализируемая ферментом химическая реакция. Если субстрат ферментативного превращения помимо химической реакции способен по какому-либо закону обмениваться с окружающей средой, скорость изменения его концентрации описывает дифференциальное уравнение

$$d[S]dt = -(d[S]/dt)_E - (d[S]/dt)_{\text{обм}}, \quad (2.318)$$

где $(d[S]/dt)_E$ — скорость ферментативной реакции, $(d[S]/dt)_{\text{обм}}$ — скорость материального обмена.

Это уравнение является следствием уравнения материального баланса. Как скорость ферментативной реакции, так и скорость материального обмена являются функциями концентрации субстрата в данном элементарном объеме.

Участие в механизмах ферментативных реакций промежуточных соединений для большинства ферментов в растворе приводит к следующей зависимости стационарной скорости реакции от концентрации субстрата (уравнение Михаэлиса):

$$(d[S]/dt)_E = v_E = k_{\text{кат}}[E]_0[S]/(K_M + [S]). \quad (2.319)$$

Параметры $k_{\text{кат}}$ и K_M имеют эффективное значение, поскольку включают константы скоростей элементарных химических

актов многостадийного ферментативного процесса. Для ферментов в гетерогенных системах, если процесс протекает в кинетическом режиме, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата будет иметь тот же вид. Однако в гетерогенных системах параметры $k'_{кат}$ и K'_m в большинстве случаев имеют эффективный характер и осложнены кинетическими или равновесными эффектами влияния матрицы на микроокружение активных центров ферментов, например распределением субстрата между раствором и матрицей или рН-эффектами.

Как показано выше, при влиянии на кинетику процесса диффузионного массопереноса субстрата зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в растворе имеют более сложный характер. В предельных случаях, когда фермент работает в строго диффузионном режиме, эти зависимости имеют вид

$$v = \beta[S]' \quad (2.320)$$

(для внешнедиффузионного переноса), где β — коэффициент массопереноса;

$$v = \frac{A\sqrt{2D[E]}}{V} \left\{ [S]_0 + K'_M \ln \left[K'_M / (K'_M + [S]_0) \right] \right\}, \quad (2.321)$$

где A — поверхность частицы, V — объем (полубесконечное приближение для систем с внутريدиффузионным массопереносом).

В первом приближении в строго диффузионном режиме эта зависимость может быть аппроксимирована функцией

$$v = A\sqrt{2D[E]}[S]_0/V. \quad (2.322)$$

Таким образом, в строго диффузионном режиме для анализа кинетики реакций можно использовать уравнения (2.320)–(2.322). В переходной области зависимости скорости от концентрации субстрата имеют более сложный характер, и для анализа кинетики реакций в общем случае необходимо использовать ЭВМ.

В данной главе кинетика ферментативных реакций в открытых системах анализируется для наиболее важного случая, когда ферментативная реакция протекает в кинетическом режиме. При этом в качестве уравнения скорости, если нет осложняющих кинетику эффектов влияния субстрата или продукта, использовано уравнение (2.319), где значения $k'_{кат}$ и K'_m имеют характер кинетических параметров фермента для гетерогенного случая.

Скорость обмена субстрата с окружающей средой, входящая в исходное уравнение (2.318), в общем случае может быть достаточно произвольной функцией концентрации субстрата.

Рассмотрим системы, в которые субстрат вводится с постоянной скоростью:

$$U = dV/dt.$$

При этом наиболее важными являются два частных случая.

1. Введение субстрата происходит за счет вытеснения эквивалентного элементарного объема из реакционной зоны. При этом условии

$$(d[S]/dt)_{\text{обм}} = Ud[S]/dV. \quad (2.323)$$

Дифференциальное уравнение, описывающее кинетику процесса в соответствии с (2.318), (2.319) и (2.323), принимает вид

$$d[S]/dt = -V'_{\text{накс}}[S]/(K'_M + [S]) + (Ud[S]/dV). \quad (2.324)$$

Это уравнение реактора с идеальным вытеснением.

2. Если концентрация субстрата по всему объему V постоянна и введение его в реакционную зону осуществляется с постоянной объемной скоростью U в концентрации $[S]_0$, скорость обмена субстрата с окружающей средой задается уравнением

$$(d[S]/dt)_{\text{обм}} = (U/V)([S]_0 - [S]). \quad (2.325)$$

При этом условии отсутствуют градиенты концентрации субстрата внутри объема V . Это может быть достигнуто либо путем эффективного конвективного перемешивания, либо (для случаев микрореакторов) путем эффективного диффузионного перемешивания (так называемый случай бесконечных коэффициентов диффузии. В соответствии с (2.319) и (2.325) дифференциальное уравнение реактора имеет вид

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{V'_{\text{накс}}[S]}{K'_M + [S]} + \frac{U}{V}([S]_0 - [S]). \quad (2.326)$$

Аналогичное уравнение описывает кинетическое поведение микрореакторов с диффузионным переносом через полупроницаемую мембрану

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{V'_{\text{накс}}[S]}{K'_M + [S]} + \frac{DA}{lV}([S]_0 - [S]). \quad (2.327)$$

где A — поверхность мембраны; V — объем мембранного реактора; D — коэффициент диффузии субстрата в мембране; l — толщина мембраны.

Ниже дано кинетическое описание этих основных типов каталитических открытых систем с участием ферментов.

Реактор идеального вытеснения

Стационарная кинетика

Реакторы с вытеснением колоночного типа широко используются при проведении и исследовании реакций с иммобилизованными ферментами. Для анализа изменения во времени концентрации субстрата в реакторе с идеальным вытеснением необходимо решать дифференциальное уравнение (2.324) с соответствующими начальными и граничными условиями.

Рассмотрим стационарный случай, соответствующий условиям, в которых концентрация субстрата в данном элементарном объеме не меняется со временем. При этом справедливы равенства $(d[S]/dt) = 0$;

$$U(d[S]/dV) = -V'_{\text{макс}}[S]/(K'_M + [S]). \quad (2.328)$$

В процессе работы реактора устанавливается постоянный градиент концентрации субстрата по объему реактора. В качестве иллюстрации рассмотрим систему, представляющую собой объем постоянного сечения A , длины l . Примером может служить колонка постоянного диаметра, равномерно заполненная носителем с иммобилизованным ферментом. В этом случае уравнение (2.328) может быть представлено в виде

$$C \frac{d[S]}{dx} = - \frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K'_M + [S]}, \quad (2.329)$$

где $C = U/A$ — линейная скорость раствора субстрата в колонке; x — координата длины.

Это уравнение может быть проинтегрировано и найдено распределение стационарной концентрации по длине колонки (профиль концентрации). Поскольку при интегрировании зависимость $[S](x)$ будет задана в неявном виде, рассмотрим два частных случая:

1) $[S] \gg K'_M$. В этом случае концентрация субстрата в колонке линейно уменьшается с продвижением по ее длине:

$$[S](x) = [S]_0 - (V'_{\text{макс}} x/C). \quad (2.330)$$

2) $[S] \ll K'_M$. При концентрации субстрата меньше константы Михаэлиса с продвижением по координате стационарная концентрация субстрата уменьшается по экспоненциальному закону

$$[S](x) = [S]_0 \exp\left(-\frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M C} x\right).$$

В общем случае профиль концентрации субстрата складывается из линейного, переходного и экспоненциального участков. На рис. 2.116 приведены расчетные данные по исследованию реакции гидролиза *n*-нитроанилида N-глутарил-L-фенилаланина в колонке с иммобилизованным α -химотрипсином при различных линейных скоростях раствора в колонке.

Если стационарное состояние с постоянным во времени градиентом устанавливается по всему объему реактора, уравнение (2.328) с разделяющимися переменными может быть проинтегрировано по всему объему

$$- \int_{[S]_0}^{[S]} \left\{ \left(K'_M + [S] \right) / V'_{\text{макс}} [S] \right\} d[S] = \frac{1}{U} \int_0^1 dV.$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$[S]_0 - [S] - K'_M \ln \frac{[S]}{[S]_0} = \frac{V'_{\text{макс}}}{V}. \quad (2.331)$$

При анализе кинетики действия ферментов в открытых системах удобно ввести новую переменную

$$\alpha = ([S]_0 - [S]) / [S]_0, \quad (2.332)$$

которая представляет собой степень конверсии субстрата. С учетом (2.332) уравнение (2.332) приобретает вид

$$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\text{макс}} V}{K'_M U}. \quad (2.333)$$

В соответствии с этим уравнением должна наблюдаться линейная зависимость между α и $\ln(1 - \alpha)$. При этом тангенс угла наклона этой зависимости дает величину $K'_M / [S]_0$ — отрезок, отсекаемый на оси ординат $V'_{\text{макс}} [S]_0 U$. Из этих данных можно определить величины $V'_{\text{макс}}$ и K'_M . В большинстве случаев такого рода зависимости действительно имеют место.

На рис. 2.117 приведены экспериментальные данные для гидролиза *n*-нитроанилида N-глутарил-L-фенилаланина под действием химотрипсина при различных скоростях ввода субстрата в колонку. В условиях эксперимента определяемые значения $V'_{\text{макс}}$ и K'_M сравнительно слабо зависят от линейной скорости потока. В ряде случаев эти зависимости выражены более ярко. На рис. 2.118 представлены экспериментальные данные работы, в которой в колоночном реакторе исследовали гидролиз этилового эфира N-бензоил-L-аргина под действием иммобилизованного на КМ-целлюлозе фицина. Авторы интерпретируют наблюдаемую зависимость K'_M от скорости потока раствора

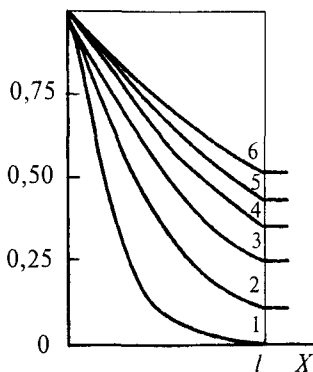


Рис. 2.116. Профиль концентраций в колонке с идеальным вытеснением при различных скоростях раствора субстрата (см/ч).

1 — 100; 2 — 200; 3 — 300; 4 — 400; 5 — 500; 6 — 600.

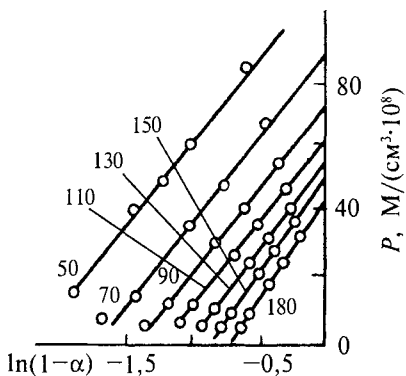


Рис. 2.117. Выход продукта в колонном реакторе как функция $\ln(1-\alpha)$ в реакции гидролиза *n*-нитроанилида-N-глутанил-L-фенилаланина при различных скоростях потока субстрата.

Цифры на прямых дают значения скоростей потока в см/ч.

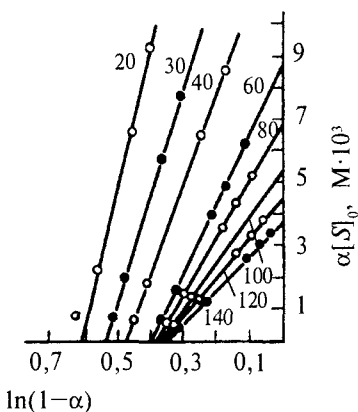


Рис. 2.118. Интерпретация кинетических данных для колонного реактора (реакция гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина под действием иммобилизованного фениламина).

Цифры на прямых дают значения объемной скорости потока, см³/ч.

как влияние диффузионных затруднений в катализе иммобилизованным ферментом.

В теоретическом плане необходимым представляется вычисление степени конверсии субстрата в реакторе при известных кинетических параметрах K'_M , $V'_{\max}$ и макрокинетических характеристик — объемной скорости потока U и объема системы V . Поскольку степень конверсии связана с этими параметрами в виде неявной функции (2.333), это определение может быть сделано лишь численно. При этом полезным представляется ввести безразмерный модуль χ :

$$\chi = \left(K'_M / V'_{\max} \right) \left(U / V \right), \quad (2.334)$$

который по физическому смыслу в первом приближении представляет собой отношение времени протекания ферментативной реакции к времени контакта субстрата с фермен-

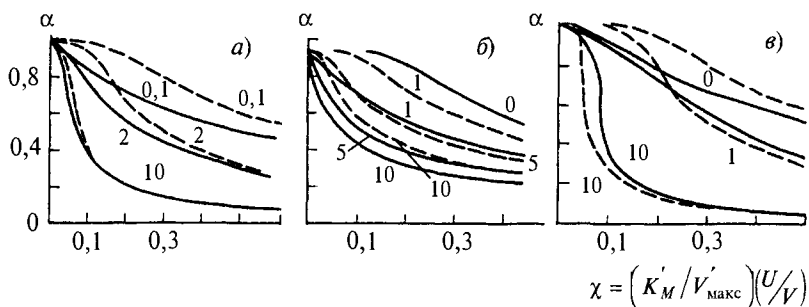


Рис. 2.119. Зависимость степени конверсии субстрата от χ при соотношениях $[S]_0/K'_M$ (а), при ингибировании субстратом и соотношениях $K'_M/K_i([S]_0/K'_M = 2)$ (б), при ингибировании продуктом и соотношениях K'_M/K_P (в). Сплошные линии — проточный реактор с перемешиванием, штриховые — проточный реактор с вытеснением.

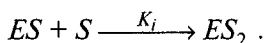
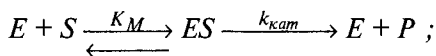
Цифры на кривых дают значения фиксированных параметров.

том. На рис. 2.119а приведена зависимость степени конверсии от χ при различных отношениях $[S]_0/K'_M$. Видно, что при увеличении χ степень конверсии субстрата уменьшается; при больших значениях $[S]_0/K'_M$ это уменьшение заметнее. Для получения высоких степеней конверсии необходимо использовать низкие концентрации субстрата и проводить реакцию при низких значениях модуля χ ($\chi < 0,1$).

Осложняющие эффекты

В ряде случаев кинетика действия ферментов осложняется влиянием ингибирования реакции избытком субстрата или продукта. Это вносит определенные изменения в уравнение скорости ферментативной реакции и соответственно в кинетические закономерности действия реактора.

Ингибирование субстратом. Случай ингибирования избытком субстрата описывает кинетическая схема



Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в этом случае имеет вид:

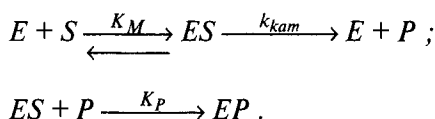
$$-(d[S]/dt)E = V'_{макс}/(1 + K'_M/[S] + [S]/K_i), \quad (2.335)$$

где K_i — константа ингибирования субстратом.

Подстановка этого уравнения в уравнение (2.324) и последующее интегрирование при $d[S]/dt = 0$ приводят к функции:

$$\alpha \left([S]_0 / K'_M \right) - \ln(1 - \alpha) + \frac{1}{2} \left([S]_0 / K'_M \right)^2 \left(K'_M / K_i \right) (2\alpha - \alpha^2) = \left(V'_{\max} / K'_M \right) (V/U). \quad (2.336)$$

Ингибирование продуктом. Кинетическая схема реакции при конкурентном ингибировании продуктом имеет вид



В соответствии с этой схемой скорость реакции описывается уравнением

$$d[P]/dt = V'_{\max} [S] / \{ (K'_M (1 + [P]/K_P) + [S]) \}, \quad (2.337)$$

где K_P — константа ингибирования продуктом.

Интегрирование уравнения с учетом этих соотношений и уравнения материального баланса приводит к следующему выражению:

$$\alpha \left(1 - \frac{K'_M}{K_P} \right) \left(\frac{[S]_0}{K'_M} \right) - \left[\left(1 + \frac{[S]_0}{K'_M} \right) \frac{K'_M}{K_P} \right] \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\max}}{K'_M} \frac{V}{U}. \quad (2.338)$$

Зависимость степени конверсии субстрата от модуля χ для реактора с вытеснением при ингибировании субстратом или продуктом приведены на рис. 2.119б, в.

Проточный реактор с перемешиванием

Этот тип реакторов широко применяется при исследовании и использовании иммобилизованных ферментов. С экспериментальной и технологической точки зрения реакторы с перемешиванием в некоторых случаях имеют преимущество перед реакторами колонного типа. Так, описано, что эксплуатация колонного реактора в течение четырех недель приводит к необходимости повышения давления вводимого раствора субстрата. Очевидно, что колонные реакторы малопригодны для проведения реакций с образованием сильных кислот или оснований, что может привести к нежелательным рН-градиентам по колонке.

Стационарные состояния реактора исследовали в реакции ферментативного разложения мочевины. Реактор с перемешиванием использовали для проведения реакций с иммобилизованной аминоглюкозидазой, глюкоамилазой и многими другими фермента-

ми. Широкое распространение получили также реакторы с ультрафильтрованием (мембранные реакторы). Они представляют собой некоторую модификацию непрерывного проточного реактора с перемешиванием, в котором перенос субстрата в реактор осуществляется через полупроницаемую мембрану. Реакторы с ультрафильтрованием были использованы для непрерывного гидролиза сахарозы под действием инвертазы, для гидролиза целлюлозы в глюкозу под действием целлюлазы.

Если в реакционный сосуд постоянного объема V с объемной скоростью U подается реагент в концентрации $[A]_0$, то изменение числа молей компонента A в реакторе в условиях идеального перемешивания в соответствии с уравнением (5.318) описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$d[A]/dt = (U/V)([A]_0 - [A]) + v_{\text{обр}} - v_p, \quad (2.339)$$

где $v_{\text{обр}}$ — скорость химического процесса образования вещества A в реакторе; v_p — скорость химического процесса расхода этого вещества.

Это уравнение — основное дифференциальное уравнение, описывающее изменение концентраций реагирующего вещества в реакторе идеального перемешивания. Оно учитывает не только скорости химических превращений компонента A , но и материальный обмен с окружающей средой. Функциональный вид величин $v_{\text{обр}}$ и v_p , входящих в уравнение, определяется механизмом реакций в соответствии с законами химической кинетики. По механизму Михаэлиса уравнения, описывающие изменения концентрации субстрата и продукта в реакторе, имеют следующий вид:

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{U}{V}([S]_0 - [S]) - \frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K_M + [S]}; \quad (2.340)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K_M + [S]} - \frac{U}{V}[P]. \quad (2.341)$$

Дифференциальное уравнение (2.340) можно решить численно или аналитически относительно функции $[S](t)$. Подстановка этой функции в уравнение (2.341) и интегрирование этого дифференциального уравнения позволяют найти зависимость от времени концентрации продукта.

При анализе кинетических закономерностей в реакторах идеального перемешивания необходимо достаточно точно знать удельную объемную скорость введения реагентов (параметр U/V). Эту

величину можно вычислить из объемной скорости введения реагентов и объема реактора. Однако в ряде случаев целесообразно определить величину U/V из независимого кинетического эксперимента. Наиболее просто это можно сделать, если в начальный момент времени ввести в реактор какое-либо вещество, которое в условиях опыта не подвергается химическому превращению. Кинетика расхода этого вещества в реакторе будет описываться уравнением

$$d[A]/dt = -U[A]/V, \quad (2.342)$$

интегрирование которого приводит к соотношению

$$[A] = [A]_0 \exp[-(U/V)t].$$

Анаморфоза этого уравнения в полупологарифмических координатах позволяет определить величину удельной скорости подачи исходных веществ в систему.

В реактор данного типа субстрат может быть введен двумя различными способами: а) импульсно, т.е. субстрат вводится в начальный момент времени, и в дальнейшем введенная порция субстрата расходуется как в результате выхода из реактора за счет проточных условий, так и в результате химической реакции, катализируемой ферментом; б) введение субстрата в реактор может осуществляться постоянно со скоростью U вместе с потоком растворителя. Дифференциальные уравнения, описывающие изменение концентрации субстрата в реакторе, несколько различаются в зависимости от способа введения и имеют отличные друг от друга решения.

Кинетические закономерности в нестационарных режимах. Импульсное введение субстрата

Если в реактор, в который со скоростью U подается растворитель, в начальный момент времени $t = 0$ импульсно ввести субстрат, кинетические закономерности изменения концентрации субстрата в реакторе описывает дифференциальное уравнение с разделяющимися переменными

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{U}{V}[S] - \frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K'_M + [S]}.$$

Интегрирование этого уравнения при условии $t = 0$, $[S] = [S]_0$ (где $[S]_0$ — концентрация субстрата в начальный момент времени во всем объеме реактора) приводит к следующему соотношению:

$$\frac{K'_M}{K'_M + \frac{V'_{\max}}{U/N}} \ln \frac{[S]_0}{[S]} \frac{K'_M + [S] + \frac{V'_{\max}}{U/N}}{K'_M + [S]_0 + \frac{V'_{\max}}{U/N}} + \ln \frac{K'_M + [S]_0 + \frac{V'_{\max}}{U/N}}{K'_M + [S] + \frac{V'_{\max}}{U/N}} = \frac{U}{V} t. \quad (2.343)$$

Анализ показывает, что исследование реакции при импульсном введении субстрата может оказаться полезным, если достаточно определить величину $V'_{\max}/K'_M$. Как известно, величина $V'_{\max}/K'_M$ ($k'_{\text{кат}}/K'_M$) является важным параметром ферментативной реакции и во многих случаях имеет ясный физический смысл.

В табл. 2.22 приведен ряд асимптотических частных случаев, в которых уравнение (2.343) трансформируется в простые соотношения, описывающие изменения во времени концентрации субстрата и продукта реакции. Меняя параметры $[S]_0$ и U/V , в большинстве случаев можно подобрать экспериментальные условия, в которых будет выполняться одно из соотношений таблицы. Как видно, изменение концентрации субстрата во време-

Таблица 2.22

Асимптотические случаи уравнения (2.343)

Условия	$[S]$	$[P]$
$K'_M \gg [S]_0 + \frac{V'_{\max}}{U/N}$	$[S] = [S]_0 e^{-\frac{U}{V}t}$	$[P] = \frac{V'_{\max}}{K'_M} [S]_0 t e^{-\frac{U}{V}t},$ если $[S]_0 \ll K'_M$
$\frac{V'_{\max}}{U/N} \gg K'_M + [S]_0$	$[S] = [S]_0 e^{-\frac{V'_{\max}}{K'_M}t}$	$[P] = [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{V'_{\max}}{K'_M}t} \right) e^{-\frac{U}{V}t},$ если $[S]_0 \ll K'_M$
$\frac{V'_{\max}}{U/N} + K'_M \gg [S]_0$	$[S] = [S]_0 e^{-\left(\frac{V'_{\max}}{K'_M} + \frac{U}{V} \right)t}$	$[P] = [S]_0 \left(1 - e^{-\frac{V'_{\max}}{K'_M}t} \right) e^{-\frac{U}{V}t}$

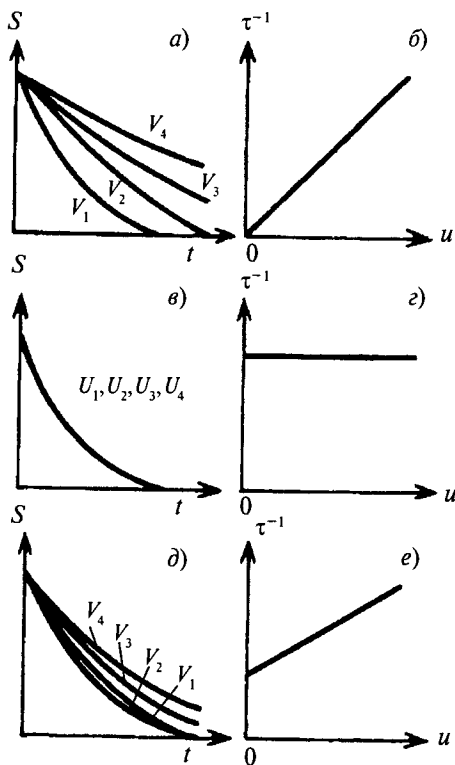


Рис. 2.120. Кинетика изменения концентрации субстрата в проточном реакторе с перемешиванием при импульсном введении субстрата ($U_1 = 2$, $U_2 = 3$, $U_3 = 4U_4$).

а, б — (условие $K'_M \gg [S]_0 + V'_{\max}/(U/V)$);
в, г — (условие $V'_{\max}/(U/V) \gg K'_M + [S]_0$);
д, е — (условие $K'_M + V'_{\max}/(U/V) \gg [S]_0$).
Кинетика реактора в указанных условиях различается по зависимости наблюдаемого времени полупревращения τ от скорости потока (б, г, е).

ни описывается простыми экспоненциальными уравнениями (рис. 2.120). Кинетика реакций различается по зависимости наблюдаемого времени полупревращения от скорости потока.

В этой же таблице приведены также функции для зависимости от времени концентрации продукта. Как видно из характера уравнений, концентрация продукта в реакторе при импульсном введении субстрата проходит через максимальное значение (рис. 2.121а–е).

Значение времени достижения максимальной концентрации продукта может служить удобным критерием справедливости в условиях опыта соотношения (2.344) и соответствующих уравнений, поскольку в данном случае оно определяется весьма простым уравнением

$$t_{\max} = (U/V) - 1. \quad (2.347)$$

Для остальных случаев время достижения максимальной концентрации связано с параметрами $V'_{\max}/K'_M$ и U/V уравнением

$$t_{\max} = \frac{K'_M}{V'_{\max}} \left(1 + \frac{V'_{\max}}{K'_M} \frac{U}{V} \right). \quad (2.345)$$

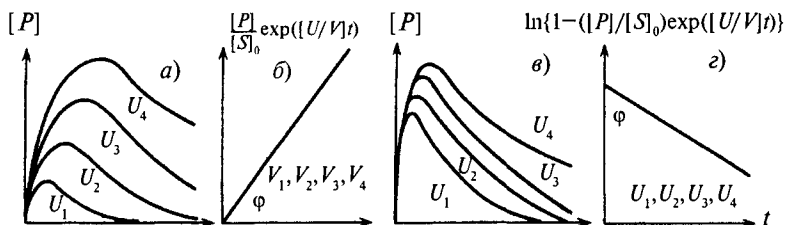


Рис. 2.121. Кинетические кривые накопления и расхода продукта для импульсного введения субстрата ($U_1 = 2, U_2 = 3, U_3 = 4, U_4$) при выполнении соотношения (2.344) (а) и соотношений (2.345) или (2.346) (б); спрямление приведенных кинетических кривых в соответствующих координатах (в, г). $\operatorname{tg} \varphi = V'_{\max} / K'_M$

Кинетические закономерности при непрерывной подаче субстрата

Если субстрат непрерывно вводить в реактор вместе с потоком растворителя со скоростью U , то дифференциальные уравнения, описывающие изменения концентрации субстрата и продукта, даны соотношениями (2.340) и (2.341), где $[S]_0$ — концентрация вводимого в реактор раствора субстрата. Решение уравнения (2.340) при использовании начального условия $t = 0, [S] = 0$ имеет следующий вид:

$$\left(K'_M + S_2 \right) \ln \left(1 + \frac{[S]}{S_2} \right) - \left(K'_M + S_1 \right) \ln \left(1 - \frac{[S]}{S_2} \right) = \frac{U}{V} (S_1 - S_2) t, \quad (2.346)$$

где

$$S_{12} = \frac{[S]_0 - K'_M - \frac{V'_{\max}}{U/V}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[S]_0 - K'_M - \frac{V'_{\max}}{U/V}}{4} \right)^2 + [S]_0 K'_M}. \quad (2.347)$$

При анализе кинетики реакции важны два асимптотических приближения:

1. При использовании высоких насыщающих концентраций субстрата, когда

$$[S]_0 \gg K'_M + \frac{V'_{\max}}{U/V}, \quad (2.348)$$

справедливы следующие равенства:

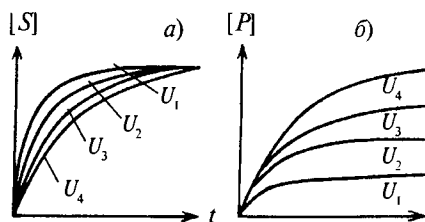


Рис. 2.122. Кинетические кривые накопления субстрата (а) и продукта (б) при выполнении соотношения (2.351) ($U_1 = 2, U_2 = 3, U_3 = 4U_4$).

Стационарная концентрация субстрата не зависит от скорости потока, а стационарная концентрация продукта обратно пропорциональна скорости потока.

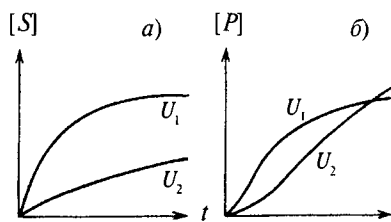


Рис. 2.123. Кинетические кривые накопления субстрата (а) и продукта (б) при непрерывном введении субстрата и выполнении соотношения $[S]_0 \ll K'_M$ ($V'_{\text{макс}}/K'_M = 0,4$ ($U_1/V = 2(U_2/V)$)).

Стационарная концентрация субстрата пропорциональна и увеличивается с увеличением скорости потока, стационарная концентрация продукта уменьшается с увеличением скорости потока.

$$\begin{aligned} S_1 &= [S]_0, \\ S_2 &= -K'_M. \end{aligned} \quad (2.349)$$

В этом случае уравнение (2.346) принимает вид

$$[S] = [S]_0 \left[1 - e^{-\frac{U}{V}t} \right]. \quad (2.350)$$

На рис. 2.122 приведены кинетические кривые накопления субстрата при различных скоростях подачи раствора субстрата в реактор.

Подстановка уравнения (2.350) в (2.340) и интегрирование полученного дифференциального уравнения позволяют найти зависимость концентрации продукта от времени в реакторе (см. рис. 2.122):

$$[P] = \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V} \left[1 - e^{-(U/V)t} \right]. \quad (2.351)$$

Из этих уравнений можно найти значения $V'_{\text{макс}}$.

2. В другом экстремальном случае, а именно при низких концентрациях субстрата, когда $[S]_0 \ll K'_M$, уравнение также можно упростить:

$$S_1 = \frac{K'_M + [S]}{K'_M + \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V}}; \quad S_2 = - \left(K'_M + \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V} \right). \quad (2.352)$$

Поскольку иррациональный член раскладывается в быстроходящийся степенной ряд относительно $4K'_M[S]_0 / \left(K'_M + \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V} \right)^2 \ll 1$, в итоге получаем простое уравнение

$$S = \frac{[S]_0}{1 + \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} / \frac{U}{V}} \left\{ 1 - \exp \left[- \left(\frac{U}{V} + \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \right) t \right] \right\}. \quad (2.353)$$

Графический вид функции (2.353) при различных значениях приведен на рис. 2.123. Эта простая экспоненциальная зависимость позволяет определить величину $V'_{\text{макс}}/K'_M$.

Подстановка уравнения (2.353) в (2.341) дает при последующем интегрировании возможность выявить зависимость концентрации продукта реакции от времени:

$$[P] = \left\{ \frac{e^{-\frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} t} - 1}{1 + \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} / \frac{U}{V}} - \frac{1}{1 + \frac{U}{V} / \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M}} \right\} [S]_0 e^{-\frac{U}{V} t} + \frac{[S]_0}{1 + \frac{U}{V} / \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M}}. \quad (2.354)$$

В отличие от насыщающей концентрации субстрата зависимость концентрации продукта от времени при низких концентрациях субстрата имеет точку перегиба; сравни кривые на рис. 2.122, 2.123. Абсцисса этой точки равна:

$$t_{\text{пер}} = \frac{K'_M}{V'_{\text{макс}}} \ln \left(\frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} + \frac{U}{V} \right)^2 / \left[\left(\frac{U}{V} \right)^2 + \frac{U}{V} \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \right]. \quad (2.355)$$

Стационарная кинетика

При непрерывном введении в реактор субстрата через некоторое время в реакторе установится стационарная концентрация всех компонентов реакции. Наглядно это видно, например, из уравнений (2.352) и (2.353), которые характеризуют кинетику реакции при насыщающей концентрации субстрата. Из этих уравнений следует, что при $t \rightarrow \infty$ концентрации продукта и субстрата стремятся к стационарным значениям

$$[S]_{cm} = [S]_0;$$

$$[P]_{cm} = V'_{\text{макс}}/(U/V).$$

В другом частном случае (при низких концентрациях субстрата) стационарные концентрации S и P принимают значения

$$[S]_{cm} = \frac{[S]_0}{1 + \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{U}{V}}; \quad [P]_{cm} = \frac{[S]_0}{1 + \frac{U}{V} \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M}}.$$

Условие стационарности $d[S]/dt = 0$ позволяет свести исходное дифференциальное уравнение к алгебраическому выражению

$$\frac{U}{V}([S]_0 - [S]_{cm}) = \frac{V'_{\text{макс}}[S]_{cm}}{K'_M + [S]_{cm}}.$$

В результате решения этих уравнений относительно величины $[S]$ имеем

$$[S]_{cm} = \frac{[S]_0 - K'_M - \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V}}{2} + \sqrt{\frac{\left([S]_0 - K'_M - \frac{V'_{\text{макс}}}{U/V}\right)^2}{4} + [S]_0 K'_M}. \quad (2.356)$$

При промежуточных значениях $[S]_0$, когда начальная концентрация субстрата соизмерима с K'_M , стационарная концентрация субстрата в реакторе является достаточно сложной функцией кинетических параметров ферментативной реакции, а также удельной объемной скорости потока U/V [см. уравнение (2.356)]. Тем не менее искомые величины $V'_{\text{макс}}$ и K'_M могут быть определены при исследовании зависимости стационарной концентрации субстрата в реакторе как от скорости введения реагента, так и от начальной концентрации субстрата (рис.2.124):

$$\frac{1}{\frac{U}{V}([S]_0 - [S]_{cm})} = \frac{1}{V'_{\max}} + \frac{K'_M}{V'_{\max}} \frac{1}{[S]_{cm}}. \quad (2.357)$$

Выражение для стационарной концентрации продукта P вытекает из уравнения (2.341), если учесть (2.358) и предположить, что $d[P]/dt = 0$:

$$[S]_{cm} = [S]_0 = [P]_{cm}; \quad (2.358)$$

$$\frac{1}{\frac{U}{V}[P]_{cm}} = \frac{1}{V'_{\max}} + \frac{K'_M}{V'_{\max}} ([S]_0 - [P]_{cm}). \quad (2.359)$$

Как видно из (2.359), искомые значения $V'_{\max}$ и K'_M могут быть найдены путем исследования зависимости стационарной концентрации P от U/V и $[S]_0$.

В условиях стационарности степень конверсии субстрата не зависит, очевидно, от времени. Уравнение (2.356) можно представить в виде

$$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1 + \alpha} = \frac{V'_{\max}}{K'_M} \frac{U}{V} = \frac{1}{\chi}. \quad (2.360)$$

На рис. 2.119а в соответствии с уравнением (2.360) приведена зависимость степени конверсии от модуля χ при заданных значениях соотношения $[S]_0/K'_M$. Модуль χ имеет то же самое значение, что и для реактора с вытеснением. Видно, что степень конверсии субстрата существенно уменьшается с увеличением скорости потока при данном значении $[S]_0/K'_M$, а также с увеличением отношения $[S]_0/K'_M$ при заданной величине скорости потока.

Осложняющие эффекты

Ингибирование субстратом.

Для случая ингибирования субстратом стационарное состояние реактора описывается следующим уравнением:

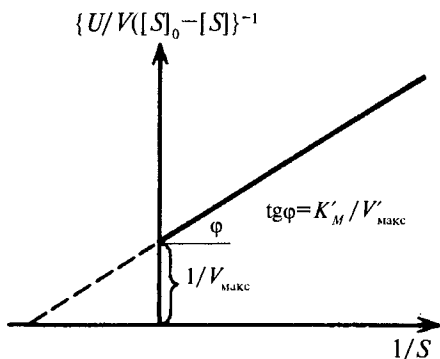


Рис. 2.124. Определение параметров $V'_{\max}$ и K'_M из данных по стационарному состоянию проточного реактора с идеальным перемешиванием.

$$\alpha \frac{[S]_0}{K_M} + \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \left(\frac{[S]_0}{K_M} \right)^2 \frac{K_i}{K_M} (\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_{\max}}{K_M} \frac{U}{V}. \quad (2.361)$$

На рис. 2.119б дан график зависимости степени конверсии от скорости потока при равных соотношениях константы ингибирования и константы Михаэлиса. Видно, что степень конверсии субстрата быстро уменьшается с увеличением отношения K'_M/K_i .

Показано, что при ингибировании субстратом в проточном реакторе с перемешиванием возможно более чем одно стационарное состояние (т.е. более чем один набор условий, при которых $d[S]/dt = 0$). Неустойчивые стационарные состояния относятся преимущественно к низким значениям отношения $K'_M/[S]_0$ и наблюдаются в области 50–100% превращения.

Ингибирование продуктом. Стационарное состояние реактора при ингибировании продуктом описывает уравнение

$$\alpha \frac{[S]_0}{K_M} + \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \frac{[S]_0}{K_M} \frac{K'_M}{K_P} \frac{\alpha^2}{(1 - \alpha)} = \frac{V'_{\max}}{K_M} \frac{V}{U}. \quad (2.362)$$

Вычисленная в соответствии с этим уравнением зависимость степени конверсии от скорости потока показана на рис. 2.119в. Как и при ингибировании субстратом, наблюдается существенное уменьшение степени конверсии субстрата при увеличении скорости потока и при увеличении отношения K'_M/K_P .

Сравнение эффективности действия проточных реакторов

Кинетические закономерности протекания ферментативных реакций для двух идеализированных приближений (реактор идеального смешения и реактор идеального вытеснения) приведены в табл. 2.23, где для сравнения даны уравнения, описывающие кинетику реакций в периодическом непроточном реакторе с перемешиванием. Интересно отметить, что уравнения для проточного реактора с вытеснением аналогичны кинетическим уравнениям для периодического реактора, в которых переменная t заменена параметром V/U (эффективное время контакта). Как следует из данных, представленных в табл. 2.23, кинетика реакций в проточных реакторах определяется безразмерным модулем χ (правые части всех кинетических уравнений равны $1/\chi$).

На рис. 2.119а–в сравнивается зависимость степени конверсии субстрата от скорости потока в отсутствие ингибирования (см. рис. 2.119а) при ингибировании субстратом (см. рис. 2.119б)

Таблица 2.23

Сравнение эффективности проточных реакторов

Тип реактора	Основное дифференциальное уравнение	Решение	Осложняющие эффекты	
			ингибирование субстратом	ингибирование продуктом
Периодический	$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K'_M + [S]}$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} t$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \ln(1 - \alpha) + \frac{1}{2} \left(\frac{[S]_0}{K'_M} \right)^2 \frac{K'_i}{K'_M} (2\alpha - \alpha^2) = \left(V'_{\text{макс}} / K'_M \right) t$	$\alpha \left(1 - \frac{K'_M}{K'_P} \right) \frac{[S]_0}{K'_M} - \left[\left(1 + \frac{[S]_0}{K'_M} \right) \frac{K'_M}{K'_P} \right] \times \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} t$
Проточный с перемешиванием	$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{V'_{\text{макс}}[S]}{K'_M + [S]} + \frac{U}{V} \times ([S]_0 - [S])$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \frac{\alpha}{1 + \alpha} = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \left(\frac{[S]_0}{K'_M} \right)^2 \times \frac{K'_i}{K'_M} (\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} + \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \frac{[S]_0}{K'_M} \frac{K'_M}{K'_P} \times \frac{\alpha^2}{1 - \alpha} = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$
Проточный с вытеснением	$\frac{d[S]([S] + K'_M)}{V'_{\text{макс}}[S]} = -\frac{dV}{U}$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$	$\alpha \frac{[S]_0}{K'_M} - \ln(1 - \alpha) + \frac{1}{2} \left(\frac{[S]_0}{K'_M} \right)^2 \frac{K'_M}{K'_i} (2\alpha - \alpha^2) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$	$\alpha \left(1 - \frac{K'_M}{K'_P} \right) \frac{[S]_0}{K'_M} - \left[\left(1 + \frac{[S]_0}{K'_M} \right) \frac{K'_M}{K'_P} \right] \times \ln(1 - \alpha) = \frac{V'_{\text{макс}}}{K'_M} \frac{V}{U}$

и продуктом (см. рис. 2.119б) для двух проточных реакторов: с перемешиванием (сплошная линия) и вытеснением (штриховая). Как следует из рис. 2.119а, для данной скорости потока степень конверсии субстрата в реакторе с вытеснением всегда выше, чем в реакторе с перемешиванием, однако чем выше отношение $[S]_0/K'_M$, тем меньше различия между двумя типами реакторов. Аналогичная зависимость наблюдается и при ингибировании продуктом (см. рис. 2.119б). При ингибировании реакции субстратом (см. рис. 2.119б) при низких скоростях потока реактор с вытеснением дает большую степень конверсии. В общем случае может быть показано, что при $[S]_0 < [S]_{\text{макс}}$ ($[S]_{\text{макс}}$ — концентрация субстрата, при которой наблюдается максимальная скорость реакции) реактор с вытеснением всегда приводит к большей степени конверсии. При $[S]_0 > [S]_{\text{макс}}$ реактор с перемешиванием может давать степень конверсии больше, чем реактор с вытеснением (см. рис. 2.119б).

Таким образом, на основе использования уравнений, приведенных в табл. 2.23, при известных кинетических параметрах фермента $V'_{\text{макс}}$ и K'_M и макрокинетических характеристиках U и V можно численно определить степень конверсии субстрата. В ряде случаев важна приближенная оценка степени конверсии и полезно вычисление модуля χ . Как следует из данных, приведенных на рис. 2.119а–в, степень конверсии уменьшается с увеличением χ . Для оценки можно использовать то обстоятельство, что при $\chi < 0,05$ степень конверсии для всех типов реакторов близка к единице.

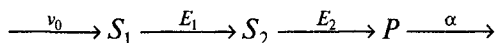
Приведенный выше кинетический анализ действия ферментов в открытых системах основан на ряде идеализированных предположений, самой главной из которых является предположение о протекании ферментативной реакции в кинетическом режиме. Как известно, для реакций с иммобилизованными ферментами это не всегда имеет место. Эффекты массопереноса субстрата в наибольшей степени должны проявляться для реакторов с вытеснением, особенно при низких скоростях потока. На это было обращено внимание при исследовании иммобилизованной амилоглюкозидазы и было проведено сравнение реактора с перемешиванием и реактора с вытеснением. Оказалось, что в отличие от теоретического предсказания реактор с вытеснением обладает меньшей эффективностью. На рис. 2.125 приведена зависимость степени конверсии мальтозы в глюкозу от скорости потока. Во всем диапазоне исследованных скоростей реактор с перемешиванием приводил к большей степени конверсии. Кривая 3 на рис. 2.125 получена теоретически для реактора с вытеснением при использовании независимым способом определенных парамет-

ров $V'_{\text{макс}}$ и K'_M . Это обстоятельство должно учитываться в конкретной работе с иммобилизованными ферментами.

Существует тип реакторов, который, по-видимому, в значительной степени лишен недостатков, присущих реакторам с вытеснением и перемешиванием. Это реакторы с псевдооживленным подвижным слоем катализатора, промежуточные между реакторами с перемешиванием и вытеснением.

Регуляция полиферментных открытых систем

Рассмотрим элементы теории регуляции полиферментных систем на примере анализа открытой полиферментной реакции, представленной кинетической схемой



Предположим, что субстрат поступает в систему со скоростью v_0 , отток продукта осуществляется по первому порядку с наблюдаемым кинетическим параметром α ; E_1 и E_2 — ферменты, скорости действия которых описываются уравнением Михаэлиса-Ментен. Общая концентрация ферментов E_1 и E_2 во времени не меняется, т.е. система закрыта с точки зрения потоков ферментов.

В отсутствие ингибиторов динамика изменения концентраций компонентов описывается системой уравнений

$$\begin{cases} \frac{dS_1}{dt} = v_0 - \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1} \\ \frac{dS_2}{dt} = \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1} - \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2} \\ \frac{dP}{dt} = \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2} - \alpha P \end{cases} \quad (2.363)$$

здесь V_1 , K_1 , V_2 , K_2 — максимальные скорости и константы Михаэлиса действия первого и второго ферментов.

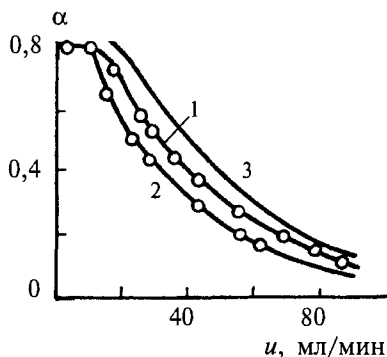


Рис. 2.125. Зависимость степени конверсии от скорости ввода субстрата в реакции превращения мальтозы.

1 — в реакторе с идеальным перемешиванием; 2 — в реакторе с вытеснением; кривая 3 имеет теоретический характер и вычислена по уравнению (2.333).

В стационарном состоянии при $dS_1/dt = 0$, $dS_2/dt = 0$ и $dP/dt = 0$ стационарные концентрации промежуточных субстратов и продуктов будут определяться уравнениями

$$S_{1,cm} = \frac{v_0 K_1}{V_1 - v_0}; \quad S_{2,cm} = \frac{v_0 K_2}{V_2 - v_0}; \quad P_{cm} = \frac{v_0}{\alpha}. \quad (2.364)$$

Из этих уравнений следует, что стационарные состояния по субстратам S_1 и S_2 могут иметь место лишь при условии, согласно которому максимальные скорости действия первого и второго ферментов превышают скорость ввода в систему первого субстрата: $V_1 > v_0$, $V_2 > v_0$. При приближении v_0 к V_1 или V_2 стационарные концентрации промежуточных субстратов устремляются в бесконечность, а при $v_0 > V_1$, V_2 стационарного состояния вообще не обрывается.

Принципиально важным параметром, модулирующим кинетическое поведение системы, является скорость ввода субстрата S_1 в систему. Представим себе, что за счет какого-то внешнего воздействия скорость ввода субстрата увеличилась на величину Δv . Как это изменение отразится на стационарных уровнях концентраций субстрата и продукта?

Из уравнений (2.364) следует:

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1} \right) = \frac{\Delta v / v_0}{1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right)}; \quad \left(\frac{\Delta S_2}{S_2} \right) = \frac{\Delta v / v_0}{1 - \frac{v_0}{V_2} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right)};$$

$$\left(\frac{\Delta P}{P} \right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0}. \quad (2.365)$$

Относительные изменения стационарных концентраций компонентов реакции определяются величиной относительного изменения скорости ввода S_1 . При $V_1 \gg v_0$ и $V_2 \gg v_0$ и небольших отклонениях в скорости ввода субстрата ($\Delta v / v_0 \leq 1$) они равны

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1} \right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0}; \quad \left(\frac{\Delta S_2}{S_2} \right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0}. \quad (2.366)$$

Для системы существует критическое изменение скорости ввода, в районе которого стационарные концентрации компонентов становятся бесконечными:

$$\left(\frac{\Delta v}{v_0} \right)_{кр} = \frac{V_1}{v_0} - 1; \quad \left(\frac{\Delta v}{v_0} \right)_{кр} = \frac{V_2}{v_0} - 1. \quad (2.367)$$

Рис. 2.126 иллюстрирует связь между относительным изменением скорости ввода субстрата и относительным изменением его стационарной концентрации. При $(v_0/V_1) \ll 1$ в достаточно большом диапазоне наблюдается линейная связь между $\Delta v/v_0$ и $(\Delta S_1/S_1)_{ст}$. При этом абсолютные значения прироста концентраций компонентов в режиме малых относительных изменений скорости приблизительно одинаковы для всех значений (v_0/V_1) [см. уравнения 2.365)].

Конкурентный и неконкурентный ингибиторы

Предположим, что в систему введен неконкурентный ингибитор первого фермента и его концентрация в исследуемых интервалах времени поддерживается постоянной. Дифференциальные уравнения, описывающие динамическое поведение системы, имеют вид

$$\begin{aligned} \frac{dS_1}{dt} &= v_0 - \frac{V_1 S_1}{(K_1 + S_1) \left(1 + \frac{1}{K_i}\right)}; \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{V_1 S_1}{(K_1 + S_1) \left(1 + \frac{1}{K_i}\right)} - \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2}; \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2} - \alpha P. \end{aligned} \quad (2.368)$$

В стационарном состоянии (при $dS_1/dt = 0$, $dS_2/dt = 0$, $dP/dt = 0$) концентрации компонентов будут представлены функциями

$$S_1 = \frac{K_1}{\frac{V_1}{v_0(1 + I/K_i)} - 1}; \quad S_{2,cm} = \frac{K_2}{\frac{V_2}{v_0} - 1}; \quad P_{cm} = \frac{v_0}{\alpha}. \quad (2.369)$$

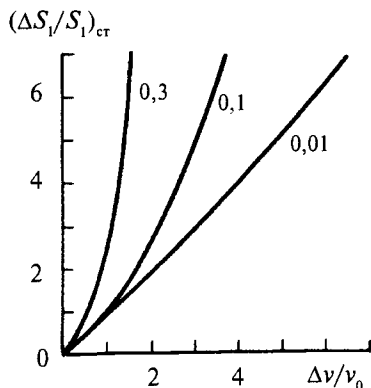


Рис. 2.126. Влияние относительного прироста скорости ввода субстрата в полиферментную систему на относительное увеличение стационарной концентрации субстрата при различных значениях отношения v_0/V_1 (цифры на кривых). Расчеты сделаны по уравнениям (2.365).

Для случая конкурентного ингибирования имеем

$$\frac{dS_1}{dt} = v_0 - \frac{V_1 S_1}{K_1 \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S_1}.$$

Соответственно стационарная концентрация субстрата равна

$$S_{1,cm} = \frac{K_1 \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\frac{V_1}{v_0} - 1}. \quad (2.370)$$

Стационарные концентрации S_2 и P , как и в случае неконкурентного ингибирования, определяются по уравнениям (2.369).

Если в систему вводится ингибитор второго фермента, то в уравнение скорости для второго субстрата и продукта вводится соответствующий концентрационный член

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1} - \frac{V_2 S_2}{(K_2 + S_2) \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} - \text{неконкурентное ингибирование};$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1} - \frac{V_2 S_2}{K_2 \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S_2} - \text{конкурентное ингибирование}.$$

В этом случае стационарные концентрации компонентов будут представлены уравнениями

$$\begin{cases} S_{1,cm} = \frac{K_1 v_0}{V_1 - v_0} \\ S_{2,cm} = \frac{K_1}{\frac{V_1}{v_0} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) - 1} \end{cases} - \text{неконкурентное ингибирование}; \quad (2.371)$$

$$\begin{cases} S_{1,cm} = \frac{K_1 v_0}{V_1 - v_0} \\ S_{2,cm} = \frac{K_1 \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\frac{V_1}{v_0} - 1} \end{cases} - \text{ингибирование}. \quad (2.372)$$

Сравнивая эти уравнения, можно сделать весьма важный качественный вывод: ингибитор влияет на стационарный уровень субстрата лишь того фермента, с которым взаимодействует данный ингибитор, не затрагивая при этом стационарный уровень других низкомолекулярных компонентов полиферментного процесса. Ингибитор повышает уровень концентрации субстрата для ингибируемого фермента и не «чувствуется» на уровне других метаболитов. Качественно это понятно, поскольку введение субстрата «навязывает» системе общую стационарную скорость v_0 . Ингибитор, взаимодействуя с ферментом, уменьшает его активность, и для компенсации скорости необходим рост концентрации субстрата только этого фермента.

Второй важный вывод связан с принципиальным различием в кинетическом проявлении конкурентного и неконкурентного ингибирования. Для конкурентного ингибирования существует линейная связь между уровнем концентрации ингибитора и стационарным уровнем концентрации субстрата и на любом отрезке концентрации ингибитора (от нуля до бесконечности). Для неконкурентного ингибитора это не так. Его концентрация в системе может достичь критической, при которой начинает неограниченно расти концентрация субстрата ингибируемого фермента. Величина критической концентрации ингибитора определяется величиной константы ингибирования и значением отношения V_i/v_0 :

$$I_{\text{кр}} = K_i \left(\frac{V_i}{v_0} - 1 \right). \quad (2.373)$$

Рис. 2.127 иллюстрирует это принципиальное различие в кинетическом проявлении конкурентного и неконкурентного ингибирования полиферментной реакции.

Рассмотрим регуляторные закономерности ингибируемой полиферментной реакции при двух различных модулирующих воздействиях: 1) путем введения ингибитора; 2) путем изменения скорости ввода субстрата в присутствии ингибитора.

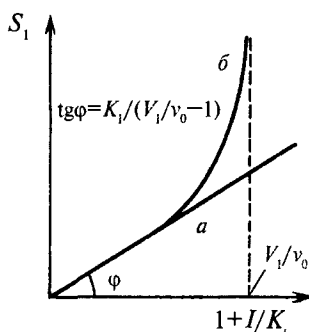


Рис. 2.127. Различие в кинетическом проявлении конкурентного и неконкурентного ингибирования фермента в полиферментной реакции. Зависимость стационарной концентрации субстрата от концентрации ингибитора (переменная $(1 + I/K_i)$ для случаев конкурентного (а) и неконкурентного (б) механизмов ингибирования.

Если реакция «возмущается» введением ингибитора, относительное возрастание концентрации субстрата, ферментное превращение которого блокируется данным ингибитором, будет представлено уравнениями

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{I/K_i}{1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} - \text{неконкурентное ингибирование}; \quad (2.374)$$

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{I}{K_i} - \text{конкурентное ингибирование}. \quad (2.375)$$

Видно, что относительное увеличение концентрации субстрата для конкурентного ингибирования линейно связано с концентрацией ингибитора, а для неконкурентного — имеет место линейный рост с резким возрастанием стационарной концентрации субстрата при приближении к критическому значению концентрации ингибитора. Критическое значение концентрации ингибитора дано уравнением (2.373).

При возмущении системы изменением скорости ввода субстрата на величину Δv относительные изменения его концентрации, например для первого субстрата, будут равны:

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v/v_0}{1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0}\right)} - \text{конкурентное ингибирование}; \quad (2.376)$$

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v/v_0}{1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0}\right) \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} - \text{неконкурентное ингибирование}. \quad (2.377)$$

В случае конкурентного ингибитора относительное изменение концентрации субстрата не зависит от концентрации ингибитора и имеет тот же самый вид, что и в отсутствие ингибитора.

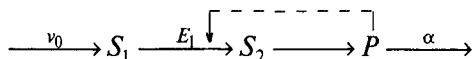
В случае же неконкурентного ингибитора относительное изменение концентрации субстрата связано со степенью ингибирования фермента. При этом существует критическое относительное изменение скорости ввода субстрата, достижение которого лишает систему возможности образовать стационарное состояние

$$\left(\frac{\Delta v}{v_0}\right)_{кр} = \frac{V_1}{v_0(1 + I/K_i)} - 1.$$

Из этого уравнения видно, что введение неконкурентного ингибитора дестабилизирует систему, уменьшает порог возмущающих изменений, способных лишить систему возможности образовать устойчивое стационарное состояние.

Ингибирование продуктом (системы с отрицательной обратной связью)

Принципиально важным является исследование кинетических закономерностей в поведении системы при наличии различных обратных связей. Рассмотрим свойства полиферментной системы при обратимом ингибировании первого фермента продуктом реакции. Схему процесса можно представить в виде



Штриховой линией обозначена отрицательная обратная связь.

Динамику изменения концентрации компонентов в системе с учетом ингибирующих эффектов можно описать уравнениями

$$\frac{dS_1}{dt} = v_0 - \frac{V_1 S_1}{(K_1 + S_1)(1 + P/K_i)} \quad \text{— неконкурентное ингибирование продуктом;} \quad (2.378)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = v_0 - \frac{V_1 S_1}{K_1(1 + P/K_i) + S_1} \quad \text{— конкурентное ингибирование продуктом.} \quad (2.379)$$

Здесь K_i — константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор;

$$\frac{dS_2}{dt} = v(S, P) - \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2}, \quad (2.380)$$

где $v(S, P)$ — скорость накопления второго субстрата;

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2} - \alpha P.$$

В стационарном режиме имеет место равенство

$$P_{cm} = \frac{v_0}{\alpha}.$$

Соответственно

$$S_{1,cm} = \frac{K_1(1 + v_0/\alpha K_i)}{(V_1/v_0) - (1 + v_0/\alpha K_i)} \quad \text{— неконкурентное ингибирование продуктом;} \quad (2.381)$$

$$S_{1,cm} = \frac{K_1(1 + v_0/\alpha K_i)}{(V_1/v_0) - 1} \text{ — конкурентное ингибирование продуктом.} \quad (2.382)$$

Из этих уравнений следует, что при ингибировании реакции продуктом должны наблюдаться накопление субстрата, с которым взаимодействует ингибируемый фермент, и быстрый рост стационарной концентрации промежуточного субстрата с возрастанием общей скорости процесса, определяемой величиной v_0 . Однако в отличие от реакции без ингибитора зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости ввода имеет нелинейный характер.

Принципиальное различие в кинетическом проявлении двух механизмов ингибирования заключается в условиях перехода в критическое состояние. Если в механизме конкурентного ингибирования условие для стационарного состояния точно такое же, как и для процесса в отсутствие ингибитора $V_1 > v_0$ [см. уравнение (2.382)], то для механизма неконкурентного ингибирования условием стационарного состояния является соотношение

$$v_0 < \frac{\alpha K_i}{2} \left(\sqrt{1 + \frac{4v_1}{\alpha K_i}} - 1 \right). \quad (2.383)$$

Если система работает строго в режиме неконкурентного ингибирования первого фермента продуктом (условие $v_0/\alpha K_i \gg 1$), равенство (2.383) можно записать в виде $v_0 < \sqrt{\alpha K_i V_1}$, т.е. возможность образовать стационарное состояние определяется не просто соотношением скоростей ввода субстрата и максимальной скоростью работы первого фермента, а включает в себя также такие параметры, как скорость оттока продукта и константу диссоциации комплекса фермент–продукт реакции.

Интересно сравнить регуляторные характеристики двух механизмов ингибирования продуктом и неингибированной реакции с точки зрения чувствительности системы к относительному изменению скорости ввода первого субстрата. Если под действием внешних факторов в системе произойдет быстрое изменение скорости ввода первого субстрата на величину Δv , это вызовет соответствующее изменение стационарного уровня первого субстрата.

Для механизма конкурентного ингибирования продуктом

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\frac{\Delta v}{v_0} \left[\frac{V_1}{v_0} \left(1 + \frac{v_0}{\alpha K_i} \right) + \frac{V_1 - v_0}{\alpha K_i} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right) \right]}{\left(1 + \frac{v_0}{\alpha K_1} \right) \left[\frac{V_1}{v_0} - \left(1 - \frac{\Delta v}{v_0} \right) \right]}. \quad (2.384)$$

Если эффекты ингибирования в системе относительно малы, $v_0/\alpha K_i \ll 1$, то это уравнение трансформируется в форму, соответствующую уравнению без отрицательной обратной связи. В случае же больших эффектов ингибирования $v_0/\alpha K_i \gg 1$, т.е. высоких скоростей реакции, малых скоростей оттока продукта или высокой эффективности взаимодействия E_1 с ингибитором, уравнение (2.384) принимает вид

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right) = \frac{\frac{\Delta v}{v_0} \left[1 + \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right) \left(1 - \frac{v_0}{V_1} \right) \right]}{\left[1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right) \right]}. \quad (2.385)$$

В этом режиме относительное изменение концентрации субстрата не зависит от величин K_i и α , а определяется лишь одним безразмерным параметром v_0/V_1 . В условиях, далеких от критических, при $V_1 \gg v_0$, и относительно небольших модулирующих изменениях скорости

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0} \left(2 + \frac{\Delta v}{v_0} \right).$$

Для механизма неконкурентного ингибирования продуктом изменение скорости на величину Δv вызовет изменение концентрации субстрата, которое в относительной форме можно записать как

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\frac{\Delta v}{v_0} \left[1 + 2 \left(\frac{v_0}{\alpha K_i} \right)^2 + \frac{v_0}{\alpha K_i} \frac{\Delta v}{v_0} \right]}{\left(1 + \frac{v_0}{\alpha K_1} \right) \left[1 - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right) - \frac{v_0}{V_1} \left(1 + \frac{\Delta v}{v_0} \right)^2 \frac{v_0}{\alpha K_1} \right]}. \quad (2.386)$$

Как и для конкурентного ингибирования при слабой эффективности действия ингибитора на первый фермент ($v_0/\alpha K_i \ll 1$), уравнение (2.386) преобразуется в форму (2.365), соответствующую

щую системе без ингибитора реакции, а при ($v_0/\alpha K_i \gg 1$) уравнение приобретает вид

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\frac{\Delta v}{v_0} \left[\frac{\Delta v}{v_0} + 2 \frac{v_0}{\alpha K_i} \right]}{1 - \frac{v_0}{V_1} \frac{v_0}{\alpha K_i}}, \quad (2.387)$$

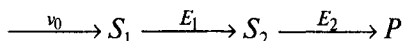
или в режиме сохранения стационарного состояния при $v_0 \ll \sqrt{\alpha K_i V_1}$

$$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0} \left(\frac{\Delta v}{v_0} + 2 \frac{v_0}{\alpha K_i} \right). \quad (2.388)$$

В этом случае, как и при конкурентном ингибировании продуктом, имеет место квадратичная зависимость относительного изменения концентрации субстрата от величины относительного изменения скорости реакции. При этом в отличие от механизма конкурентного ингибирования для неконкурентного влияния продукта на первый фермент относительное изменение концентрации субстрата зависит от величины $v_0/\alpha K_i$. Различие в регуляторных особенностях процессов с ингибированием продуктом иллюстрирует рис. 2.128.

Важно отметить, что механизм обсуждаемой обратной связи не затрагивает стационарные уровни других компонентов реакции, таких, как S_2 и P . Это следует из уравнений (2.378)–(2.380) и условий стационарности системы.

Принципиально другая картина наблюдается, если действие продукта связано с регулированием скорости ввода в систему субстрата S_1 :



Тогда система уравнений, описывающая динамику процессов, будет иметь вид

$$\begin{aligned} \frac{dS_1}{dt} &= \frac{v_0}{1 + P/K_i} - \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1}; \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{V_1 S_1}{K_1 + S_1} - \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2}; \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{V_2 S_2}{K_2 + S_2} - \alpha P. \end{aligned}$$

Из этой системы уравнений в условиях стационарности следует:

$$P_{cm} = \frac{K_i}{2} \left(\sqrt{1 + \frac{4v_0}{\alpha K_i}} - 1 \right). \quad (2.389)$$

Рассмотрим закономерности в поведении системы, если скорость процесса контролируется ингибированием продуктом. Количественным критерием выполнения этого режима является условие $v_0/\alpha K_i \gg 1$.

В этом случае

$$S_{1,cm} = \frac{K_1 \sqrt{\alpha K_i v_0}}{V_1 - \sqrt{\alpha K_i v_0}}; \quad (2.390)$$

$$S_{2,cm} = \frac{K_2 \sqrt{\alpha K_i v_0}}{V_2 - \sqrt{\alpha K_i v_0}}; \quad (2.391)$$

$$P_{cm} = \sqrt{\frac{K_i v_0}{\alpha}}. \quad (2.392)$$

При условии ингибирования продуктом процесса ввода субстрата в систему все компоненты реакции «чувствуют» обратную связь и слабо увеличиваются с ростом скорости реакции. Рассмотрим зависимости относительного изменения концентрации субстратов при модулирующем воздействии скорости v_0 :

$$\left(\frac{\Delta S_{1,2}}{S_{1,2}} \right)_{cm} = \sqrt{1 - \frac{\Delta v}{v_0 - 1}}; \quad (2.393)$$

$$\left(\frac{\Delta P}{P} \right)_{cm} = \sqrt{1 + \frac{\Delta v}{v_0 - 1}}. \quad (2.394)$$

Интересно сравнить различные механизмы с обратной связью по чувствитель-

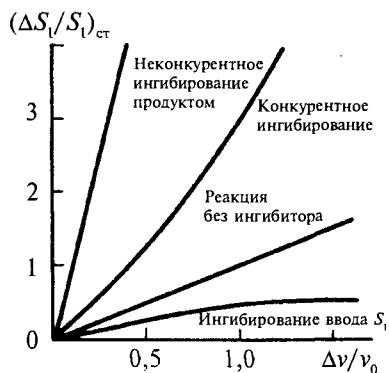


Рис. 2.128. «Чувствительность» стационарного уровня концентрации субстрата к изменению скорости процесса полиферментной реакции для различных механизмов отрицательной обратной связи.

Зависимости относительного прироста концентрации субстрата от относительного изменения скорости процесса рассчитаны по уравнениям, представленным в табл. 2.25, с использованием параметра $v_0/\alpha K_i = 5$.

ности к изменению скорости процесса и предельной устойчивости к относительному изменению скорости. Как указывалось выше, для обсуждаемых механизмов реакции с обратной связью можно найти величину критического относительного изменения скорости процесса. Достижение этой величины переводит систему в режим, при котором невозможно образование стационарного состояния и концентрация промежуточного субстрата становится неопределенно большой. Зависимости относительного изменения уровня субстрата при возрастании стационарной скорости реакции представлены на рис. 2.129 и в табл. 2.24. Наиболее чувствителен к вариации скорости механизм с неконкурентным ингибированием продуктом. Изменение на 10% скорости процесса способно привести к росту на 100% стационарного уровня субстрата.

Наиболее «консервативен» механизм с ингибированием процесса ввода субстрата. Из рис. 2.129 видно, что возрастание на 100% скорости реакции всего лишь на ~40% изменяет стационарную концентрацию субстрата. Принципиально важные различия в поведении систем связаны с величинами критических изменений скорости реакции. Система с ингибированием процесса ввода обладает уникальными характеристиками с точки

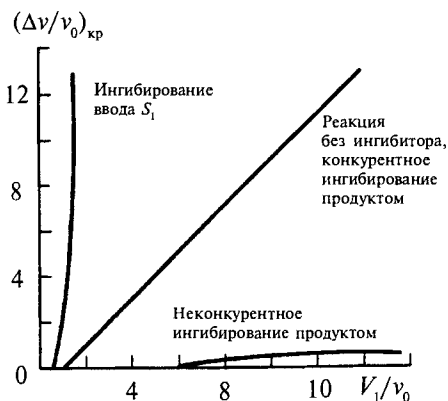


Рис. 2.129. Зависимости критической относительной величины изменения скорости от параметра V_1/v_0 для различных механизмов полиферментной реакции с отрицательной обратной связью.

Расчеты сделаны по уравнениям, представленным в табл. 2.25, с использованием параметра $v_0/\alpha K_i = 5$.

зрения возможных изменений скорости реакции (см. рис. 2.129). При $V_1/v_0 = 10$ и при $v_0/\alpha K_i = 5$ почти в 500 раз может измениться скорость реакции, а система сохранит возможность «удержать» стационарное состояние. В этом же режиме неингибированная реакция или реакция с конкурентным ингибированием продуктом способна сохранить стационарный режим лишь при изменении скорости в 9 раз. Исключительно сильно дестабилизирует систему неконкурентное ингибирование продуктом. Из рис. 2.129 видно, что изменение скорости на 31% пере-

**Регуляторные характеристики полиферментных реакций
с отрицательной обратной связью в режиме контроля процессом
ингибирования ($v_0/\alpha K_i \gg 1$)**

Механизм	Относительное изменение стационарного уровня субстрата	Предельно возможное критическое относительное изменение скорости
1. Реакция без ингибирования	$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0}$	$\left(\frac{\Delta v}{v_0}\right)_{кр} = \frac{V_1}{v_0} - 1$
2. Конкурентное ингибирование продуктом фермента E_1	$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0} \left(2 + \frac{\Delta v}{v_0}\right)$	$\left(\frac{\Delta v}{v_0}\right)_{кр} = \frac{V_1}{v_0} - 1$
3. Неконкурентное ингибирование продуктом фермента E_2	$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \frac{\Delta v}{v_0} \left(\frac{\Delta v}{v_0} + 2 \frac{v_0}{\alpha K_i}\right)$	$\left(\frac{\Delta v}{v_0}\right)_{кр} = \frac{\alpha K_i}{2v_0} \left(\sqrt{1 + \frac{4V_1}{\alpha K_i}} - 1\right)$
4. Ингибирование ввода субстрата	$\left(\frac{\Delta S_1}{S_1}\right)_{cm} = \sqrt{1 + \frac{\Delta v}{v_0}} - 1$	$\left(\frac{\Delta v}{v_0}\right)_{кр} = \left(\frac{V_1}{v_0}\right)^2 \frac{v_0}{\alpha K_i}$

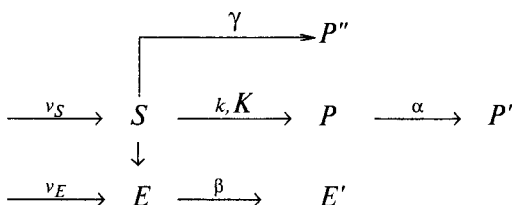
водит систему в критический режим, когда дальнейшее увеличение скорости не может удерживать рост субстрата.

Полученные теоретические результаты полезно использовать при качественном анализе влияния лекарственных препаратов — ингибиторов ферментов, выведенных в полиферментные цепи.

**Кинетические закономерности регуляции фермента
в открытой системе с субстратзависимой инактивацией
в процессе реакции**

Представляет интерес анализ динамических закономерностей в поведении системы в условиях ингибирования фермента с учетом эффекта инактивации фермента в процессе реакции (см. § 2.8). Проанализируем кинетику процесса для системы, открытой и по субстрату, и по ферменту. Для выяснения свойств системы рассмотрим в сравнении два случая: 1) субстратнезависимый отток фермента, характеризуемый линейной зависимостью скорости оттока от концентрации в системе фермента; 2) субстратзависимый отток, для которого константа скорости инактивации фермента гиперболически зависит от концентрации субстрата.

Запишем кинетическую схему процесса



В открытую систему субстрат S поступает со скоростью v_s и трансформируется ферментом E , имеющим кинетические характеристики k (каталитическая константа скорости) и K (константа Михаэлиса). В системе происходит линейный отток продукта (эффективная константа скорости первого порядка α). Эта схема может отражать полиферментную реакцию, где лимитирующая стадия предшествующих процессов характеризуется скоростью v_s . Эту же схему можно применять для описания открытой системы одноферментной реакцией, осуществляемой ферментом E . Система открыта также по ферменту. Скорость ввода фермента в систему задана величиной v_E , вывода фермента из системы — значением β . Величина β для двух обсуждаемых случаев имеет различное толкование: при субстратнезависимом оттоке β — константа, при субстратзависимом оттоке фермента β задана отношением

$$\beta = \frac{\alpha'}{f(S)}, \quad f(S) = \frac{a}{S} + b.$$

Аналогичные условия детально проанализированы при обсуждении субстратной регуляции синтеза простагландинов и свойств консервативно устойчивых ферментативных процессов.

Важным элементом рассматриваемой кинетической схемы является «расщепление» ферментативного процесса на субстрате S . Анализ показывает, что кинетическая схема с участием фермента, инактивирующегося в процессе реакции, должна быть дивергентной. Кинетику процесса в отсутствие параллельного оттока субстрата (при $\gamma = 0$) описывает система уравнений:

$$\frac{dS}{dt} = v_S - \frac{E}{f(S)}; \quad \frac{dE}{dt} = v_E - \frac{\alpha' E}{f(S)}; \quad \frac{dP}{dt} = \frac{E}{f(S)} - \alpha P. \quad (2.395)$$

Из этих уравнений следует, что стационарный режим одновременно по субстрату S и ферменту E (условия $dS/dt = 0$, $dE/dt = 0$) возможен лишь при условии «жесткой» (поэтому в высшей степени маловероятной) связи между параметрами

$$\frac{v_S}{v_E} = \frac{1}{a'}.$$

С учетом параллельного процесса расхода S изменение концентрации субстрата описывает дифференциальное уравнение

$$\frac{dS}{dt} = v_S - \frac{E}{f(S)} - \gamma S.$$

В присутствии ингибитора, обратимо блокирующего фермент E , это уравнение можно записать в виде

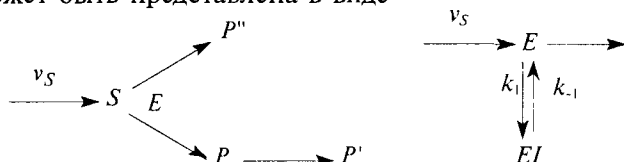
$$\frac{dS}{dt} = v_S - \frac{E}{f(S)} - \gamma S; \quad f(S, I) = \frac{a}{S} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + b.$$

Для упрощения дальнейшего анализа рассмотрим случай, когда концентрация субстрата в системе (для синтеза простагландинов это арахидоновая кислота) может считаться постоянной. Если отток субстрата по параллельному пути существенно превышает скорость обсуждаемой ферментативной реакции, события, развертывающиеся на уровне фермента E , практически не будут сказываться на уровне концентрации S . Действительно, если $\gamma S \gg E/f(S, I)$, то стационарная концентрация субстрата, заданная величиной $S_{cm} = v_S/\gamma$, не «чувствует» изменений, связанных с действием фермента или с модуляцией его активности. В этих условиях концентрация субстрата постоянна и не является функцией времени, концентрации фермента или ингибитора.

Представим, что в систему, находящуюся в стационарном состоянии, быстро был введен обратимый ингибитор. Для случая PGH-синтетазы это может быть бруфен, анальгин или напроксен — быстрые и обратимые ингибиторы фермента. Введение ингибитора должно уменьшить скорость ферментативной реакции, вызвать соответствующий динамический отклик. Анализ показывает, что природа ответа для случая инактивации фермента в процессе реакции и для случая без инактивации будет совершенно отличной.

Системы с субстратнезависимым линейным оттоком фермента

Кинетическая схема взаимодействия активного центра фермента с обратимым ингибитором при линейном оттоке фермента может быть представлена в виде



Здесь EI — комплекс фермента с ингибитором; k_1 , k_{-1} — константы скорости комплексообразования; $K = k_{-1}/k_1$ — константы диссоциации комплекса.

Динамику процесса описывает система уравнений

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= v_S - \frac{E}{f(S, I)} - \gamma S; & \frac{dS}{dt} &= v_E - (k_1 E \times I - k_{-1} EI) - \beta E; \\ \frac{dEI}{dt} &= k_1 E \times I - k_{-1} EI; & \frac{dP}{dt} &= \frac{E}{f(S, I)} - \alpha P.\end{aligned}\quad (2.396)$$

Если комплекс фермент–ингибитор образуется быстро, то в любой момент времени имеет место равновесие на этой стадии реакции ($dEI/dt = 0$). При этом условии уравнение (2.396) может быть решено относительно общей концентрации фермента. Предполагается также, что параллельный отток субстрата существенно превышает скорость ферментативной реакции. Из этих уравнений при $dEI/dt = 0$ следует, что общая концентрация фермента в системе не является функцией концентрации ингибитора и стационарная концентрация фермента задана уравнением

$$E_{cm} = \frac{v_E}{\beta}. \quad (2.397)$$

Интегрирование приводит к функции

$$P(t) = \left[\frac{v_E}{\alpha\beta f(S)} - \frac{v_E}{\alpha\beta f(S, I)} \right] e^{-at} + \frac{v_E}{\alpha\beta f(S, I)}. \quad (2.398)$$

Для анализа этого уравнения воспользуемся методическим приемом, развитым при обсуждении кинетических свойств консервативно устойчивых процессов. Посмотрим, как изменятся во времени относительные безразмерные переменные $\Delta E/E_{ct}$ и $\Delta P/P_{ct}$ при быстром введении в систему обратимого ингибитора (скачок концентрации ингибитора). Из уравнения (2.396) следует, что $\Delta E/E_{cm} = 0$, т.е. введение в систему ингибитора не должно отразиться на общей концентрации активного фермента (с учетом потенциально активного фермента в фермент-ингибитором комплексе).

Относительное изменение концентрации продукта в соответствии с уравнением (2.398) определяется соотношением

$$\frac{\Delta P(t)}{P} = \frac{f(S, I) - f(S)}{f(S, I)} (e^{-at} - 1) \quad (2.399)$$

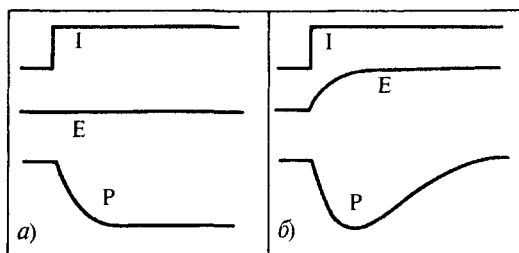


Рис. 2.130. Динамические ответы на введение конкурентного ингибитора для открытой системы с субстрат-независимой (а) и субстрат-зависимой (б) инактивацией фермента.

или

$$\frac{\Delta P(t)}{P(t=0)} = \frac{I/K_i}{(1 + I/K_i) + \frac{v_S}{\gamma K_M}} (e^{-at} - 1); K_M = \frac{a}{b}. \quad (2.400)$$

Относительное изменение концентрации продукта экспоненциально уменьшается во времени и выходит на новый стационарный уровень, определяемый уравнением

$$\frac{\Delta P(t \rightarrow \infty)}{P(t=0)} = - \frac{I/K_i}{(1 + I/K_i) + \frac{v_S}{\gamma K_M}}. \quad (2.401)$$

Важно отметить, что относительное уменьшение концентрации продукта не зависит от каталитической константы действия фермента и скорости его ввода в систему, а определяется лишь концентрацией ингибитора, его эффективностью (величина K_i) и скоростями оттока субстрата и продукта (коэффициенты α и γ). Относительное изменение концентрации продукта падает с ростом скорости ввода в систему субстрата.

На рис. 2.130а схематично представлены динамические ответы для системы с линейным оттоком фермента после скачка концентрации ингибитора.

Системы с субстратзависимым оттоком фермента (субстратиндуцируемая инактивация фермента в процессе реакции)

Система уравнений, описывающая динамику процесса для случая субстратзависимого оттока фермента, имеет вид

$$\frac{dE}{dt} = v_E - \frac{\alpha' E}{f(S, I)}. \quad (2.402)$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{E}{f(S, I)} - \alpha P. \quad (2.403)$$

Поскольку концентрации субстрата и ингибитора после его быстрого ввода в систему — величины постоянные, уравнение (2.402) может быть проинтегрировано относительно общей концентрации фермента. При начальных условиях $t = 0$ $E = E_{cm} - v_E f(S) / \alpha'$:

$$E(t) = \frac{v_E}{\alpha'} [f(S) - f(S, I)] e^{-\frac{\alpha'}{f(S, I)} t} + \frac{v_E}{\alpha'} f(S, I).$$

$$\text{При } t = 0 \quad E(t = 0) = \frac{v_E}{\alpha'} f(S);$$

$$\text{при } t \rightarrow \infty \quad E(t \rightarrow \infty) = \frac{v_E}{\alpha'} f(S, I). \quad (2.404)$$

Относительное изменение общей концентрации фермента представляется функцией

$$\frac{\Delta E(t)}{E} = \left[\frac{f(S, I)}{f(S)} - 1 \right] \left(1 - e^{-\frac{\alpha'}{f(S, I)} t} \right). \quad (2.405)$$

Со временем относительное изменение концентрации фермента выходит на новый стационарный уровень:

$$\frac{\Delta E(t \rightarrow \infty)}{E} = \frac{f(S, I)}{f(S)} - 1. \quad (2.406)$$

Величина $\left\{ \left[f(S, I) / f(S) \right] - 1 \right\} \geq 0$. В силу этого при введении ингибитора общая концентрация фермента растет. Это несколько неожиданное поведение системы с инактивацией фермента отличает ее от системы с линейным оттоком (рис. 2.130а). Объяснение такого эффекта связано с тем, что ингибитор, связываясь с активным центром фермента, предотвращает его взаимодействие с субстратом и тем самым его инактивацию в процессе реакции.

Интегрирование уравнения (2.403) с учетом зависимости от времени концентрации фермента при начальном условии

$$P(t=0) = P = \frac{v_E}{\alpha' a}$$

приводит к уравнению

$$P(t) = \frac{v_E}{\alpha' a} + \frac{v_E}{\alpha'} \frac{\left(\frac{f(S)}{f(S, I)} - 1 \right)}{\frac{\alpha'}{f(S, I)} - \alpha} \left(e^{-\alpha t} - e^{-\frac{\alpha'}{f(S, I)} t} \right). \quad (2.407)$$

Принципиально важное свойство системы заключается в том, что со временем концентрация продукта выходит на тот же стационарный уровень, несмотря на присутствие в системе постоянной концентрации ингибитора:

$$P(t \rightarrow \infty) = \frac{v_E}{a' \alpha}.$$

Относительное изменение концентрации продукта будет иметь вид

$$\frac{\Delta P(t)}{P_{cm}} = \frac{\left(\frac{f(S)}{f(S, I)} - 1 \right)}{\frac{\alpha'}{f(S, I)} - \alpha} \left(e^{-\alpha t} - e^{-\frac{\alpha'}{f(S, I)} t} \right). \quad (2.408)$$

При $t \rightarrow \infty$ относительное изменение концентрации продукта равно нулю.

Можно показать, что величина $\Delta P(t)/P_{cm}$ всегда отрицательна. На рис. 2.130б схематично приведено изменение уровней общей относительной концентрации фермента и продукта после скачка концентрации ингибитора для открытой системы с инактивацией фермента в процессе реакции. Видны принципиальные отличия обсуждаемой системы от системы с линейным оттоком фермента.

Введение ингибитора в систему вызывает временное уменьшение концентрации продукта, т.е. появление «антипики» продукта. Однако система способна справиться с появлением неблагоприятного агента, и конечным результатом изменений будет выход концентрации продукта на заданный уровень. Этот уровень определяется лишь скоростью ввода в систему фермента, параметром его инактивации и скоростью оттока продукта.

Рассмотренные выше закономерности ингибирования были получены при постоянстве концентрации субстрата, которое

обеспечивалось за счет мощного параллельного пути его использования. Если это условие выполняется не строго и скорости параллельных процессов соизмеримы, ингибирование фермента E должно приводить к существенному временному росту концентрации субстрата. В этих условиях система уравнений (2.395) нелинейна, разделение переменных не представляется возможным и может быть получено лишь ее численное решение. В рамках изложенного выше приближения справедлив важный вывод о том, что концентрация субстрата через какое-то время релаксирует на исходный стационарный уровень. Из уравнений (2.395) следует, что в стационарном состоянии в присутствии ингибитора концентрации фермента и субстрата соответственно равны

$$E_{cm} = \frac{v_E}{a'} \left[\frac{\alpha\gamma}{v_E - \frac{v_E}{a'}} (1 + IK_i) + b \right]; \quad S_{cm} = \frac{1}{\gamma} \left(v_E - \frac{v_E}{a'} \right). \quad (2.409)$$

При этом стационарный уровень субстрата не зависит от концентрации ингибиторов.

Обсуждаемая модель дает представление о процессах, происходящих на ферментативном уровне под действием нестероидных противовоспалительных препаратов — быстрых обратимых ингибиторов PGH-синтазы. Введение лекарственного препарата вызывает две кинетические волны метаболитов. Быстро растет и достигает максимальной концентрации арахидоновая кислота (или другие ненасыщенные кислоты — предшественники простагландинов). Избыточная «надстационарная» арахидоновая кислота может быть источником новых кинетических процессов, таких, как синтез других физиологически активных производных, например по липоксигеназному пути. В надстационарном режиме должны быть интенсифицированы процессы межклеточного обмена арахидоновой кислотой (например, арахидоновая кислота из тромбоцитов может переходить в плазму или в эндотелиальные клетки).

Однако со временем в связи с ростом общей концентрации фермента система возвращается в исходное стационарное состояние по арахидоновой кислоте. Тогда же возникает «антипик» по концентрациям простагландинов, и какой-то период времени система существенно обеднена простагландинами. Однако постепенно даже в условиях постоянной концентрации ингибитора уровень простагландинов, а также арахидоновой кислоты возвращается к исходному стационарному значению. Таким обра-

зом, обсуждаемая система характеризуется весьма специфическими авторегуляторными особенностями.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение открытым системам. 2. Напишите основные уравнения, описывающие кинетику реакции в системе, открытой по субстрату. 3. Дайте описание колоночного реактора с идеальным вытеснением в стационарном режиме. 4. Дайте описание реактора с идеальным перемешиванием: при импульсном и при непрерывном введении субстрата. 5. Дайте сравнение эффективности идеальных реакторов с вытеснением и перемешиванием. 6. Напишите уравнения, связывающие относительные изменения скорости и концентраций субстрата и продукта для открытой по субстрату полиферментной реакции. Как изменяются эти функции в случае введения конкурентного и неконкурентного ингибитора первого фермента цепи? 7. Напишите кинетическую схему и уравнения, описывающие ингибирование продуктом для биферментной системы с обратной связью. 8. Дайте описание кинетических закономерностей регуляции фермента в открытой системе с субстрат-индуцируемой инактивацией фермента в процессе реакции.

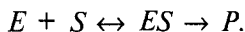
2.11. Краткое содержание главы

Короче, чем я, сказать невозможно: я никогда ничего не говорю.

П. Лут

Кинетика ферментативного катализа — наиболее развитый раздел биокинетики. Фактически ферментативный катализ является основой всей биологической кинетики. Молекулярная рецепция, фармакинетика, клеточный рост используют уравнения и методы, развитые в кинетике ферментативных реакций.

Были рассмотрены основы ферментативной кинетики, основанные на схеме Михаэлиса:



В § 2.1 было показано, что схема Михаэлиса — не единственная схема, позволяющая описывать характерную зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (см. рис. 2.2*a*). Однако схема Михаэлиса является простейшей кинетической схемой, объясняющей выход на плато скорости ферментативной реакции при увеличении концентрации субстрата.

В § 2.2 были рассмотрены и другие зависимости скорости

ферментативной реакции от концентрации субстрата: ингибирование избытком субстрата (рис. 2.2б) и аллостерическое связывание (рис. 2.2в). Были продемонстрированы две модели возникновения аллостерических эффектов: простейшая (Хилла), не объясняющая всех экспериментально наблюдаемых фактов, и более сложная модель Моно—Уаймена—Шанжэ. Рассмотрен биологический смысл аллостерических эффектов.

Простейшие ферментативные реакции, рассмотренные в § 2.1 и 2.2, являются односубстратными. Однако многие ферментативные реакции для получения конечного продукта требуют нескольких субстратов. В связи с этим в § 2.3 даны основы кинетики многосубстратных реакций. Показано, что существуют два основных механизма многосубстратных реакций: механизм образования тройного комплекса и пинг-понг-механизм, отличающихся наличием или отсутствием необратимой стадии между этапами «включения» субстрата в реакции. Рассмотрены методы дискриминации этих механизмов.

Все перечисленные в § 2.1—2.3 механизмы ферментативных реакций основаны не только на теоретических уравнениях, но и на экспериментальном изучении этих реакций. Поэтому § 2.4—2.5 посвящены специфическим методам изучения ферментативных реакций. Специфика данных методов заключается в потенциальной возможности определения числа промежуточных соединений в механизме ферментативного катализа. В § 2.4 приведены нестационарные методы ферментной кинетики. Показано, что методы нестационарной кинетики позволяют определить число промежуточных соединений в ферменте катализе. В данном параграфе также описаны методы определения кинетических параметров ферментативных реакций с помощью нестационарной кинетики. В § 2.5 освещены методы релаксационной кинетики, имеющие большое значение в изучении, в частности, механизмов химических реакций. Релаксационные методы основаны на изучении закономерностей протекания ферментативных реакций после быстрого выведения этих реакций из состояния равновесия.

Более детальное изучение механизма ферментативных реакций требует их изменения. Поэтому § 2.6 посвящен изучению влияния различных факторов на скорость ферментативной реакции. Рассмотрены закономерности влияния температуры и pH. Показано, какие параметры ферментативной реакции можно определить, изменяя внешние условия.

Регуляция активности ферментов — принципиально важный фактор, проявляющийся в поведении биологических систем. Так,

многие лекарственные препараты представляют собой ингибиторы ферментов.

Закономерностям угнетения ферментативной активности посвящены два следующих параграфа. В § 2.7 анализируются процессы ингибирования ферментативных реакций. Приводится классификация ингибиторов по механизму действия. Инактивация ферментов — процесс, дающий богатую информацию о каталитических свойствах белков. Рассмотрены закономерности влияния ингибиторов на многосубстратные реакции. § 2.8 посвящен процессам инактивации ферментов. Рассмотрены кинетические закономерности инактивации. Анализируются как и классические закономерности инактивации ферментов, так особенности инактивации олигомерных ферментов; инактивация ферментов, индуцированная взаимодействием с субстратом.

Особенности функционирования полиферментных систем описаны в § 2.9, а открытые ферментные системы — в § 2.10.

Список основной литературы

1. *Березин И.В., Клесов А.А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
2. *Березин И.В., Варфоломеев С.Д.* Биокинетика. М., 1979.
3. *Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В.* Кинетические методы в химических исследованиях. М., 1982.

Дополнительная литература

4. *Варфоломеев С.Д.* Кинетические закономерности реакций в полиферментных системах. М., 1976
5. *Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Мевх А.Т.* Биоорганическая химия, ВИНТИ, 1986. Т. 9.
6. *Волькенштейн М.В.* Физика ферментов. М., 1976.

Глава 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕЦЕПЦИЯ

Черная Королева покачала головой:
— Вы, конечно, можете называть это чушью, но я-то встречала чушь такую, что в сравнении с ней эта кажется толковым словарем.

Л. Керролл

3.1. Основные понятия

Пока математический закон отражает реальную действительность, он не точен; как только математический закон точен, он не отражает реальную действительность.

А. Эйнштейн

История развития представлений о механизмах действия лекарственных веществ

Чего не лечат лекарства, излечивает железо; чего не врачует железо, исцеляет огонь; чего не исцеляет огонь, следует считать неизлечимым.

Гиппократ

С давних времен было замечено, что живые организмы по-разному реагируют на различные вводимые в них вещества. Так, малина (действующее вещество — ацетилсалициловая кислота) снимает жар; опий и гашиш обладают галлюциногенным эффектом; мышьяк, цианиды, таллий вызывают смерть, отличающуюся симптоматикой и временем наступления после приема яда, и т.д.

Долгое время ученые не могли объяснить столь разнообразные реакции организма на вводимые вещества, а в науке господствовали воззрения, что внутри живых организмов нет специфических «органов чувств», способных распознать то или иное соединение. И только в середине XIX в. И.Ф. Ционем и К. Людвигом был установлен факт, противоречащий этим воззрениям: ими было открыто, что при раздражении дуги аорты в ней повышается кровяное давление.

В конце XIX в. было достоверно показано существование клеточных механизмов специфического узнавания химических соединений. Это от-

крытие принадлежит Дж. Лэнгли. В 1878 г. он изучал действие атропина и пилокарпина на секрецию слюнных желез, а никотина и кураре на сокращение поперечно-полосатых мышц. Лэнгли в своей работе использовал метод аппликации для изучения механизма действия этих соединений. При этом вещества наносились на очень маленькие участки поверхности. Дж. Лэнгли было показано, что атропин ослаблял секрецию слюнных желез, а пилокарпин усиливал ее лишь при аппликации этих веществ на одни и те же строго определенные ограниченные участки поверхности. Аналогичный антагонизм наблюдался между никотином и кураре. Исходя из собственных опытов Лэнгли предположил существование на клетках особых субстанций, которые способны специфически распознавать химические соединения.

Однако лишь в начале XX в. П. Эрлихом и И.И. Мечниковым была сформулирована теория *боковых цепей* (Нобелевская премия, 1908 г.). Согласно этой теории на клеточной поверхности имеются особые химические соединения, которые образуют «боковые цепи». Химические соединения способны взаимодействовать с этими боковыми цепями. В результате этого взаимодействия происходит клеточное распознавание веществ и формирование клеточного ответа.

П. Эрлих назвал эти боковые цепи рецепторами (от лат. *recipere* — получать, узнавать). Он сформулировал основной постулат рецепторного механизма действия химических соединений: «вещество не действует, если не фиксировано» (*«sine materia non agitur nisi fixata»*).

Вскоре теория Эрлиха получила мировое признание. Однако всю первую половину XX в. изучение рецепторов базировалось лишь на косвенных, фармакологических данных. При этом в эксперименте изучали зависимость величины клеточного ответа от концентрации введенного вещества.

Первое количественное описание величины фармакологического ответа клетки в зависимости от концентрации добавленного химического соединения было предпринято А. Кларком в 1926 г. Он заметил, что практически все

известные в то время зависимости (биологический ответ клетки — количество добавленного вещества) напоминают зависимости (максимальная скорость реакции — количество добавленного субстрата) из ферментативной кинетики (рис. 3.1) (сравните с рис. 2.1).

Аналогично тому, как это сделано в ферментативной кинетике, Кларк предположил, что химические вещества находятся в избытке по отношению к рецепторам. Кроме того, он предположил, что взаимодействие химических веществ с рецепторами обратимо.

В настоящее время химические вещества, способные взаимодействовать с рецепторами, принято называть

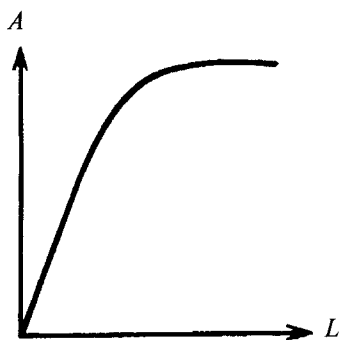
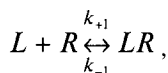


Рис. 3.1. Типичная зависимость величины биологического ответа клетки (A) от концентрации добавленного лиганда (L).

лигандами (от лат. *ligo* — связываю). Тогда взаимодействие лигандов с рецепторами, согласно Кларку, записывается так:



где L — лиганд; R — рецептор; LR — комплекс лиганда с рецептором, или лиганд-рецепторный комплекс; k_{+1} и k_{-1} — константы скоростей образования и распада лиганд-рецепторных комплексов.

Закон действующих масс для этой системы записывается следующим образом:

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[L_0][R] - k_{-1}[LR].$$

Решение подобного уравнения (уравнение Михаэлиса-Ментен) нами было уже получено в гл. 2 (во времена Кларка решение уравнения Михаэлиса-Ментен было уже известно). В условиях избытка концентрации лиганда по отношению к концентрации рецепторов решение этого уравнения записывается следующим образом:

$$[LR] = \frac{[L_0][R_0]}{[L_0] + Kd} (1 - \exp[-(k_{+1}[L_0] + k_{-1})t]), \quad (3.1)$$

где R_0 — начальная концентрация рецепторов; Kd — [равновесная] константа диссоциации лиганд-рецепторных комплексов ($Kd = k_{-1}/k_{+1}$).

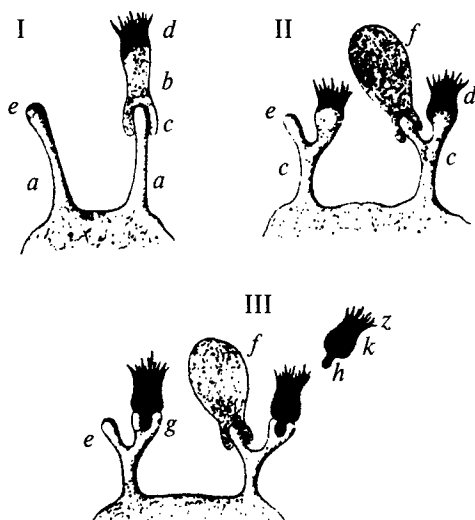
Кларк предположил, что клеточный ответ прямо пропорционален концентрации лиганд-рецепторных комплексов. Тогда, как это было показано в кинетике фермент-субстратного взаимодействия (гл. 2), зависимость биологического ответа клетки от концентрации добавленного лиганда будет аналогичной представленной на рис. 3.1.

Заметим, что в 1918 г. И. Ленгмюр (Нобелевская премия, 1932 г.), изучая сорбцию газов, получил уравнение, аналогичное (3.1). Поэтому достаточно часто данное уравнение называют *уравнением сорбции или уравнением (изотермой) Ленгмюра*.

Однако по мере накопления экспериментального материала было показано, что далеко не все зависимости клеточного ответа от концентрации добавленного лиганда удовлетворительно описываются изотермой Ленгмюра. Многочисленные исследования в этой области привели к формированию представлений о механизмах внутриклеточного проведения и усиления рецепторного сигнала (см. § 3.2). В связи с этим в настоящее время теория Кларка имеет скорее исторический интерес с точки зрения описания механизмов формирования клеточного ответа. Однако она не потеряла актуальности для описания собственно процесса взаимодействия лигандов с рецепторами, что связано с предложенным в 1960-е гг. радиорецепторным методом, сыгравшим существенную роль в развитии представлений о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия.

Радиорецепторный метод (см. § 3.6) был впервые предложен в 1960 г. Р. Ялоу и С. Берсоном и вскоре в различных модификациях стал использо-

Теория боковых цепей (рис. П. Эрлиха)



I. Рецептор первого типа: *a* — чувствительный комплекс; *b* — адсорбированная молекула токсина с *c* чувствительной группой; *d* — токсическая группа.

II. Рецептор второго типа с *e* — чувствительным комплексом; *d* — активный центр ферментной группы; *f* — адсорбированная эндогенная молекула.

III. Рецептор третьего типа: *e* — чувствительный комплекс; *g* — комплекс, воспринимающий комплементарные молекулы; *k* — комплементарная молекула с *h* — чувствительной группой; *z* — ферментотоксическая группа; *f* — адсорбированная эндогенная молекула.

Рисунок приводится по книге [B. Holmstardt, G. Liljstrand (eds.) *Readings in pharmacology*. Oxford, L., N.Y., Paris, 1963].

ваться для изучения свойств рецепторов. Радиорецепторный метод основан на определении количества связанного с рецепторами радиоактивного лиганда по числу радиоактивных распадов. Практически все экспериментальные данные радиорецепторных исследований, известные в настоящее время, удовлетворительно описываются при помощи уравнения (3.1) или при помощи усложненных модификаций этого уравнения.

Современные представления о механизме лиганд-рецепторного взаимодействия

Крупнейшие научные открытия — результат наблюдения за мельчайшими фактами.

А. Жид

Согласно современным представлениям большинство биологически активных веществ и лекарств оказывают воздействие на

организм, регулируя функции клеток. При этом многие вещества не проникают в клетку, а оказывают свое действие опосредовано, взаимодействуя на клеточной мембране со специфическими молекулами, называемыми *рецепторами*. Рецепторы способны специфически распознать биологически активное вещество или лекарство, обратимо или необратимо взаимодействовать с ним и передавать специфический сигнал об этом взаимодействии в клетку.

Следует заметить, что общепринятого определения рецептора нет. Будем понимать под *рецепторами* макромолекулы, расположенные на цитоплазматической мембране клетки или внутриклеточно, способные специфически взаимодействовать с ограниченным набором лекарственных средств и биологически активных веществ и трансформировать сигнал об этом взаимодействии в специфический клеточный ответ.

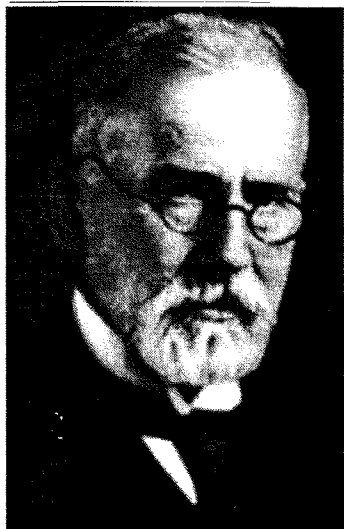
Таким образом, с нашей точки зрения, самыми важными характеристиками рецепторов являются:

1. *Локализация*. Рецепторы расположены на цитоплазматической мембране (чаще всего это интегральные белки) или внутриклеточно.

2. *Специфичность взаимодействия* с рецепторами биологически активных веществ и лекарств. Только ограниченное число биологически активных веществ и лекарств может быть специфически распознано рецепторами и взаимодействовать с ними.

3. *Трансдукция сигнала*. Вследствие взаимодействия биологически активных веществ или лекарств с рецепторами изменяется биологическая активность клетки, т.е. развивается клеточный ответ. При этом для каждого типа рецепторов характерен свой специфический клеточный ответ.

Следует заметить, что некоторые лекарственные вещества и биологически активные соединения могут взаимодействовать с различными типами рецепторов, вызывая аналогичный клеточный ответ. Однако механизмы их действия различны.



Эрлих П.
(1854–1915)

Гепатолог, иммунолог, химиотерапевт. В 1899–1906 гг. разработал теорию боковых цепей (Нобелевская премия 1908 г. вместе с И. Мечниковым).

Так, анаприлин и коринфар (нефедипин) оказывают фармакологический эффект, заключающийся в расслаблении гладкой мускулатуры. При этом механизм действия данных веществ различен. Анаприлин является неселективным β -адреноблокатом. Он связывается с β -адренорецепторами; вследствие этого ни адреналин, ни норадреналин не могут взаимодействовать с этими рецепторами. Между тем сокращение гладкой мускулатуры стимулируется через β -адренорецепторы. Поэтому в присутствии анаприлина гладкомышечные клетки расслабляются. Коринфар имеет нерепепторный механизм действия. Он действует на уровне медленных кальциевых каналов, что приводит к уменьшению прохождения кальция в клетку. Количество кальция в клетке снижается. Поэтому количество активных нитей, способных взаимодействовать с миофиламентом, уменьшается и, как следствие, мышечное сокращение ослабляется.

Химическое строение рецепторов и лигандов

По химическому строению все известные рецепторы являются белками. Их молекулярная масса составляет сотни килодальтон. Рецепторы различных типов могут кодироваться различными генами или одним геном и отличаться за счет интронных участков или третичной структуры. Большинство рецепторов является трансмембранными белками. Основное исключение составляют рецепторы к глюкокортикоидам, расположенные непосредственно в цитоплазме клетки.

Практически все рецепторы образуют четвертичную структуру с углеводами, гликопротеидами, а также с фосфолипидами мембран. В процессе функционирования рецептора его третичная и четвертичная структуры могут изменяться (может изменяться конформация рецептора, структура и состав молекул, связанных с рецепторами, сами рецепторные молекулы могут подвергаться процессам фосфорилирования и дефосфорилирования и т.д.). В зависимости от изменения структуры рецептора изменяется его сродство к лекарственным и биологически активным веществам.

Биологически активные вещества и лекарственные средства, способные взаимодействовать со специфическими рецепторами, называются *лигандами*. В отличие от рецепторов, которые всегда имеют белковую природу, лиганды различаются по их химическому строению. Чаще всего встречаются белковые, пептидные лиганды, лиганды-производные холестерина (глюкокортикоиды и их аналоги) и другие органические соединения.

Молекулярная масса лигандов подвержена значительным вариациям. Простейшие пептидные лиганды могут состоять из нескольких (четырёх-пяти) аминокислот с молекулярным весом порядка нескольких килодальтон. Некоторые лекарственные со-

единения имеют вес в несколько сотен дальтон. А самые большие, белковые, лиганды могут иметь молекулярную массу десятки и даже сотни килодальтон.

Агонисты и антагонисты

В фармакологии все лиганды принято делить на агонисты и антагонисты.

1. *Агонистами* называются лиганды, которые, связываясь с рецепторами данного типа, активно вызывают биологический ответ клетки. Агонисты стимулируют клеточные функции.

2. *Антагонистами* называются лиганды, которые связываются с рецепторами и не вызывают активного клеточного ответа. Антагонисты препятствуют связыванию агонистов с рецепторами, *угнетая* клеточные функции.

Однако с точки зрения биокинетики формально-математическое описание взаимодействия агонистов и антагонистов с рецепторами во многом идентично. Поэтому в дальнейшем будем описывать лиганд-рецепторное взаимодействие, не оговаривая, является ли лиганд агонистом или антагонистом рецепторов данного типа.

Детально различные модели антагонизма рассмотрены в § 3.4.

Принцип структурной комплиментарности

Любой вид рецепторов связывает ограниченное число различных лигандов. Точно так же любой лиганд данного типа связывается с ограниченным числом видов рецепторов. Чем с меньшим числом различных лигандов может связываться рецептор данного типа, тем выше его специфичность. Точно так же лиганд определенного вида тем более специфичен, чем с меньшим числом различных рецепторов он может связываться. Данный принцип получил название *принципа структурной комплиментарности*.

Принцип структурной комплиментарности можно сравнить с принципом ключ-замок. К выпускаемому на заводе замку (рецептору) прилагается ограниченный набор ключей (лигандов). Замок тем лучше, чем меньшее количество «посторонних» ключей к нему подходит. С другой стороны, ко многим замкам ключи можно продублировать в мастерской. Продублированные ключи (синтетические аналоги эндогенных лигандов) могут подойти к данному замку, могут не подойти или открывать его через раз. Опытному взломщику ключи не нужны: у него всегда в запасе есть набор отмычек (синтетических лекарственных средств), подходящих для данного типа замков. Однако хорошие современные замки отмычкой не откроешь, единственный вы-

ход — взрывать дверь (так действуют пермиализаторы — вещества, нарушающие целостность клеточной мембраны).

Именно благодаря структурной комплиментарности различные лиганды, действуя на разные клетки, вызывают биологические эффекты через рецепторы разных типов.

Исторически сложилось так, что механизм действия лигандов изучали по изменению клеточного ответа. Поэтому большинство рецепторов получили название по их лиганду. Это ацетилхолиновые, дофаминовые, гистаминовые и другие рецепторы. Дальнейшие исследования показали, что эти рецепторы гетерогенны. Гомогенные группы рецепторов одного типа обычно обозначают греческими буквами, например α -адренорецепторы, β -адренорецепторы. Подгруппы в этих группах обозначают цифрами: α_1 , α_2 — адренорецепторы.

Механизм лиганд-рецепторного взаимодействия

Высокая степень сродства рецепторов к лигандам обеспечивается за счет существования на рецепторах центров связывания лигандов. Наиболее часто эти центры связывания образованы: COOH -группами дикарбоновых кислот, NH_2 -группами диаминовых кислот, OH -группами гидроксиаминокислот, SH -группами цистеина, имидазольным ядром гистидина, индольной группой триптофана, гидрофобными участками различных аминокислот, т.е. по сути связывающие центры рецепторов образуются за счет тех же аминокислот, что и связывающие центры ферментов.

Точно так же, как и при образовании комплекса «фермент-субстрат», в образовании лиганд-рецепторных комплексов участвует несколько активных участков связывающего центра. Однако следует запомнить, что, несмотря на всю схожесть процессов фермент-субстратного и лиганд-рецепторного взаимодействия, рецепторы отличаются большей степенью сродства к лигандам, чем ферменты к субстратам.

С точки зрения современных представлений о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия данное взаимодействие описывается аналогично предположению Кларка:



где L — лиганд; R — рецептор; LR — комплекс лиганда с рецептором, или лиганд-рецепторный комплекс; k_{+1} и k_{-1} — константы скоростей образования и распада лиганд-рецепторных комплексов.

Запишем закон действующих масс для каждого из веществ, принимающих участие в реакции (3.2):

$$\begin{cases} \frac{d[R]}{dt} = -k_{+1}[R][L] + k_{-1}[LR] \\ \frac{d[L]}{dt} = -k_{+1}[R][L] + k_{-1}[LR] \\ \frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[R][L] - k_{-1}[LR] \end{cases} \quad (3.3)$$

Таким образом, лиганд-рецепторное взаимодействие описывается системой из трех нелинейных дифференциальных уравнений. Точное решение данной системы уравнений будет получено позднее, в § 3.3; в этом параграфе решим систему уравнений (3.3), предположив существование избытка начальной концентрации лиганда по отношению к начальной концентрации рецепторов ($[L] = [L_0]$). Напомним, что данное предположение было впервые использовано Кларком в 1926 г.

Предположение о наличии избытка начальной концентрации лиганда по отношению к начальной концентрации рецепторов оправдано для ряда процессов, происходящих *in vivo*, а также для исследований, проводимых *in vitro*. Однако появление в последние годы радиолигандов с высокой удельной активностью позволяет в ряде случаев проводить радиорецепторные исследования при соизмеримых концентрациях лиганда и рецептора. При этом наблюдаются реальные изменения концентрации лиганда в микроокружении рецепторов.

Если начальная концентрация рецепторов (R_0) много меньше начальной концентрации лиганда, то в процессе лиганд-рецепторного взаимодействия концентрация лиганда практически не меняется. Следовательно, концентрацию лиганда можно считать за константу. В этом случае система дифференциальных уравнений (3.3) становится линейной.

Чтобы решить систему (3.3), запишем закон сохранения вещества для рецепторов: сумма концентраций свободных рецепторов и лиганд-рецепторных комплексов равна начальной концентрации рецепторов ($[R] + [RL] = [R_0]$). Тогда (3.3) переписывается следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{d[LR]}{dt} &= k_{+1}([R_0] - [LR])[L_0] - k_{-1}[LR]; \\ \frac{d[LR]}{dt} &= k_{+1}[R_0][L_0] - (k_{+1}[L_0] + k_{-1})[LR]. \end{aligned}$$

Последнее уравнение является линейным неоднородным дифференциальным уравнением. Существует два основных метода решения данного типа уравнений: варьирования (вариации) постоянной и с помощью преобразований Лапласа. Рассмотрим метод варьирования постоянной (метод преобразований Лапласа рассмотрен в гл. 6). Для того чтобы решить неоднородное линейное дифференциальное уравнение методом варьирования постоянной, решим вначале линейное однородное уравнение

$$\frac{d[LR]}{dt} = -[LR](k_{+1}[L_0] + k_{-1}) .$$

Оно решается следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{d[LR]}{[LR](k_{+1}[L_0] + k_{-1})} &= -dt ; \\ [LR] &= C \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] . \end{aligned}$$

Величина C рассматривается как новая переменная (если бы исходное дифференциальное уравнение было однородным, то величина C была бы постоянной). Поэтому данный метод и получил название метода варьирования постоянной). Подставим полученное решение однородного линейного дифференциального уравнения в неоднородное. Тогда

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] - C \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] &= \\ = k_{+1}[L_0][R_0] - C \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] ; \end{aligned}$$

$$\frac{dC}{dt} \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] = k_{+1}[L_0][R_0] ,$$

$$dC = k_{+1}[L_0][R_0] \exp[t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] dt ,$$

$$C = \frac{k_{+1}[L_0][R_0]}{k_{+1}[L_0] + k_{-1}} \exp[t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})] + B ,$$

где B — некоторая постоянная.

Известно, что в начальный момент времени наблюдения за реакцией концентрация лиганд-рецепторных комплексов равна нулю. Исходя из этого условия определяем B . Тогда окончательно

$$[LR] = \frac{k_{+1}[L_0][R_0]}{k_{+1}[L_0] + k_{-1}} (1 - \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})]) .$$

По аналогии с кинетикой фермент-субстратного взаимодействия числитель и знаменатель в дроби полученного решения делят на величину k_{+1} .

Концентрация лиганд-рецепторных комплексов зависит от концентрации добавленного лиганда следующим образом:

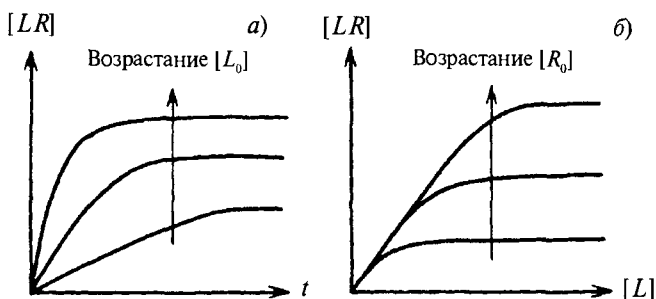


Рис. 3.2. Вид зависимости (3.3').

a — кинетика комплексообразования при различных значениях R_0 ; *б* — зависимость равновесной концентрации лиганд-рецепторных комплексов от концентрации лиганда при $t \rightarrow \infty$.

$$[LR] = \frac{[L_0][R_0]}{[L_0] + Kd} (1 - \exp[-t(k_{+1}[L_0] + k_{-1})]), \quad (3.3')$$

где Kd — [равновесная] константа диссоциации лиганд-рецепторных комплексов ($Kd = k_{-1}/k_{+1}$).

Графически зависимость (3.3') изображена на рис. 3.2.

Определение кинетических параметров связывания лигандов с рецепторами

Уравнение (3.3') можно также переписать в следующем виде:

$$RL = A (1 - \exp [-kt]),$$

где A — предэкспоненциальный множитель; k — показатель экспоненты;

$$A = \frac{R_0 L_0}{L_0 + Kd}, \quad k = k_{+1} L_0 + k_{-1}.$$

В соответствии с рис. 3.3*a* в полулогарифмических координатах ($\ln[1 - \frac{RL}{A}], t$) определим k при двух различных концентрациях лиганда:

$$\begin{cases} k(L_1) = k_{+1} L_1 + k_{-1} \\ k(L_2) = k_{+1} L_2 + k_{-1} \end{cases}$$

Тем самым нами была получена система линейных алгебраических уравнений. Решим данную систему с помощью метода Крамера:

$$\Delta = \begin{pmatrix} L_1 & 1 \\ L_2 & 1 \end{pmatrix} = L_1 - L_2 ;$$

$$\Delta_1 = \begin{pmatrix} k(L_1) & 1 \\ k(L_2) & 1 \end{pmatrix} = k(L_1) - k(L_2) ;$$

$$\Delta_2 = \begin{pmatrix} L_1 & k(L_1) \\ L_2 & k(L_2) \end{pmatrix} = L_1 k(L_2) - L_2 k(L_1) .$$

Тогда

$$\begin{aligned} k_{+1} &= \frac{\Delta_1}{\Delta} = \frac{k(L_1) - k(L_2)}{L_1 - L_2} ; \\ k_{-1} &= \frac{\Delta_2}{\Delta} = \frac{L_2 k(L_1) - L_1 k(L_2)}{L_1 - L_2} . \end{aligned} \quad (3.4)$$

Если k определено при более чем двух различных концентрациях добавленного лиганда, то константы скоростей ассоциации и диссоциации определяются регрессионными методами, что повышает точность определения данных констант. Графический вариант определения кинетических констант приводится на рис. 3.3б).

Размерность константы скорости ассоциации: $1/(\text{концентрация} \cdot \text{время})$. Например, $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, $\text{нМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. Было проведено статистическое исследование многочисленных экспериментальных данных о величине k_{+1} [2]. Показано, что наиболее часто встречаются константы скорости ассоциации от 10^5 до $10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ (рис. 3.4).

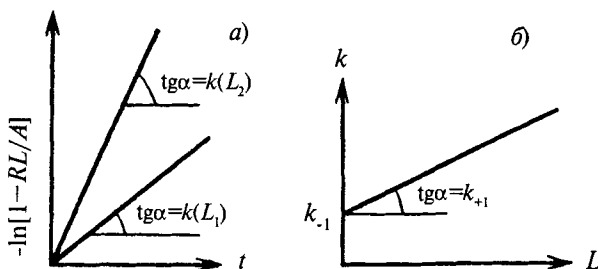


Рис. 3.3. Графический метод определения кинетических констант взаимодействия лиганда с рецептором.

a — определение показателя экспоненты, *б* — определение констант скорости ассоциации и диссоциации.

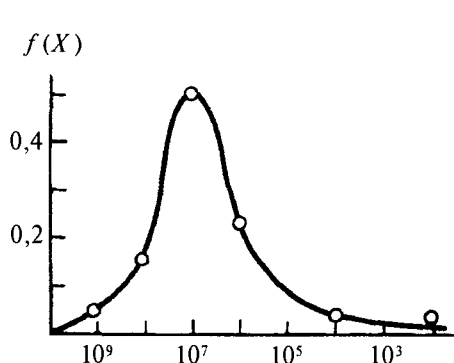


Рис. 3.4. Плотность распределения констант скоростей ассоциации лиганд-рецепторных комплексов (размерность $M^{-1} \cdot c^{-1}$)

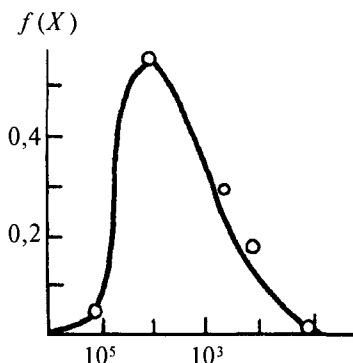


Рис. 3.5. Плотность распределения констант скорости диссоциации (размерность c^{-1})

Размерность константы скорости диссоциации: 1/время. Например, $мин^{-1}$, c^{-1} . Был проведен статистический анализ многочисленных литературных данных по определению наиболее часто встречающихся величин константы ассоциации [2]. Чаще всего величина k_{-1} встречается в пределах от 10^2 до $10^4 c^{-1}$ (рис. 3.5).

Пример 3.1 [22]. Определить константу скорости ассоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка на основании данных, представленных в табл. 3.1.

Таблица 3.1

**Исследование ассоциации фактора роста нервов
с мембранами головного мозга быка**

<i>A</i>	<i>Б</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>Б</i>	<i>B</i>
1	1,67	3,59	30	16,9	21,5
2	3,18	6,58	60	17,7	21,6
5	6,92	12,9	90	17,9	21,6
10	11,2	18,1	120	17,9	21,6
20	15,3	21,0	240	17,9	21,6

Примечание. Концентрация добавленного фактора роста нервов 4 нМ (*Б*), 10 нМ (*B*). В таблице приведена концентрация связанного с рецепторами фактора роста нервов ($M \cdot 10^{-11}$) в зависимости от времени лиганд-рецепторного взаимодействия, мин (*A*).

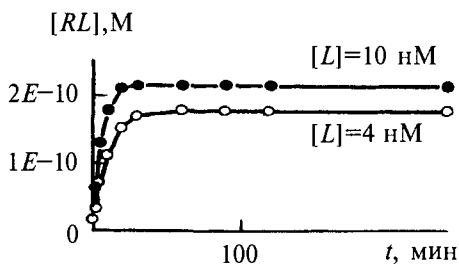


Рис. 3.6. Кинетика ассоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка.

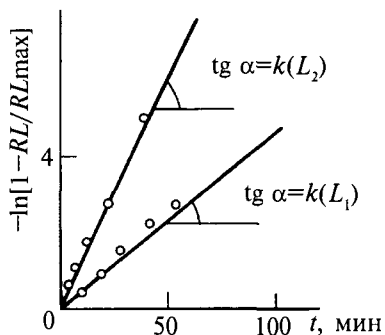


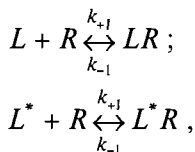
Рис. 3.7. Определение кинетических параметров взаимодействия фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка.

Графически зависимость концентрации связанного с рецепторами лиганда от времени их взаимодействия представлена на рис. 3.6. Для того чтобы определить величину константы скорости ассоциации по формуле (3.4), представим зависимость связанного с мембранами мозга быка фактора роста нервов в полулогарифмических координатах. Для простоты рассмотрим данную систему лишь при малом времени лиганд-рецепторного взаимодействия (рис. 3.7). По формуле (3.4) оцениваем: $k_{+1} = 1,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $k_{-1} = 4,2 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$.

Кинетика диссоциации лиганд-рецепторных комплексов

Помимо процесса образования лиганд-рецепторных комплексов происходит процесс их диссоциации.

Если же проводить радиорецепторные исследования, т.е. определять количество связанного с рецепторами радиоактивного лиганда, то процесс диссоциации можно индуцировать, добавив в систему «рецептор—меченый лиганд» избыток немеченого лиганда или, как иногда говорят, «холодного» лиганда. В этом случае будут происходить следующие процессы:



где L^* — меченый лиганд.

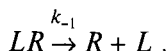
Запишем закон действующих масс для приведенной схемы:

$$\frac{d[L^*R]}{dt} = k_1[L^*][R] - k_{-1}[L^*R].$$

Из закона сохранения вещества следует: $[R_0] = [R] + [L^*R]$. Если $[L] \gg [L^*]$, т.е. имеется избыток немеченого лиганда, то $k_{+1}[L^*][R] \ll k_{-1}[L^*R]$. Тогда

$$\frac{d[L^*R]}{dt} = -k_{-1}[L^*R].$$

Фактически данный процесс можно описать в виде следующей схемы:



Эта схема описывает процесс *диссоциации лиганд-рецепторных комплексов*. Запишем закон действующих масс для процесса диссоциации лиганд-рецепторных комплексов:

$$\frac{d[LR]}{dt} = -k_{-1}[LR].$$

Данное дифференциальное уравнение является линейным однородным дифференциальным уравнением с разделяющимися переменными. Решается данное уравнение с помощью элементарных преобразований:

$$\frac{d[LR]}{[LR]} = -k_{-1}dt; \quad [LR] = C \exp[-tk_{-1}].$$

Константа C определяется из начальных условий $t = 0 \rightarrow [LR] = [LR]_0$. Тогда окончательно

$$[LR] = [LR]_0 \exp(-tk_{-1}), \quad (3.5)$$

где $[LR]_0$ — концентрация лиганд-рецепторных комплексов на момент начала процесса вытеснения.

Типичная кривая вытеснения приведена на рис. 3.8а.

Аналогично константе скорости ассоциации константа скорости диссоциации определяется по тангенсу угла наклона в полупологарифмических координатах (рис. 3.8б):

$$k_{-1} = \operatorname{tg} \alpha. \quad (3.6)$$

Пример 3.2 [22]. Определить константу скорости диссоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка по данным, приведенным в табл. 3.2.

Графически экспериментальные данные, характеризующие процесс

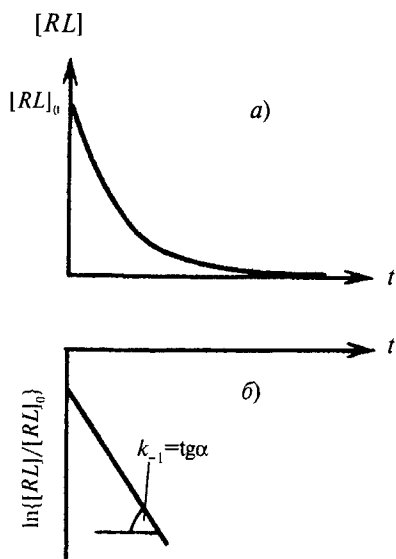


Рис. 3.8. Типичная кривая диссоциации (а) и определение константы скорости диссоциации (б).

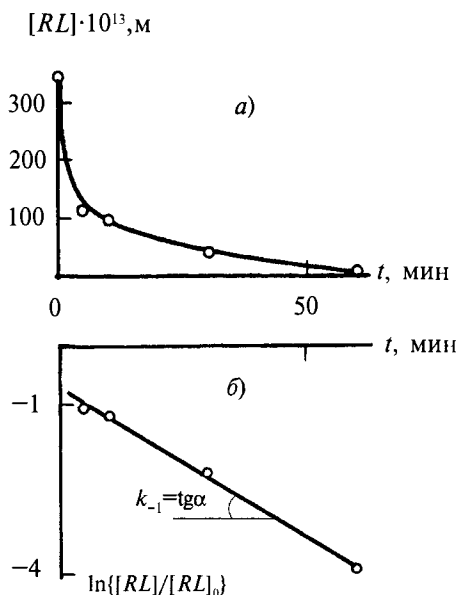


Рис. 3.9. Кинетика диссоциации фактора роста нервов с мембранами мозга быка (а) и определение кинетических параметров (б).

диссоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка, представлены на рис. 3.9а. Графическое определение константы скорости диссоциации приводится на рис. 3.9б. Как видно, $k_{-1} = 4,4 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ (что с точностью до погрешности вычисления совпало с полученным по формуле (3.4) — см. пример 3.1). Константа диссоциации лиганд-рецептор-

Таблица 3.2

Кинетика диссоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка

Время диссоциации, мин	Концентрация лиганд-рецепторных комплексов, $\text{M} \cdot 10^{-13}$
0	344
5	113
10	100
30	38
60	7

ных комплексов вычисляется исходя из определения ($Kd = k_{-1}/k_{+1}$), $Kd = 1,6 \cdot 10^{-8}$ М.

Определение концентрации рецепторов и их аффинности

Чаще всего концентрацию рецепторов и их аффинность определяют при условии достижения равновесия в системе «лиганд–рецептор»*. В условиях равновесия концентрация лиганд-рецепторных комплексов не меняется и равна константе, т.е. производная концентрации лиганд-рецепторных комплексов по времени равна нулю. Тогда уравнение закона действующих масс (3.3) для системы «лиганд-рецептор» (3.2) переписывается следующим образом:

$$\begin{aligned}
 0 &= k_{+1} [L][R] - k_{-1} [LR]; \\
 Kd &= \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[L][R]}{[LR]}, \quad \frac{1}{Kd} = \frac{[LR]}{([R_0] - [LR])[L]}; \\
 \frac{1}{Kd} [R_0] - \frac{1}{Kd} [LR] &= \frac{[LR]}{[L]}. \quad (3.7)
 \end{aligned}$$

Уравнение (3.7) получило название *уравнения (преобразований) Скэтчарда*. Данное уравнение было впервые получено в 1949 г. Г. Скэтчардом. В 1952 г. Ж. Иди и Б. Хофсти независимо друг от друга получили аналогичные уравнения при интерпретации данных ферментативного катализа.

Как видно из (3.7), график зависимости отношения концентраций связанного и свободного лигандов от концентрации лиганд-рецептор-

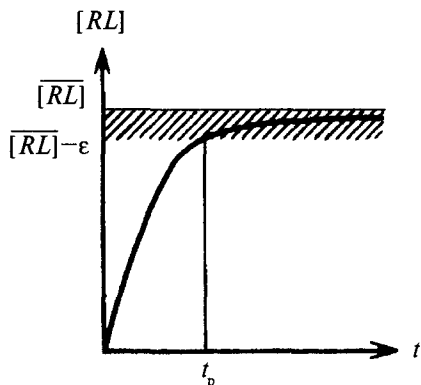


Рис. 3.10. Определение времени достижения равновесной концентрации $[RL]$.

* Как отмечалось в гл. 1, время достижения равновесия в обратимой реакции равно бесконечности. Однако с некоего момента времени концентрация лиганд-рецепторных комплексов перестает меняться с той точностью, с которой ее можно определить экспериментально. Именно этот момент времени будем считать за момент наступления равновесия в системе «лиганд–рецептор» (рис. 3.10).

ных комплексов представляет собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным $1/Kd$, и пересечением оси абсцисс в точке, равной начальной концентрации рецепторов (рис. 3.11).

Следует отметить, что координаты Иди-Хофсти отличаются от координат Скэтчарда только обозначением осей. Однако в радиорецепторных исследованиях наибольшее распространение получили именно координаты Скэтчарда, а в ферментативном катализе — координаты Иди-Хофсти.

Чем больше величина константы диссоциации, тем меньше сродство рецепторов к лиганду. Сродство рецепторов к лиганду также называют *аффинностью рецепторов*.

Размерность [равновесной] константы диссоциации: концентрация. Например, М, нМ.

Был проведен анализ литературных данных для определения частоты встречаемости тех или иных значений констант диссоциации [2]. Было показано, что наиболее вероятны величины констант диссоциации, имеющие порядок величины 10^{-9} – 10^{-10} М (рис. 3.12).

Для сравнения на этом же рисунке приведены плотности распределения констант Михаэлиса, характеризующие сродство ферментов к субстратам. Как следует из рисунка, величины констант Михаэлиса обычно больше, чем величины констант диссоциации, следовательно, сродство рецепторов к лигандам выше, чем сродство ферментов к субстратам.

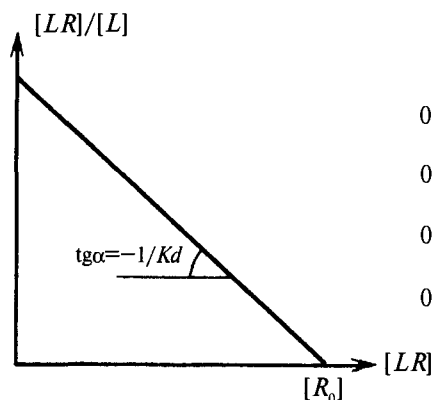


Рис. 3.11. Определение концентрации рецепторов и их аффинности методом Скэтчарда.

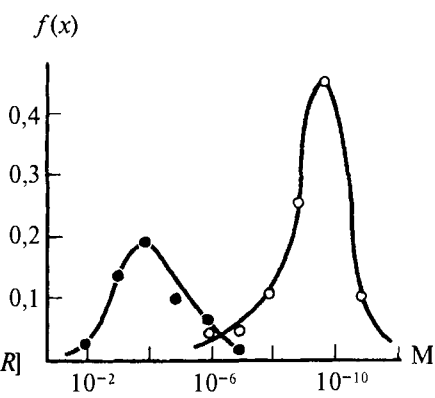


Рис. 3.12. Плотность распределения равновесной константы диссоциации лиганд-рецепторных комплексов (светлые точки) и констант Михаэлиса для фермент-субстратных комплексов (темные точки).

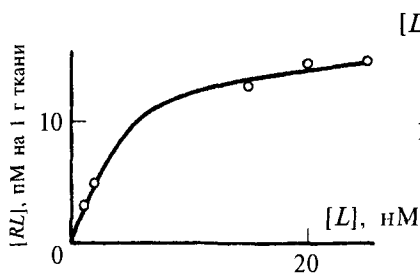


Рис. 3.13. Связывание ДАДЛЭ с мембранами головного мозга крыс.

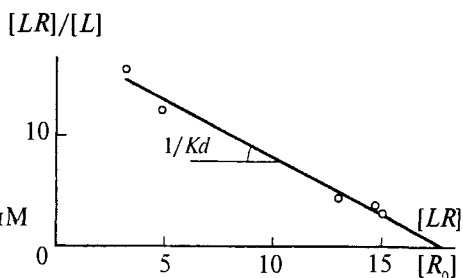


Рис. 3.14. Определение концентрации и аффинности ДАДЛЭ — связывающих участков в головном мозге крыс.

Таким образом, сродство рецепторов к лигандам в 10^5 – 10^6 раз превышает сродство ферментов к субстратам. Высокая степень сродства обеспечивает первичное высокоспецифическое «узнавание» рецепторами их лигандов и первичную детекцию химического сигнала. По своей специфичности и эффективности система «лиганд–рецептор» близка к системе «антиген–антитело».

Величину, обратную константе диссоциации, принято называть [равновесной] *константой ассоциации*: $K_a = 1/K_d$. Константа ассоциации имеет размерность 1/концентрация. Например, M^{-1} , nM^{-1} .

Пример 3.3 [35]. Определить концентрацию связывающих мест в головном мозге крыс и их сродство к [D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалину (ДАДЛЭ) на основании данных табл. 3.3.

Графически экспериментальные данные по связыванию ДАДЛЭ с мембранами головного мозга крыс приведены на рис. 3.13. Из графика в координатах Скэтчарда (рис. 3.14) находим: $R_0 = 18$ пМ/г ткани, $K_d = 1,8$ нМ.

Таблица 3.3

Связывание ДАДЛЭ с мембранами головного мозга крыс

Концентрация добавленного лиганда, нМ	Концентрация связанного лиганда, пМ на 1 г ткани
1	3,2
2	4,9
15	13
20	14,7
25	15

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные исторические этапы изучения лиганд-рецепторного взаимодействия. 2. Дайте определение понятиям «рецептор», «лиганд», «аффинность». 3. С помощью схемы опишите лиганд-рецепторное взаимодействие. 4. Получите уравнение, связывающее концентрацию лиганд-рецепторных комплексов с временем реакции «лиганд-рецептор». 5. Какими уравнениями описываются процессы ассоциации и диссоциации лиганд-рецепторных комплексов? Почему? 6. Какова размерность констант скоростей ассоциации и диссоциации, равновесной константы диссоциации? Каковы наиболее часто встречаемые значения этих констант? 7. Как можно определить константу скорости ассоциации и диссоциации? 8. Как можно определить концентрацию рецепторов и их аффинность? 9. Выведите уравнение Скэтчарда. 10. Каковы современные представления о структуре и функции рецепторов? 11. Что такое принцип структурной комплиментарности? 12. Сравните фермент-субстратное и лиганд-рецепторное взаимодействие. 13. Можно ли определить концентрацию рецепторов и их аффинность исходя из кинетических исследований? 14. Всегда ли совпадают величины констант диссоциации, вычисленные по тангенсу угла наклона в координатах Скэтчарда и вычисленные как отношение констант скоростей диссоциации и ассоциации? 15. Какие типы рецепторов вы знаете? По какому принципу называются рецепторы? 16. Дайте определение понятиям «агонист» и «антагонист».

3.2. Молекулярные механизмы проведения и усиления рецепторного сигнала*

Среди мрака и ночи раздался пушечный выстрел, за ним другой. «А, сигнал! Вода прибывает.»

Ф. Достоевский

Основные теории рецeпции

Блажен тот, кто ничего не знает: он не рискует быть непонятым.

Конфуций

Развитие представлений о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия было связано с изучением закономерностей влияния лекарственных средств на биологический ответ клетки. В простейшем случае это влияние представляло собой однонаправленную зависимость (см. рис. 3.1). Объяс-

* Данный параграф посвящен специальным вопросам, поэтому он может быть опущен при первом чтении книги.

нение такого рода зависимостей было предложено Кларком в 1926 г. Однако по мере накопления экспериментального материала было установлено три основных факта, не объяснимых с точки зрения теории Кларка:

1. Максимальный биологический ответ клетки во многих случаях наблюдался даже тогда, когда лишь незначительная часть рецепторов связана с лигандами.

2. Кривая зависимости биологического ответа клетки от концентрации добавленного лиганда во многих случаях имеет не однонаправленный вид, как это представлено на рис. 3.1, а более сложный, колоколообразный (рис. 3.15).

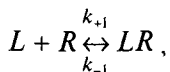
3. Различие механизма действия агонистов и антагонистов рецепторов одного типа: агонисты вызывают, а антагонисты не вызывают биологический ответ клетки.

Эти факты послужили причиной для формирования более сложных, чем теория Кларка, представлений о механизмах биологического ответа клетки на взаимодействие рецептора с лигандом.

В 1956 г. Стэферсон предположил, что величина биологического ответа клетки на взаимодействие лигандов с рецепторами есть некая (неизвестная) функция числа занятых рецепторов; при этом максимальный биологический ответ наблюдается при связывании лишь части рецепторов с лигандом.

Однако теория Стэферсона не объясняла колоколообразных зависимостей биологического ответа клеток от концентрации добавленного лиганда, а также различий в действии антагонистов и агонистов. Поэтому для объяснения разницы в механизмах действия агонистов и антагонистов в 1961 г. У. Патон и в 1967 г. А. Карлин предлагают теории, которые в настоящее время принято называть *скоростной* и *аллостерической*.

Суть скоростной теории (Патон, 1961) заключается в следующем. Величина биологического эффекта лиганда определяется скоростью ассоциации лиганда с рецептором, т.е. для схемы



при этом чем больше k_{+1} , тем больше биологический ответ клетки. Согласно Патону агонистом является вещество, которое с высокой скоростью взаимодействует с рецептором, образуя короткоживущие лиганд-рецепторные комплексы. Антагонистом является вещество, скорость взаимодействия которого с рецептором невелика, однако в результате этого взаимодействия образуются долгоживущие лиганд-рецепторные комплексы.

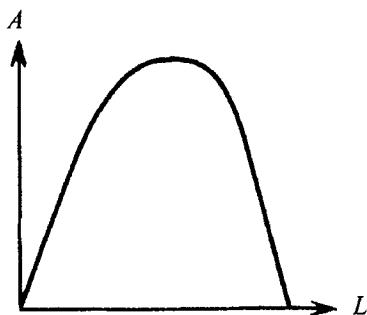


Рис. 3.15. Колоколообразная зависимость величины биологического ответа (A) от концентрации добавленного лиганда (L).

Согласно аллостерической теории Карлина (1967) рецепторы находятся в двух состояниях: активном и неактивном. Переход между этими состояниями является обратимым:

$$R \leftrightarrow R^*,$$

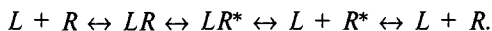
где R и R^* — неактивный и активный рецепторы. Если лиганд взаимодействует преимущественно с неактивной формой рецептора, то он является антагонистом, а, если с активной формой рецептора, то он — агонист.

Следует заметить, что в настоящее время теории Патона и Карлина имеют больше историческое значение. Это связано с накоплением экспериментального материала, противоречащего этим теориям.

1. Основным фактом, противоречащим скоростной теории, является экспериментально определенная скорость ассоциации агонистов и антагонистов с рецепторами одного и того же типа. Показано, что скорости взаимодействия агонистов и антагонистов во многих случаях не отличаются существенным образом; более того, скорость ассоциации антагониста с рецептором может оказаться больше скорости ассоциации агониста с тем же рецептором.

2. Основным фактом, противоречащим теории Карлина, являются результаты опытов по вытеснению агонистов, связанных с рецепторами, антагонистами. В подобных опытах число мест связывания агонистов и антагонистов существенным образом не отличается друг от друга.

Попытка объединить теории Стэферсона, Патона и Карлина в единое целое предпринята в конце 70-х — начале 80-х гг. Е. Ариенсом (1979, 1981, 1982) [23–26]. Согласно Ариенсу при взаимодействии лиганда с рецептором образуется неактивный лиганд-рецепторный комплекс, который затем может обратимо перейти в активное состояние. При этом скорость активации лиганд-рецепторных комплексов антагонистов с рецепторами много меньше скорости ассоциации агонистов с рецепторами. Биологический ответ пропорционален числу образовавшихся активных лиганд-рецепторных комплексов, а не суммарному числу связанных рецепторов. В обобщенном виде кинетику лиганд-рецепторного взаимодействия согласно *теории Ариенса* можно записать следующим образом:



Следует заметить, что до сих пор нет достаточного количества экспериментального материала для окончательного подтверждения или опровержения теории Ариенса. Формально схема Ариенса соответствует современным представлениям о механизмах внутриклеточного формирования биологического ответа при взаимодействии рецепторов с лигандами. Однако данная схема не описывает весь тот комплекс процессов, которые происходят в клетке.

Вторичные мессенджеры

Революция в изучении внутриклеточных процессов была сделана в 50–60-е гг. В 1951 г. Ц. Кори и соавторы установили, что взаимодействие ряда гормонов с клетками приводит к изменению активности глюко-

зы-6-фосфатазы. В 1956 г. Е. Кребс и Е. Фишер установили взаимосвязь между активацией этого фермента и содержанием АТФ в клетке. Выявление промежуточных продуктов, участвующих в реакциях активации, позволяет в 1957 г. Е. Сазерленду и Р. Роллу предположить, что в реакциях активации участвует аденин-нуклеотид. В 1959 г. Д. Липкин и соавторы идентифицировали его как *циклический аденозинмонофосфат* (цАМФ). В результате исследования цАМФ и аналогичных цАМФ систем сложились представления о *вторичных мессенджерах* (посредниках) внутриклеточных молекул, осуществляющих передачу сигнала о взаимодействии рецептора с лигандом внутриклеточным эфферентным систем.

Вторичными мессенджерами (от англ. message- сообщение) называются внутриклеточные молекулы, осуществляющие сопряжение рецепторов с внутриклеточными эфферентными системами (ферментами, ионными каналами, геномом и т.д.). В результате лиганд-рецепторного взаимодействия концентрация вторичных мессенджеров в клетке меняется; при этом концентрация одних внутриклеточных мессенджеров может возрастать, а других — убывать.

Свое название вторичные мессенджеры получили во многом благодаря тому, что одно время лиганды было принято называть [первичными] мессенджерами, так как многие из них осуществляют сопряжение эндокринных желез с эфферентными клетками.

Классификация рецепторов по их сопряжению со вторичными мессенджерами

По сопряжению со вторичными *мессенджерами* все рецепторы делятся на:

1. *Рецепторы-ионные каналы.* Наиболее часто эти рецепторы представляют собой несколько глобул интегральных белков, которые образуют ионный канал (рис. 3.16). В неактивном состоянии рецептора эти глобулы расположены так, что ионный канал закрыт. Связывание одной или нескольких глобул с лигандом приводит к открытию канала и прохождению ионов в клетку или выход из клетки. В этом случае ионы могут выступать в качестве вторичного мессенджера. Наиболее распространенным внутриклеточным ионным мессенджером ионного типа является кальций. К рецепторам-ионным каналам относятся, например, Н-холинорецепторы.

2. *Рецепторы, сопряженные с ферментами.* Обычно одна из глобул белка, образующая рецептор такого типа, обладает каталитической активностью. Лиганд-рецепторное взаимодействие

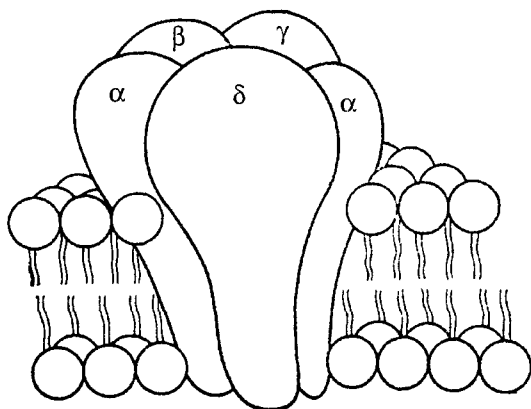


Рис. 3.16. Рецептор-ионный канал (Н-холинорецептор) [4].

приводит к изменению каталитической активности данной субъединицы и синтеза внутриклеточных вторичных мессенджеров: так функционируют рецепторы факторов роста, инсулиновые рецепторы и др.

3. *Рецепторы, сопряженные с G-белками.* Рецепторная молекула данного типа рецепторов сопряжена с внутриклеточной стороны с особым ГТФ-связывающим белком (G-белком), расположенным на внутриклеточной стороне цитоплазматической мембраны (рис. 3.17). Через G-белок рецепторы могут изменять активность внутриклеточных ферментативных систем и вызывать открытие ионных каналов. К G-сопряженным рецепторам относятся, например, β -адренорецепторы. Рассмотрим особенности функционирования G-сопряженных рецепторов отдельно.

Строение и функционирование G-белок сопряженных рецепторов

Все G-сопряженные рецепторы имеют однотипное строение (рис. 3.17). Они представляют собой белковую молекулу, которая семь раз пронизывает цитоплазматическую мембрану, при этом N — конец располагается внеклеточно.

Белковая молекула такого рецептора начинается с гидрофильного участка, состоящего обычно примерно из 30 аминокислот (рис. 3.17б). После этого следует порядка 30 гидрофобных аминокислот, образующих в цитоплазматической мембране спиралевидную глобулу с очень плотной ук-

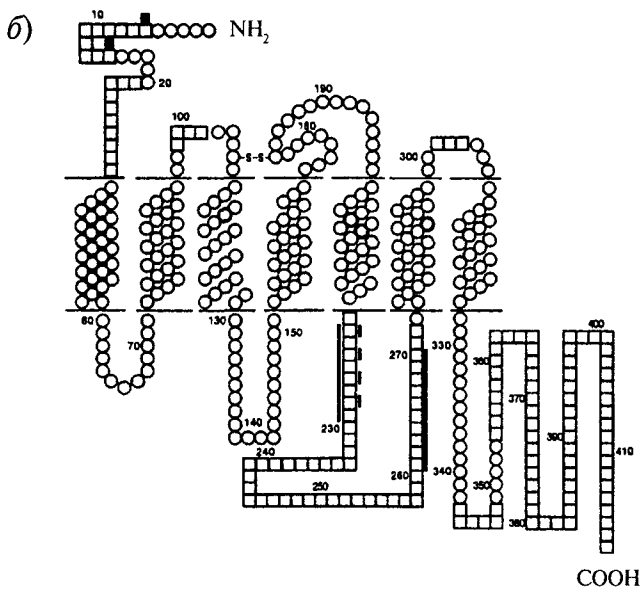
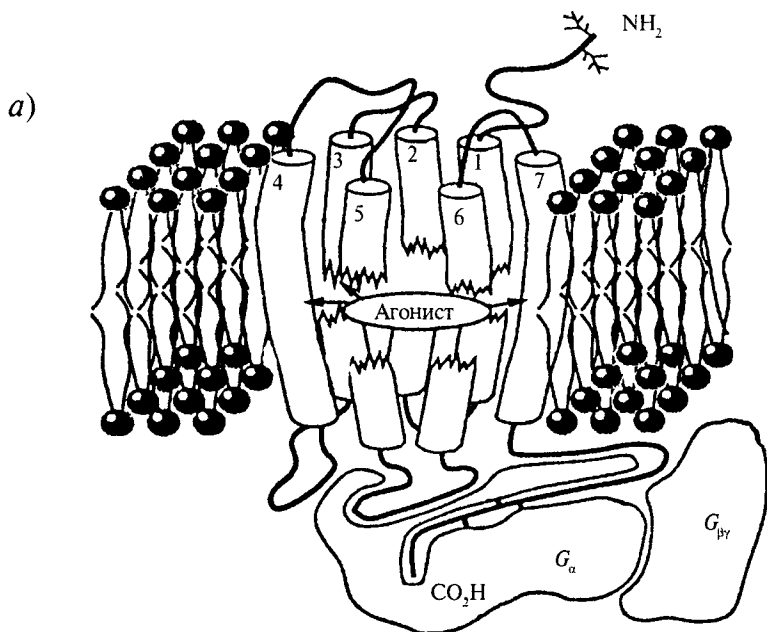


Рис. 3.17. G-сопряженный рецептор.

a — пространственная структура [52]; б — аминокислотная последовательность (обозначены места фосфорилирования) [17].

ладкой. Все остальные шесть глобул, расположенных в цитоплазматической мембране, аналогичны первой глобуле.

Рецептор, сопряженный с G-белком, образует три внутриклеточных и три внеклеточных «петли». Первая внутриклеточная петля рецептора, сопряженного с G-белком, содержит 10–20 аминокислот. Вторая петля содержит порядка 20 аминокислот. В третьей петле примерно 50 аминокислот. Первая внеклеточная петля G-сопряженного рецептора содержит примерно 10 аминокислот, вторая — 20–30, третья — 10. Между первой и второй внеклеточной петлей есть один или несколько дисульфидных мостиков. Чаще всего лиганды связывает вторая внеклеточная петля. Оканчивается G-сопряженный рецептор гидрофильным C-концом, состоящим примерно из 100 аминокислот. Третья внутриклеточная петля и C-конец осуществляют сопряжение рецептора с G-белком.

G-белок состоит из двух субъединиц: α и $\beta\gamma$ (рис. 3.17а), α -субъединица связывает ГТФ, $\beta\gamma$ -субъединица* осуществляет «крепление» G-белка к цитоплазматической мембране. α -субъединица связывается с C-концом и третьей петлей G-сопряженного рецептора, а $\beta\gamma$ -субъединица связывается только с C-концом.

G-белки представляют собой гетерогенную популяцию белков, отличающуюся за счет α -субъединицы (табл. 3.4) (разница в $\beta\gamma$ -субъединице у G-белков неизвестна). В настоящее время достоверно описаны следующие виды G-белков (число идентифицированных α -субъединиц больше) [6]:

1. G_s -белки. Содержат α_s -субъединицу. Эти G-белки оказывают стимулирующее воздействие на аденилатциклазу (внутриклеточный фермент, превращающий АТФ в цАМФ). В возбудимых тканях (мышцы, нервы) данный тип G-белков оказывает ингибирующее действие на медленный тип кальциевых каналов.

2. G_i -белки. Содержат α_i -субъединицу. Оказывают ингибирующее воздействие на аденилатциклазу, активируют цАМФ-фосфодиэстеразу.

3. G_o -белки. Приводят к угнетению потенциал-зависимых кальциевых каналов и стимуляции калиевых каналов.

4. G_K -белки. Вызывают активацию калиевых каналов и угнетение аденилатциклазы.

5. G_q -белки. Приводят к активации фосфолипазы C.

Рассмотрим схему типичного функционирования G-сопряженного рецептора, связанного с аденилатциклазной системой (рис. 3.18, 3.19).

* В клетке β - и γ -субъединицы представляют единое функциональное целое. Однако *in vitro* они могут быть разделены.

Таблица 3.4

Свойства субъединиц G-белков (по [6, 52])

Субъединица	Связывающий токсин	Эффектор	Примечание
α_s	Холерный токсин	Аденилатциклаза (+) Медленный тип Ca^{++} каналов (-)	Идентифицировано две формы массой 45 и 52 кДа. Образуются из одной мРНК в результате сплайсинга
α_{olf} , α_g , α_i	Холерный токсин	Аденилатциклаза (+)	По строению близки к α_s . Идентифицированы в обонятельных (α_{olf}), фоторецепторных (α_g) и вкусовых (α_i) клетках
α_k	Коклюшный токсин	Аденилатциклаза (-) K^+ каналы (+)	Кодируется отдельным геном
α_{i1} , α_{i2}	Холерный и коклюшный токсины	цАМФ-фосфодиэстераза (+) Аденилатциклаза (-)	Идентифицированы в палочках (α_{i1}) и в колбочках (α_{i2})
α_0	Коклюшный токсин	K^+ каналы(+) Ca^{++} каналы (-)	Встречаются в нервной ткани. Наиболее часто представлены в головном мозге
α_q	Холерный и коклюшный токсины	Фосфолипаза C (+)	Кодируется отдельным геном
β_{as} , β_{ac}	Нет	Нет	Разница между субтипами неизвестна
γ	Нет	Нет	Присутствует во всех G-белках

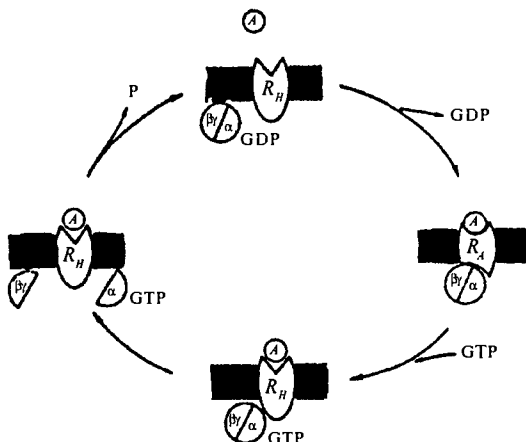


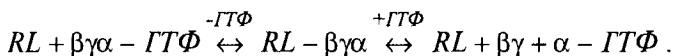
Рис. 3.18. Схема функционирования G-сопряженного рецептора [52].

R_H — неактивный рецептор, R_A — активный рецептор, A — агонист

Свободный рецептор не связан с G-белком. После связывания агониста происходит активация рецептора (изменение конформации рецептора за счет процессов фосфорилирования и дефосфорилирования), и рецептор может взаимодействовать с G-белком, «лишенным» ГТФ. Присоединение ГТФ к связанному с рецептором G-белку приводит к диссоциации G-белка на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы.

α -субъединица, связанная с ГТФ, взаимодействует с аденилатциклазой, которая начинает катализировать превращение цАМФ из АТФ. Данный катализ продолжается до тех пор, пока ГТФ, связанный с α -субъединицей, не перейдет в ГДФ за счет собственной ГТФазной активности α -субъединицы. α -субъединица, связанная с ГДФ, диссоциирует из связи с аденилатциклазой, аденилатциклаза теряет каталитическую активность, а α -субъединица взаимодействует с $\beta\gamma$ -субъединицей, образуя G-белок.

Формальную схему для взаимодействия агониста с рецептором и лиганд-рецепторного комплекса с G-белком можно записать следующим образом [Taylor, 1990]:



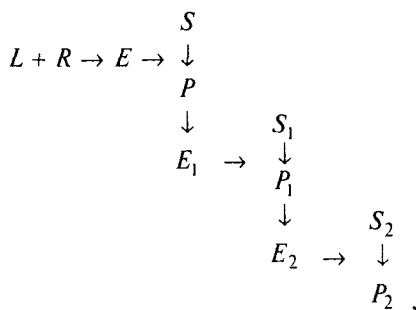
В случае взаимодействия антагониста с рецептором не происходит изменения конформации рецептора, и рецептор не может взаимодействовать с G-белком. Поэтому сигнал о лиганд-рецепторном взаимодействии антагонистов с клеточными рецепторами не трансформируется во внутриклеточный сигнал.

Механизмы проведения и усиления рецепторного сигнала

Рассмотренный механизм обеспечивает проведение и усиление внутриклеточного сигнала. Один рецептор, находясь в активном состоянии, может взаимодействовать с 10–100 G-белками. Одна активная аденилатциклаза способна катализировать образование 10–100 молекул цАМФ. Тем самым рецепторный сигнал усиливается в 100–10000 раз. Так как цАМФ не является конечной мишенью действия рецепторного сигнала, то в процессе передачи его на внутриклеточный рецептор коэффициент усиления будет 10^4 – 10^8 .

Образовавшаяся цАМФ быстро инактивируется фосфодиэстеразой, что обеспечивает инактивацию рецепторного сигнала. Поэтому действие любого рецепторного сигнала не может быть бесконечно долгим. С другой стороны, если цАМФ не разрушена, она может оказывать стимулирующее и ингибирующее воздействие на внутриклеточные процессы (рис. 3.19). *Стимулирующее* воздействие цАМФ оказывает на гликолиз (энергетические процессы). Четыре молекулы цАМФ взаимодействуют с неактивной А-киназой, активируя ее. Активная А-киназа активирует гликоген-фосфоорилазу, которая катализирует превращение гликогена в глюкозо-1-фосфат, начиная тем самым процесс гликолиза. В результате гликолиза в клетке накапливается АТФ. Поэтому накопление в клетке цАМФ принято расценивать как *процесс активации клетки*. цАМФ *ингибирует* фосфорилирование белков (пластические процессы), активирует белок-ингибитор фосфотазы, который ингибирует протеин-киназу.

Как следует из только что рассмотренной схемы, механизмы внутриклеточного проведения и усиления сигнала представляют собой *совокупность каскадных реакций*. Эти реакции аналитически можно записать таким образом:



где L — лиганд; R — рецептор; E_i — ферменты; S_i — субстраты; P_i — продукты ферментативных реакций. Теоретический расчет подобного ферментативного каскада показывает, что с

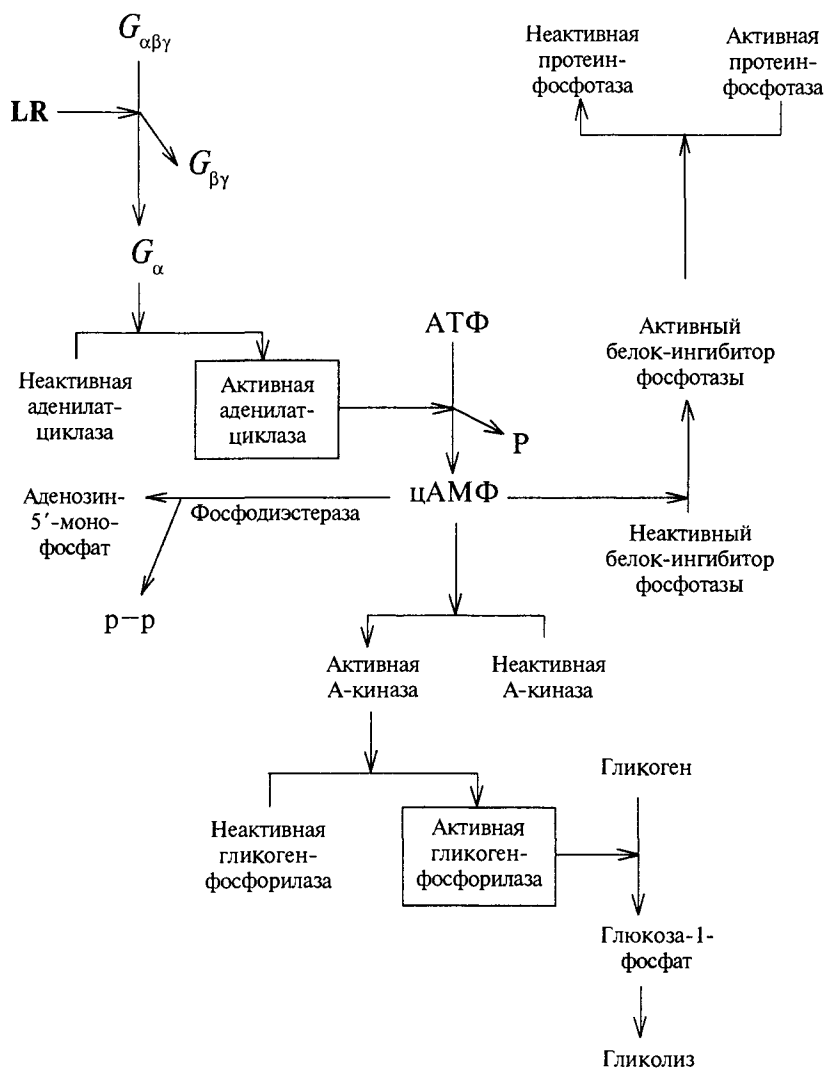


Рис. 3.19. Схема основных механизмов молекулярного проведения и усиления сигнала от G-сопряженных рецепторов.

помощью него рецепторный сигнал может быть усилен в 10^9 – 10^{12} раз [5].

Показано, что существующие в клетке ферментативные системы усиления сигнала теоретически позволяют достигать астрономических величин усиления: 10^{12} – 10^{40} . Однако внутри одной клетки запасы субстратов для ферментативных реакций весьма ограничены, поэтому реальная концентрация вторичных мессенджеров или конечных продуктов ферментативной реакции не превышает 10^{-2} М [5]. Если учесть, что концентрация лиганд-рецепторных комплексов обычно составляет порядка 10^{-12} – 10^{-9} М, то внутри клеток рецепторный сигнал увеличивается в среднем не более чем в 10^7 – 10^{10} раз.

Инактивация рецепторного сигнала

Принципиально важной особенностью функционирования рецепторных систем является необходимость *инактивации* («тушения») развивающегося во времени концентрационного возмущения, запускаемого лиганд-рецепторным взаимодействием.

Так, например, инактивация цАМФ осуществляется фосфодиэстеразой (рис. 3.19). С другой стороны, аденилатциклаза лишь ограниченное время катализирует превращение АТФ в цАМФ. Это связано с ГТФ-азной активностью α_s -субъединицы G-белка, которая осуществляет превращение ГТФ в ГДФ, инактивируя α_s -субъединицу и, как следствие, инактивирует аденилатциклазу. Так, например, холерный токсин связывается с α_s -субъединицей, лишая ее ГТФ-азной активности. Вследствие этого активация аденилатциклазы длится бесконечно долго.

Инактивация клеточного ответа на рецепторный сигнал обеспечивает его высокую специфичность и позволяет адаптировать клетку к изменяющимся внешним воздействиям (рис. 3.20). После удаления эффектора ферментативная система полностью восстанавливает свои свойства.

Например, родопсин — белок палочек сетчатки глаза — способен «улавливать» 1–2 фотона. В условиях слабого освещения это обеспечивает темное (ночное) зрение. В условиях достаточного (дневного) освещения высокая чувствительность родопсина к свету сохраняется, но родопсин «улавливает» фотоны, поступившие сверх фонового уровня освещения (аналог зоны II рис. 3.20). Тем самым обеспечивается световая адаптация. Именно поэтому при резком переходе из темного помещения в светлое некоторое время «режет» глаза (идет адаптация родопсина). Точно так же при переходе из светлого помещения в темное нужно несколько секунд, чтобы глаза «привыкли» к темноте, т.е. чтобы произошла темновая адаптация родопсина [по 6].

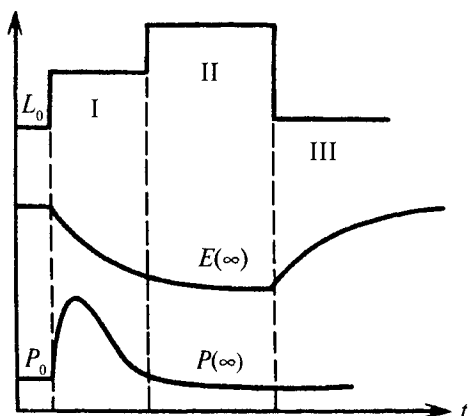


Рис. 3.20. Кинетика концентрационных ответов на действие эффектора (L_0) при быстром введении эффектора (I, II) и при освобождении от него (III).

E — концентрация активного эффекторного фермента; P — концентрация продукта.

шения концентрации лиганда во внеклеточной жидкости вследствие разрушения (деградации) лиганда внеклеточными ферментами.

б) *Повышение константы скорости диссоциации комплекса лиганд-рецептора вследствие активации (изменения конформации) рецепторов в процессе передачи сигнала.*

в) *Изменение концентрации свободных или связанных рецепторов на цитоплазматической мембране клетки, например, в результате процессов интернализации рецепторов или лиганд-рецепторных комплексов (см. § 3.3).*

II. Кинетические механизмы инактивации сопряжения лиганд-рецепторного комплекса с ферментами, синтезирующими вторичные мессенджеры, или с ионными каналами.

а) *Самоинактивация α -субъединицы G-белка.* Связана с ГТФазной активностью α -субъединицы.

б) *Десенситизация ферментативной системы.* Механизм подобной инактивации может быть связан с процессами фосфорилирования-дефосфорилирования, метилирования-деметирирования рецептора, G-белков, ферментов и т.д.

III. Инактивация фермента, синтезирующего ключевые регуляторы клеточного ответа. Наиболее изучена инактивация вторичным мессенджером — арахидоновой кислотой — ферментов син-

Все известные кинетические механизмы инактивации клеточного ответа (каскада внутриклеточных реакций, возникающих вследствие лиганд-рецепторного взаимодействия) можно классифицировать следующим образом:

I. Кинетические механизмы, приводящие к уменьшению концентрации комплекса «лиганд-рецептор».

а) *Диссоциация лиганд-рецепторных комплексов.* Данный механизм может развиваться, например, за счет умень-

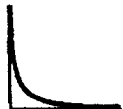
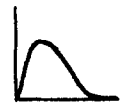
Тип реакции	Знак параметров A_1 и A_2	Добавление лиганда	Элиминирование лиганда
1	$\begin{matrix} + & 0 \\ 0 & + \end{matrix}$		
2	$\begin{matrix} + & + \end{matrix}$		
3	$\begin{matrix} + & - \end{matrix}$		

Рис. 3.21. Зависимость знака биологического ответа при добавлении и элиминировании лиганда.

A_1 — эффект, вызываемый рецепторами первого типа; A_2 — эффект, вызываемый рецепторами второго типа [1].

теза эйкозаноидов (простагландинов, тромбоксанов, липоксинов и т.д.)

IV. Взаимодействие лиганда с различными типами рецепторов (см. § 3.3). Припишем одному типу рецепторов условный знак «плюс» — стимуляция клеточной функции, другому типу рецепторов условный знак «минус» — ингибция клеточной функции или «ноль» — отсутствие влияния на клеточную функцию. В этом случае кинетические закономерности развития клеточного ответа на лиганд-рецепторное взаимодействие будут аналогичны представленным на рис. 3.21.

Основной особенностью всех рассмотренных механизмов инактивации сигнала (кроме механизма Ia) является то, что для G-сопряженных рецепторов инактивация сигнала осуществляется через G-белок в ходе функционирования ферментативной системы по усилению и проведению сигнала.

Основные свойства рецепторных систем проведения и усиления сигнала

Существенным свойством рецепторных систем является их высокая чувствительность. Это свойство проявляется в виде существенных изменений клеточного ответа на незначительные изменения концентрации добавленного лиганда (рис. 3.22).

Чувствительность большинства реальных биологических систем такова, что она гораздо выше, чем ее можно было бы ожидать исходя из кинетики Михаэлиса-Ментен, например, для схемы (3.8).

Предполагают, что чувствительность рецепторных систем связана с кооперативными свойствами ферментов, участвующих в каскадных реакциях типа (3.8).

Другое не менее важное свойство рецепторных систем заключается в наличии «резерва» рецепторов, т.е. максимальный клеточный ответ может наблюдаться при незначительном числе связанных с лигандом рецепторов (рис. 3.23).

«Резерв» рецепторов тесно связан с каскадным механизмом проведения и усиления сигнала. Действительно, так как один лиганд-рецепторный комплекс способен взаимодействовать с несколькими G-белками, то в силу ограниченности числа G-белков лишь небольшая доля лиганд-рецепторных комплексов спо-

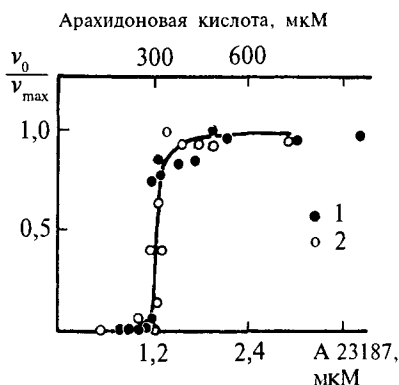


Рис. 3.22. Пример чувствительности рецепторных систем. Зависимость начальной скорости агрегации тромбоцитов (v_0) от концентрации арахидоновой кислоты (1) и Ca^{++} (2) [8].

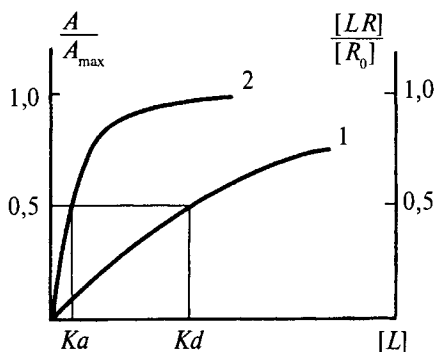


Рис. 3.23. Зависимость концентрации лиганд-рецепторных комплексов $[RL]$ (кривая 1) и ответа эффекторной ферментативной системы A (кривая 2) в условиях существования «резерва» рецепторов.

собна проактивировать все G-белки и привести к максимально-му биологическому ответу. Аналогичным образом в клетке может наблюдаться «резерв» G-белков по отношению к их эффекторам (ионным каналам, ферментам) и т.д.

Существование «резерва» рецепторов обеспечивает:

1. *Чувствительность* рецепторных систем за счет механизмов каскадного усиления сигнала.

2. *Адаптацию* рецепторных систем к изменяющимся концентрациям лиганда (лигандов) в микроокружении рецептора (см. рис. 3.20).

3. *Консерватизм* рецепторных систем. Количественные характеристики ферментативных звеньев клеточного ответа внутри данной группы индивидуумов мало отличаются друг от друга. Таким образом, отличие в реакции различных живых организмов на одно и то же лекарственное воздействие в первую очередь будет связано с изменением свойств рецепторов, а не свойств ферментативного каскада усиления и проведения рецепторного сигнала.

Принято считать, что основными свойствами рецепторов, влияющими на биологический ответ клетки, являются: *равновесная константа диссоциации и концентрация рецепторов*. Величина константы диссоциации зависит от свойств рецепторного белка, т.е. определяется геномом клетки. На разных клетках и у разных индивидуумов одного биологического вида или близкородственных видов величина константы диссоциации примерно одинаковая. Изменение величины константы диссоциации обычно свидетельствует о генетических дефектах рецепторного белка.

Концентрация рецепторов может существенным образом меняться в процессе жизнедеятельности организма. Так, например, при длительном введении какого-либо лекарства концентрация рецепторов к этому лекарству снижается (down-regulation). При недостатке биологически активных веществ в микроокружении клетки концентрация рецепторов к этому биологически активному веществу возрастает (up-regulation).

Следует заметить, что концентрация рецепторов может в значительной степени варьироваться от одной клеточной линии к другой. Кроме того, концентрация рецепторов зависит от функционального состояния клетки: рецепторы, представленные на «активированной» клетке, могут отсутствовать на неактивной клетке и наоборот.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные теории лекарственной рецепции. В чем их недостатки? 2. Что такое «вторичные мессенджеры»? Какие вторичные мессенджеры вы знаете? 3. Перечислите типы рецепторов по сопряжению их со вторичными мессенджерами. 4. Каковы особенности функционирования

рецепторов, сопряженных с G-белками? 5. Классификация и строение G-белков. 6. Функционирование G-белков. 7. Синтез и инактивация цАМФ. На какие биологические процессы оказывает влияние цАМФ? 8. Механизм каскадного усиления сигнала. Приведите пример каскадной ферментативной реакции. 9. Опишите механизм действия холерного токсина. 10. Каковы представления о механизмах проведения и усиления сигнала? 11. Какие механизмы инактивации сигнала вы знаете? 12. Механизмы формирования «колоколообразных» зависимостей величины биологического ответа клетки от концентрации добавленного лиганда. 13. Механизмы супервысокочувствительности рецепторных систем. 14. Что такое «резерв» рецепторов? Каков биологический смысл этого явления?

3.3. Дискриминация моделей и определение параметров рецепторного связывания

Единственный способ противостоять природе — основательно познать ее.

Дж. Локк

В § 3.1 рассмотрен простейший случай лиганд-рецепторного

взаимодействия, описываемого схемой $L + R \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} LR$

и уравнением $[LR] = \frac{[L][R_0]}{Kd + [L]} (1 - \exp[-t(k_{+1}[L] + k_{-1})])$.

Если лиганд-рецепторное взаимодействие протекает согласно данной схеме, то зависимость концентрации лиганд-рецепторных комплексов от времени лиганд-рецепторного взаимодействия и от количества добавленного лиганда аналогична представленным на рис. 3.2 и 3.5, а график в координатах Скэтчарда представляет собой прямую линию (см. рис. 3.11, 3.14).

Однако, как показывают многочисленные исследования кинетики связывания лигандов с рецепторами, характер указанных зависимостей может быть гораздо более сложным, чем показано в § 3.1 (рис. 3.24–3.26).

Кинетические кривые связывания (рис. 3.24). На рис. 3.24 кинетическая кривая *a* напоминает представленную на рис. 3.5, однако при этом равновесие по связыванию в системе не наблюдается. Начальный участок кривой *b* на рис. 3.24 также похож на кинетическую кривую, представленную на рис. 3.5. Однако при этом наблюдается «аномальный» убывающий участок. На рис. 3.24 представлена кривая *в*, напоминающая «наложение» двух обычных кинетических кривых.

Зависимости равновесной концентрации лиганд-рецепторных комплексов от концентрации добавленного лиганда (рис. 3.25). Кривая *a*, приведенная на рис. 3.25 напоминает «наложение» двух кривых, представленных на рис. 3.2. Для кривой *б*, приведенной на рис. 3.25, характерно наличие участка, напоминающего стадию индукции реакции.

Графики Скэтчарда. Кривая *a* связывания, представленная в координатах Скэтчарда на рис. 3.26*a*, ничем не напоминает график, приведенный на рис. 3.11. Участки кривой *б*, представленных на рис. 3.26 и *в* при больших концентрациях добавленного лиганда, аналогичны таким же участкам графика 3.11. Таким образом, различие между кривыми *б* и *в* на рис. 3.26 и рис. 3.11 заключается в участке, полученном при малой концентрации добавленного лиганда (а следовательно, при малой концентрации связанного лиганда).

Таким образом, существует достаточно большое количество экспериментальных данных, которые не описываются простой моделью рецепторного связывания (3.1). Следовательно, необходимо усложнение модели.

Построение сложных моделей лиганд-рецепторного взаимодействия возможно только после того, как обнаружено очевидное несоответствие теоретических уравнений модели и экспериментальных данных. Для того чтобы получить уравнения сложных моделей рецепторного связывания, ниже рассмотрены все предпосылки, положенные в основу простой модели лиганд-рецепторного взаимодействия (3.2), и предположения, приведшие к уравнению (3.1).

Предположения модели (3.2) [модель простого рецепторного связывания]:

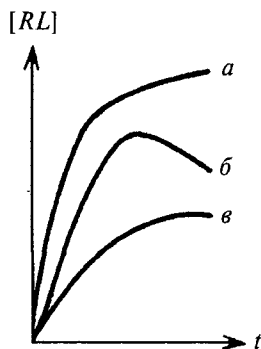


Рис. 3.24. Наблюдаемые кинетические зависимости числа лиганд-рецепторных комплексов от времени лиганд-рецепторного взаимодействия.

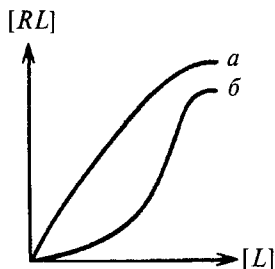


Рис. 3.25. Наблюдаемые зависимости равновесной концентрации лиганд-рецепторных комплексов от концентрации добавленного лиганда.

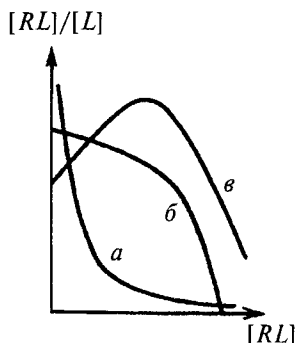


Рис. 3.26. Наблюдаемые графики Скэтчарда.

1. Концентрация лиганда много больше концентрации рецепторов.

2. С течением времени суммарная концентрация связанного и свободного лиганда, связанного и свободного рецептора не меняется.

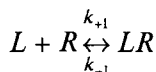
3. Все рецепторы одинаково доступны для лиганда.

4. Одна молекула рецептора взаимодействует с одной молекулой лиганда.

Рассмотрим отклонения от вышеперечисленных предположений последовательно.

Взаимодействие соизмеримых концентраций лиганда и рецептора

В случае, если концентрации лиганда и рецептора соизмеримы, то закон действующих масс для схемы



записывается следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{d[LR]}{dt} &= k_{+1}[L][R] - k_{-1}[LR] = k_{+1}[L_0][R_0] - \\ &- (k_{+1}[R_0] + k_{+1}[L_0] + k_{-1})[LR] + k_{+1}[LR]^2, \end{aligned} \quad (3.9)$$

где $[L_0]$ — начальная концентрация лиганда.

Уравнение (3.9) является нелинейным дифференциальным уравнением, относящимся к классу уравнений Риккатти. В общем случае такие уравнения не могут быть решены, если только неизвестно частное решение подобного уравнения. Однако уравнение (3.9) может быть решено благодаря его особой форме (в правой части этого уравнения стоит квадратный двучлен). Корни этого квадратного двучлена могут быть найдены по формулам:

$$\begin{aligned} 2\alpha_1 &= [R_0] + [L_0] + Kd - \sqrt{([L_0] - [R_0] + Kd)^2 + 4Kd[R_0]}; \\ 2\alpha_2 &= [R_0] + [L_0] + Kd + \sqrt{([L_0] - [R_0] + Kd)^2 + 4Kd[R_0]}. \end{aligned}$$

Тогда

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}([LR] - \alpha_1)([LR] - \alpha_2).$$

С учетом начальных условий ($t = 0 \rightarrow [LR] = 0$) можно получить:

$$[LR] = \alpha_1 \left(1 - \frac{\alpha_1 - \alpha_2}{\alpha_1 - \alpha_2 \exp[k_{+1}(\alpha_1 - \alpha_2)t]} \right), \quad (3.10)$$

где $[LR]$ — концентрация лиганд-рецепторных комплексов, вычисленная в предположении, что концентрации лиганда и рецептора соизмеримы.

Формула (3.10) описывает изменение концентрации лиганд-рецепторных комплексов от времени лиганд-рецепторного взаимодействия и от концентрации добавленного лиганда в случае, если концентрации лиганда и рецептора соизмеримы.

Было проведено вычисление относительной погрешности вычисления концентрации лиганд-рецепторных комплексов по формулам (3.1) и (3.10) (рис. 3.27):

$$\Delta = \frac{[RL] - [\overline{RL}]}{[RL]} \times 100\%.$$

Как видно из рисунка, разница вычислений максимальна, если концентрации рецепторов и лиганда равны и равны константе диссоциации.

Пример 3.4. В работе [51] определяли связывание дипренорфина с мембранами мозга. При этом концентрация мест связывания составила порядка 200 пМ, константа диссоциации порядка 1 нМ. Начиная с какой концентрации лиганда погрешность вычисления концентрации лиганд-рецепторных комплексов по формуле (3.1) будет не более 4% по сравнению с точной формулой (3.10)?

В данном случае отношение константы диссоциации к концентрации числа мест связывания составляет $1 \text{ нМ}/200 \text{ пМ} = 1 \text{ нМ}/0,2 \text{ нМ} = 5$. На рис. 3.27 из точки $K_d/[R_0] = 5$ проведем вертикальную прямую, параллельную оси ординат. На уровне, соответствующем погрешности 4%, данная прямая пересечет кривую в.

Таким образом, как следует из рис. 3.27, погрешность вычисления по формуле (3.1) вместо формулы (3.10) не превысит 4%, если концентрация добавленного лиганда в пять и более раз превышает концентрацию рецепторов, т.е. концентрация лиганда составляет 1 нМ и более.

Анализ кинетики ассоциации (рис. 3.28) показал, что



Кларк А.
(1885–1941)

Фармаколог. В 1926 г. впервые математически описал лиганд-рецепторное взаимодействие. Создал первую математическую теорию антагонизма. Основные работы посвящены количественному анализу механизмов действия веществ на уровне клеточных рецепторов.

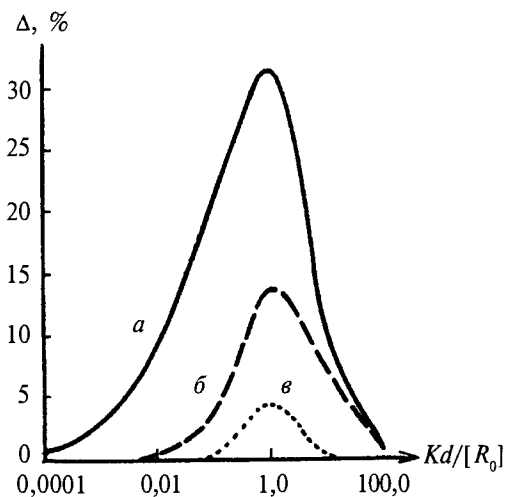


Рис. 3.27. Относительная разница вычисления концентрации лиганд-рецепторных комплексов по формулам (3.1) и (3.10). Концентрация добавленного лиганда превышает концентрацию рецепторов в: 1 (кривая *a*), 2 (кривая *б*) и 5 (кривая *в*) раз [10].

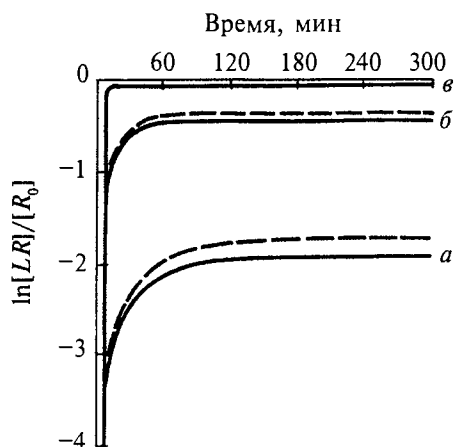


Рис. 3.28. Пример кинетики связывания при расчете по формулам (3.10) (сплошная линия) и (3.1) (штриховая).

Концентрация мест связывания 200 пМ, константа диссоциации 1 нМ, концентрация лиганда 0,2 (кривая *a*), 2 (кривая *б*), 3 (кривая *в*) нМ [10].

аналитически кривые связывания, рассчитанные по формулам (3.1) и (3.10), слабо отличаются.

Однако, как следует из формул (3.1) и (3.10), чем меньше концентрация добавленного лиганда, тем больше время достижения равновесия в системе «лиганд-рецептор». Поэтому при построении графика в координатах Скэтчарда может оказаться так, что равновесие рецепторного связывания достигнуто не во всех точках, использованных для построения графика. При этом график в координатах Скэтчарда отклоняется от прямой линии (рис. 3.29). Данное отклонение аналогично представленному на рис. 3.26, кривая *б*).

Важно запомнить, что в случае, если равновесие по связыванию достигнуто не во всех точках, использованных для построения графика в координатах Скэтчарда, построенный график не является прямой линией. При этом:

1. Чем меньше концентрация добавленного лиганда, тем боль-

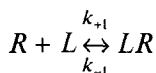
ше отклонение от прямой линии.

2. Полученный в этих условиях график в координатах Скэтчарда проходит ниже прямой линии, проведенной через участки данного графика при достаточно больших концентрациях добавленного лиганда.

Предположение об отсутствии равновесия на момент анализа проверяется постановкой дополнительных экспериментов по связыванию малых концентраций лигандов. Данное предположение подтверждается, если на момент анализа равновесие по изотерме связывания не достигнуто (рис. 3.30, кривая *a*) и опровергается, если равновесие достигнуто (рис. 3.30, кривая *б*).

Концентрация лиганда много меньше концентрации рецепторов

В случае, если концентрация лиганда много меньше концентрации рецепторов, то для схемы



концентрацию рецепторов можно считать постоянной по отношению к концентрации лиганда. Тогда закон действующих масс для данной системы записывается следующим образом:

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[L][R] - k_{-1}[LR] = k_{+1}([L_0] - [LR])[R_0] - k_{-1}[LR].$$

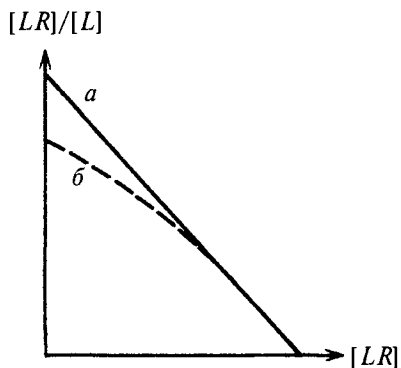


Рис. 3.29. График Скэтчарда для простой модели рецепторного связывания, полученный в равновесных (кривая *a*) и неравновесных (кривая *б*) условиях [10].

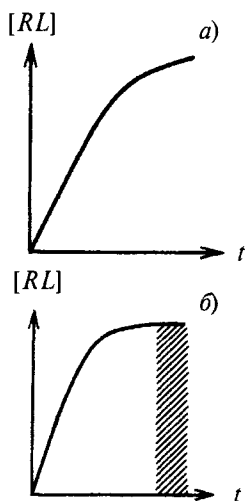


Рис. 3.30. Отсутствие (*a*) и наличие (*б*) (закрашенная область) равновесия в кинетике ассоциации лиганда с рецептором.

Аналогично случаю, рассмотренному в § 3.1, легко получить

$$[LR] = \frac{[R_0][L_0]}{[R_0] + Kd} (1 - \exp[-t(k_{+1}[R] + k_{-1})]) . \quad (3.11)$$

Очевидно, что данный случай аналогичен рассмотренному в § 3.1. Однако в предэкспоненциальный множитель и показатель экспоненты входит не концентрация лиганда, а концентрация рецепторов.

Изменение суммарной концентрации лиганда или рецептора [27] (рис. 3.31)

Как показывают многочисленные исследования, суммарная концентрация связанного и свободного лиганда, связанных и свободных рецепторов в целом ряде случаев оказывается отличной от постоянной. Проводились эксперименты, которые позволили определить основные механизмы изменения концентрации лиганда и рецептора.

Изменение концентрации лиганда может происходить за счет следующих процессов:

1. *Деградация лиганда* (разрушение ферментами). Чаще всего это ферменты, расположенные в цитоплазматической мембране или в микроокружении клетки.

2. *Транспорт лиганда*. Для целого ряда лигандов в цитоплазматической мембране клетки существуют специфические (предназначенные только для данного лиганда) и неспецифические (предназначенные для лигандов сходных типов) белки-переносчики.



Рис. 3.31. Основные процессы, приводящие к изменению суммарной концентрации рецепторов и лигандов.

Эти белки осуществляют транспорт лигандов и (или) продуктов их ферментативной деградации в клетку. Кроме того, некоторые лиганды могут проникать в клетку за счет процессов пиноцитоза (экзоцитоза) или же диффундировать через плазматическую мембрану. И, наконец, концентрация лиганда может уменьшаться за счет процессов интернализации лиганд-рецепторных комплексов (см ниже).

Изменение концентрации рецепторов может происходить за счет следующих процессов:

1. *Интернализация рецепторов или лиганд-рецепторных комплексов.* Для многих рецепторных систем является характерным свойством возможность передвижения рецепторного белка в цитоплазматической мембране. Несколько рецепторных белков, объединяясь вместе, образуют структуры, которые принято называть кластерами. Образовавшиеся кластеры погружаются в клетку путем экзоцитоза. Погружение кластеров в клетку называется интернализацией (рис. 3.32). Окруженные цитоплазматической мембраной рецепторные кластеры называются рецепторосомой. Характерной особенностью данного процесса является возможность интернализации как свободных рецепторов, так и лиганд-рецепторных комплексов.

2. *Деградация рецепторов* происходит в результате присоединения к рецепторосоме лизосомы, содержащей протеолитические ферменты.

3. *Синтез рецепторов de novo* (буквально — заново) происходит в цитоплазме клетки.

4. *Включение вновь синтезированных рецепторов в ци-*

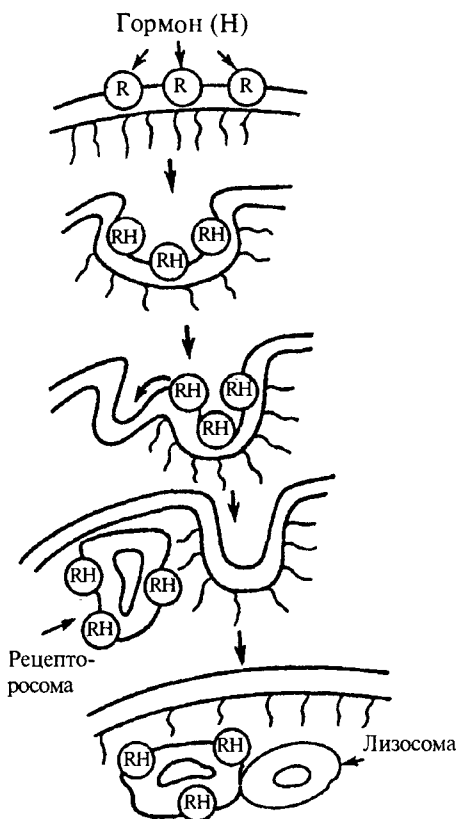
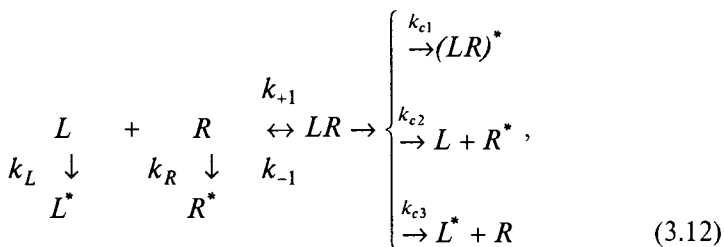


Рис. 3.32. Схема интернализации рецепторов [20].

топлазматическую мембрану чаще всего происходит путем обратного экзоцитоза.

Схематически процессы изменения концентрации лиганда и рецепторов можно представить в виде следующей схемы [27]:



где символом * (звездочка) обозначены продукты деградации или результат интернализации соответствующего компонента. Константа скорости k_L описывает деградацию лиганда, константа k_R — интернализацию свободных рецепторов, константы k_{c1} , k_{c2} и k_{c3} — интернализацию лиганд-рецепторных комплексов, только рецептора или только лиганда из лиганд-рецепторных комплексов.

Запишем, к примеру, закон сохранения вещества для схемы (3.12):

$$\begin{cases} \frac{d[L]}{dt} = -k_L[L] - k_{+1}[L][R] + k_{-1}[LR] - k_{c1}[LR] - k_{c3}[LR] + k_{c2}[LR] \\ \frac{d[R]}{dt} = -k_R[R] - k_{+1}[L][R] + k_{-1}[LR] - k_{c1}[LR] - k_{c2}[LR] + k_{c3}[LR] \\ \frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[L][R] - k_{-1}[LR] - (k_{c1} + k_{c2} + k_{c3})[LR] \end{cases}$$

Решить подобную систему дифференциальных уравнений можно только численно. Воспользуемся аналитическим исследованием поведения подобной системы, проведенным в [27].

Случай *деградации лиганда* представлен на рис. 3.33. При этом в кинетике ассоциации наблюдается возрастание, а затем уменьшение количеств связанных лиганд-рецепторных комплексов. Кривая насыщения, представленная в координатах Скэтчарда, располагается над прямой линией, проходящей через участки кривой, полученной при больших концентрациях лиганда.

Случай *интернализации свободных рецепторов* приведен на рис. 3.34. При этом кинетика ассоциации аналогична случаю деградации лиганда (см. рис. 3.33а), а кривая связывания, представлен-

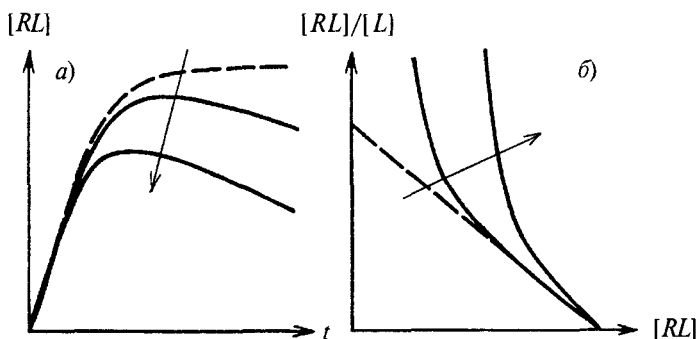


Рис. 3.33. Влияние процесса деградации лиганда на кинетику ассоциации лиганда с рецептором (а) и на поведение кривых насыщения, представленных в координатах Скэтчарда (б).

Штриховая линия — отсутствие процесса деградации, стрелкой обозначено возрастание скорости деградации лиганда.

ная в координатах Скэтчарда, аналогична случаю неравновесного лиганд-рецепторного взаимодействия (см. рис. 3.29).

Случай *интернализации лиганд-рецепторных комплексов* показан на рис. 3.35. Эти зависимости могут носить разнообразный характер, зависящий от того, интернализуется лиганд или рецептор из лиганд-рецепторного комплекса или же интернализуется лиганд-рецепторный комплекс.

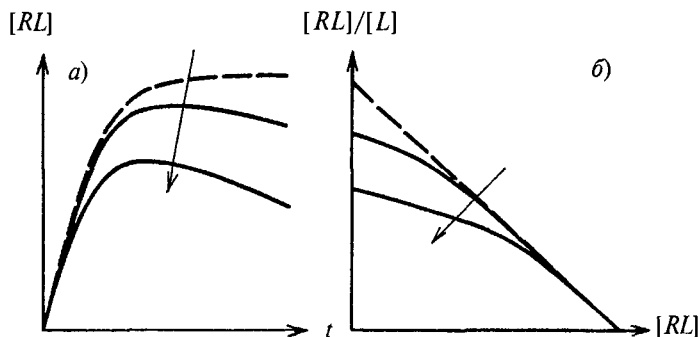


Рис. 3.34. Влияние процесса интернализации свободных рецепторов на кинетику ассоциации лиганда с рецептором (а) и на поведение кривых насыщения, представленных в координатах Скэтчарда (б).

Щтриховая линия — отсутствие процесса интернализации; стрелкой обозначено увеличение скорости интернализации свободных рецепторов.

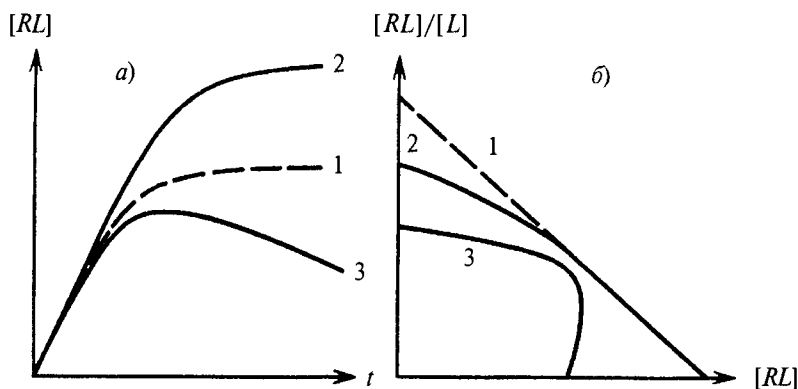


Рис. 3.35. Влияние процесса интернализации лиганд-рецепторных комплексов на кинетику ассоциации лиганда с рецептором (а) и на поведение кривых насыщения, представленных в координатах Скэтчарда (б).

1 — отсутствие процесса интернализации; 2 — интернализация лиганд-рецепторных комплексов или лиганда из лиганд-рецепторных комплексов; 3 — интернализация рецепторов из лиганд-рецепторных комплексов (без лиганда).

Как следует из только что проведенного анализа, определение концентрации рецепторов и их аффинности при наличии процессов изменения суммарной концентрации рецепторов или лигандов сильно затруднено. Это связано с усложнением аналитического вида графика в координатах Скэтчарда и изотермы ассоциации. Поэтому хотелось бы во всех случаях, когда это возможно, избежать изменения концентрации лиганда или рецепторов.

Таблица 3.5

Кинетика ассоциации фактора роста нервов с тромбоцитами

Время лиганд-рецепторного взаимодействия, мин	Концентрация связанного лиганда, cpm
1	6278
2	6871
5	7224
20	7770
30	7851
60	6949
120	6047

Известно, что время полужизни рецепторов составляет в среднем 24 ч [6]. Поэтому при меньшем времени лиганд-рецепторного взаимодействия при проведении экспериментов *in vitro* можно предположить, что процесс изменения концентрации рецепторов не влияет существенным образом на процессы рецепторного связывания. На практике для того чтобы пренебречь процессом изменения суммарной концентрации рецепторов, изучают рецепторное связывание на клеточных мембранах или проводят кинетику связывания не более чем в течение 1–2 ч.

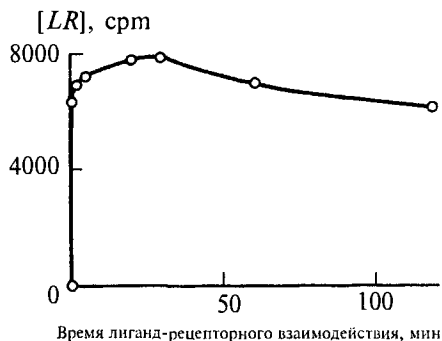


Рис. 3.36. Кинетика ассоциации фактора роста нервов с тромбоцитами.

Пример 3.5. В работе [22] изучали кинетику ассоциации фактора роста нервов с тромбоцитами человека. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 3.5. Наличие какого процесса, помимо процесса рецепторного связывания, можно предположить?

В табл. 3.5 экспериментальные данные о количестве связанного лиганда представлены в *срм*- числе сосчитанных радиоактивных распадов лиганда, связанного с рецептором. Зная удельную радиоактивность лиганда (число распадов на моль вещества), можно перевести эти данные в концентрацию, выраженную в молях вещества.

Кинетика ассоциации фактора роста нервов с тромбоцитами приведена на рис. 3.36. Как видно, количество связанного с тромбоцитами фактора роста нервов вначале возрастает, а затем убывает (существенное изменение концентрации наблюдается примерно через 1 ч инкубации).

Вероятнее всего, уменьшение связывания происходит из-за: а) интернализации рецепторов или лиганд-рецепторных комплексов; б) деградации лиганда. О предположении изменения концентрации рецептора говорит тот факт, что при связывании фактора роста нервов с мембранами мозга (пример 3.1) уменьшения количества связанного фактора роста нервов не наблюдалось.

Дискриминация процессов изменения концентрации лиганда и рецептора

Как было показано выше, многие процессы изменения концентрации рецептора и лиганда приводят к сходным изменениям в кинетике лиганд-рецепторного взаимодействия. Следова-

тельно, только кинетического анализа недостаточно для дискриминации данных процессов, а также для исключения их влияния на определение параметров рецепторного связывания. При этом исключить процесс изменения суммарной концентрации рецепторов за счет уменьшения времени изучения лиганд-рецепторного взаимодействия проще, чем определить механизм изменения концентрации лиганда. Для этого разделим все механизмы, приводящие к изменению концентрации лиганда, на:

1. Механизмы рецепторного связывания.
2. Механизмы ферментативной деградации лиганда.

3. Механизмы внутриклеточного включения лиганда за счет процессов транспорта, экзоцитоза, диффузии или интернализации лиганд-рецепторных комплексов.

Для разграничения процессов, приводящих к изменению суммарной концентрации лиганда, необходимо проведение дополнительных экспериментов (табл. 3.6).

Использование ингибиторов рецепторов (например, конкурентных антагонистов) приведет к уменьшению или ингибированию рецепторного связывания и повлияет на ферментативный распад лиганда только в том случае, если фермент избирательно чувствителен к данному антагонисту. Поэтому чтобы подтвердить, что уменьшение или ингибирование связывания лиганда связано именно с рецепторным механизмом, необходимо использовать различные антагонисты и агонисты рецепторов данного типа, отличающиеся степенью сродства к рецепторам.

Как показывают многочисленные исследования [15, 18 и др.], *связывание рецепторов с ГТФ* приводит к уменьшению аффинности рецепторов и уменьшению рецепторного связывания (только для рецепторов, сопряженных с G-белками).

Разрушение клеток приводит к ингибированию транспорта лиганда или его фрагментов. Однако разрушение клеток достаточно часто меняет характеристики рецепторного связывания.

Использование пептидных фрагментов позволяет уменьшить транспорт лиганда или его фрагментов, если лиганд имеет белковую или пептидную природу. Однако существует опасность, что пептидные фрагменты будут связываться с рецепторами, изменяя характеристики рецепторного связывания.

Использование мембраностабилизаторов и деполимеризаторов позволяет уменьшить процессы транспорта, связанные с пиноцитозом и экзоцитозом, так как в результате применения этих веществ нарушается сборка микротрубочек.

Пермелизаторы увеличивают проницаемость клеточной мем-

Факторы, позволяющие разграничить процессы рецепции, транспорта и деградации лигандов¹

Группа	Фактор	Рецепция	Транспорт	Деградация
Однозначно влияющие факторы	Использование ингибиторов рецепторов ²	↓	—	—
	Использование ГТФ	↓	—	—
	Разрушение клеток	—	↓	—
	Использование пептидных фрагментов	—	↓	—
	Использование мембраностабилизаторов и деполимеризаторов ³	—	↓ ⁶	—
	Использование пермиализаторов ⁴	—	↑	↓
	Использование димеров и D-аналогов лигандов	—	↓	↓
	Использование ингибиторов макроэргов ⁵	—	↓ ⁷	↓ ⁸
	Использование ингибиторов протеолитических ферментов	—	—	↓
Факторы, влияние которых неоднозначно	Использование специфических ионов металлов	+	—	—
	Изменение ионной силы раствора и концентрации белков в растворе	+	+	+
	Изменение pH	+	+	+
	Изменение температуры	+	+	+

Обозначение факторов: — не влияет; + влияние фактора неоднозначно; ↓ приводит к снижению вклада процесса в суммарный эффект; ↑ приводит к увеличению вклада процесса в суммарный эффект.

Примечания:

¹ Идея таблицы принадлежит проф. Зозуле А.А. (Научный центр психического здоровья РАМН).

² Например, конкурентных антогонистов.

³ Например, колхицина.

⁴ Например, дигитоксина, декстран-сульфата.

⁵ Например, азида натрия, обаина, цианистого калия.

⁶ Влияет только на пиноцитоз.

⁷ Влияет только на активный энергозависимый транспорт.

⁸ Влияет только на энергозависимые ферментативные реакции.

браны. Их действие подобно применению взрывчатки для прохождения через стены. В больших количествах пермиализаторы нарушают целостность клеточной стенки.

Использование димеров лигандов было предложено в работе [42]. Авторы показали отсутствие разницы в кинетике связывания мономеров и димеров лигандов опиоидных рецепторов. При этом можно предположить, что транспорт и деградация димеров существенно затруднены по сравнению с мономерами. Примерно тот же результат получается при использовании лигандов, содержащих D-аминокислоты (D-аналоги лигандов).

Ингибиторы макроэргов уменьшают скорость протекания энергозависимых процессов, в частности энергозависимого транспорта и ферментативной деградации.

Ингибиторы протеолитических ферментов уменьшают ферментативную деградацию лиганда. Так, при изучении связывания опиоидных пептидов обычно используется бацитрацин. Однако если ферментов, расщепляющих данный лиганд, много, то все ферменты заингибировать не удастся.

Использование специфических ионов металлов возможно для рецепторов определенного типа. Так, например, ионы N^{i++} связываются только с μ -, а не с δ -опиоидными рецепторами, меняя их аффинность.

Изменение ионной силы раствора или pH, изменение температуры по-разному влияют на процессы транспорта, деградации и рецепторного связывания (см § 3.5).

Таким образом, *разграничение процессов рецепторного и нерепцепторного изменения концентрации добавленного лиганда возможно только на основании дополнительных экспериментов*. Поэтому в дальнейшем будем предполагать, что все отклонения, наблюдаемые в кинетике ассоциации, связаны с рецепторным механизмом (т.е. были проведены дополнительные эксперименты, которые помогли «вычленить» именно рецепторный механизм изменения концентрации лиганда).

Диффузия лиганда

На первых порах явление диффузии лигандов доставляло немало хлопот: не успевал я высадить лиганды в пробирку, как они тут же куда-то исчезали.

Шарль О'Тан

Все рассмотренные до сих пор модели рецепторного связывания предполагали, что все рецепторы одинаково доступны для лиганда. Данное предположение нарушается для внутриклеточных рецепторов. В этом случае доступность рецепторов определяется *скоростью диффузии или массопереноса лиганда*.

Так как число типов известных внутриклеточных рецепторов гораздо меньше, чем число мембранных рецепторов, то в рамках данной книги не будем приводить математический аппарат, позволяющий исследовать поведение подобной рецепторной системы, а сразу же приведем результаты [1, 48] (рис. 3.37).

Как видно, изотерма связывания при наличии процессов диффузии напоминает случай неравновесного лиганд-рецепторного взаимодействия (см. рис. 3.29).

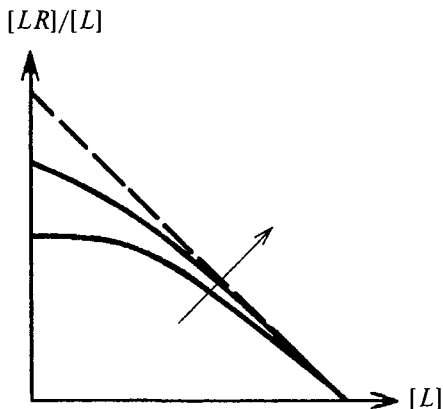
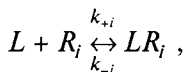


Рис. 3.37. Влияние диффузии лиганда на аналитический вид кривых насыщения, представленных в координатах Скэтчарда.

Штриховая линия — отсутствие процесса диффузии; стрелкой обозначено уменьшение скорости диффузии лиганда.

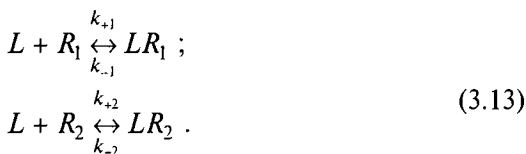
Кинетика ассоциации лиганда с рецептором при наличии нескольких типов связывающих мест

Аналитически данный случай описывается схемой



где R_i — рецептор i -го типа.

Наиболее распространен случай взаимодействия одного лиганда с двумя типами рецепторов:



В простейшем случае, когда концентрация лиганда много больше концентрации рецепторов, закон действующих масс для схемы (3.13) записывается следующим образом:

$$\frac{d[LR_1]}{dt} = k_{+1}[L][R_1] - k_{-1}[LR_1] = k_{+1}[L]([R_{01}] - [L]) - k_{-1}[LR_1];$$

$$\frac{d[LR_2]}{dt} = k_{+2}[L][R_2] - k_{-2}[LR_2] = k_{+2}[L]([R_{02}] - [L]) - k_{-2}[LR_2].$$

Решение данных дифференциальных уравнений аналогично рассмотренному в § 3.1:

$$\begin{aligned} [LR_1] &= \frac{[L][R_{01}]}{L + Kd_1} \{1 - \exp[-t(k_{+1}[L] + k_{-1})]\}; \\ [LR_2] &= \frac{[L][R_{02}]}{L + Kd_2} \{1 - \exp[-t(k_{+2}[L] + k_{-2})]\}. \end{aligned} \quad (3.14)$$

Вид зависимостей (3.14) приведен на рис. 3.38.

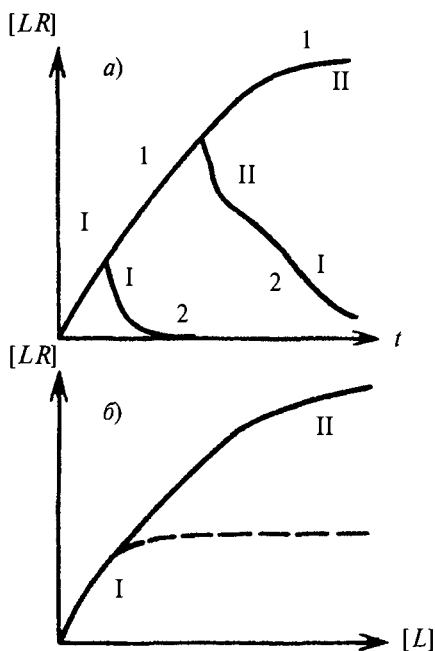


Рис. 3.38. Кинетика ассоциации (а) и насыщения (б) в случае взаимодействия одного лиганда с местами связывания I и II типа.

1 — кинетика ассоциации; 2 — кинетика диссоциации.

В случае наличия нескольких типов связывающих мест анализ экспериментальных данных начинают с определения равновесных параметров связывания.

Для определения равновесных параметров лиганд-рецепторного взаимодействия применяют преобразование Скэтчарда. В случае наличия нескольких типов мест связывания изотерма насыщения, представленная в координатах Скэтчарда, выглядит так, как показано на рис. 3.39.

Анализ Скэтчарда для случая взаимодействия одного лиганда с несколькими типами мест связывания (рецепторов) проводят поэтапно:

1. Проводят асимптоты через участки графика в координатах Скэтчарда, полученные при малых и больших концентрациях добавленного лиганда (рис. 3.39).

2. Определяют точки пе-

ресечения и тангенсы углов наклона этих асимптот.

3. Точка пересечения с осью абсцисс (ось X) асимптоты, проходящей через участки графика, полученного при малых концентрациях лиганда, равна числу мест связывания первого типа (более высокоаффинных участков связывания), $[R_{01}]$.

4. Тангенс угла наклона асимптоты, проведенной через участки графика, полученные при больших концентрациях добавленного лиганда, равен аффинности рецепторов второго типа (менее высокоаффинных), $1/Kd_2$.

5. Абсцисса точки пересечения с осью X асимптоты, проведенной через участки графика Скэтчарда, полученные при больших концентрациях лиганда, равна сумме концентрации мест связывания первого и второго типа. Зная концентрацию мест связывания первого типа, легко определить концентрацию мест второго типа.

6. Тангенс угла наклона асимптоты, проведенной через участки графика, полученные при малых концентрациях добавленного лиганда, равен сумме аффинностей рецепторов первого и второго типа. Зная аффинность мест связывания второго типа, легко определить аффинность мест первого типа.

Пример 3.6. В работе [35] изучали связывание бремазоцина с мембранами головного мозга крыс (табл. 3.7). Определить концентрацию мест связывания и равновесную константу диссоциации бремазоцина с мембранами головного мозга.

Графически экспериментальные данные представлены на рис. 3.40. Проведенный анализ (рис. 3.41) показал наличие излома на кривой Скэтчарда. Следовательно, можно ожидать наличие двух типов связывающих мест. Из графика видно, что концентрация мест связывания первого типа составляет порядка 6 пМ на 1 г мозга, суммарная концентрация мест связывания — 16 пМ на 1 г мозга, следовательно, концентрация мест связывания второго типа — 10 пМ на 1 г мозга. Исходя из тангенсов углов наклона асимптот определяем: $Kd_2 = 0,5$ нМ, $Kd_1 = 0,05$ нМ.

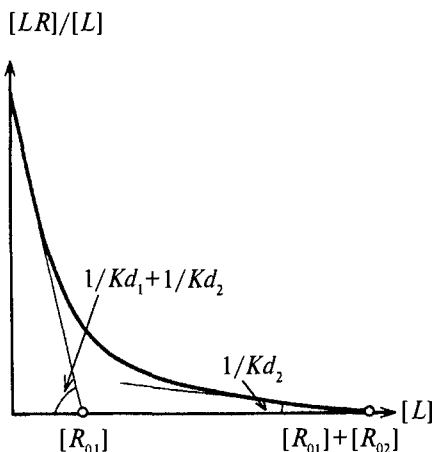


Рис. 3.39. Определение концентрации мест связывания и их аффинности в случае взаимодействия одного лиганда с двумя типами мест связывания.

Связывание бремзацина с мембранами мозга крыс

Количество добавленного лиганда, нМ	Количество связанного лиганда, пМ на 1 г ткани
0,02	1
0,04	1,5
0,08	4
0,12	4,5
0,16	5
0,32	9
0,64	11,7
1	13
1,35	14
2	15

Необходимо запомнить, что в случае наличия нескольких типов мест связывания изотерма насыщения, представленная в координатах Скэтчарда, представляет собой вогнутую параболу.

Для определения кинетических параметров зависимости (3.14) используют один из рассматриваемых ниже методов.

1. Для определения кинетических параметров зависимости (3.14) в самом общем случае перепишем данную зависимость следующим образом:

$$[RL]_{\Sigma} = A_1(1 - \exp[-B_1 t]) + A_2(1 - \exp[-B_2 t]),$$

где

$$A_1 = \frac{[R_{01}][L]}{[L] + Kd_1}; \quad A_2 = \frac{[R_{02}][L]}{[L] + Kd_2};$$

$$B_1 = k_{+1}[L] + k_{-1}; \quad B_2 = k_{+2}[L] + k_{-2}.$$

Пусть для определенности $B_1 > B_2$. Тогда экспоненту с показателем B_1 будем называть «быстрой», а экспоненту с показателем B_2 — «медленной». Введем вспомогательную величину: $[RL]_{\max} = A_1 + A_2$ — максимальную концентрацию лиганд-рецепторных комплексов, наблюдаемую при бесконечно большом времени наблюдения за процессом.

Тогда

$$[LR]_{\max} - [LR]_s = A_1 \exp[-B_1 t] + A_2 \exp[-B_2 t].$$

$[RL]$, пМ на 1 г ткани

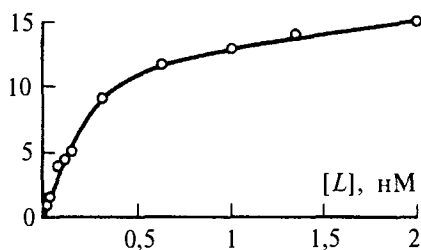


Рис. 3.40. Равновесная кинетика ассоциации бремазоцина с мембранами головного мозга крыс.

$[RL]/[L]$

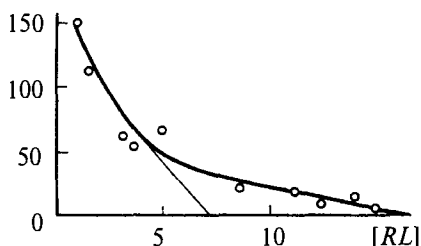


Рис. 3.41. Определение равновесных параметров связывания бремазоцина с мембранами головного мозга.

При больших временах наблюдения за процессом имеет место только «медленная» экспонента

$$\lim_{t \rightarrow \infty} ([LR]_{\max} - [LR]_{\Sigma}) = A_2 \exp[-B_2 t].$$

Параметры этой зависимости определяются в полулогарифмических координатах: вначале по точке пересечения асимптоты с осью Y конечных участков графика зависимости $(\ln([RL]_{\max} - [RL]_e), t)$ определяют величину $\ln A_2$, затем в координатах

$$\left[\ln \left(\frac{[RL]_{\max} - [LR]_{\Sigma}}{A_2} \right), t \right] \text{ по тангенсу угла наклона конечных участ-}$$

ков графика находят B_2 (рис. 3.42)

После того как параметры «медленной» экспоненты определены, для всех времен наблюдения за процессом вычисляют величины $[RL]_s - A_2 \exp[-B_2 t]$. Достаточно очевидно, что

$$[RL]_s - A_2 \exp[-B_2 t] = A_1 (1 - \exp[-B_1 t]).$$

Таким образом, вычисленная величина содержит информацию только о «быстрой» экспоненте, параметры которой определяются аналогично рассмотренному в § 3.1.

2. Если проведены эксперименты по вытеснению меченого лиганда избытком немеченого, то аналогично описанному для случая «один лиганд—один рецептор» (§ 3.1) определяются k_{-1} , k_{-2} . Если из анализа Скэтчарда определены Kd_1 , Kd_2 , то

$$k_{+1} = Kd_1 / k_{-1}; \quad k_{+2} = Kd_2 / k_{-2}.$$

3. Параметры «быстрой» и «медленной» экспоненты определяются специальными регрессионными методами, которые можно

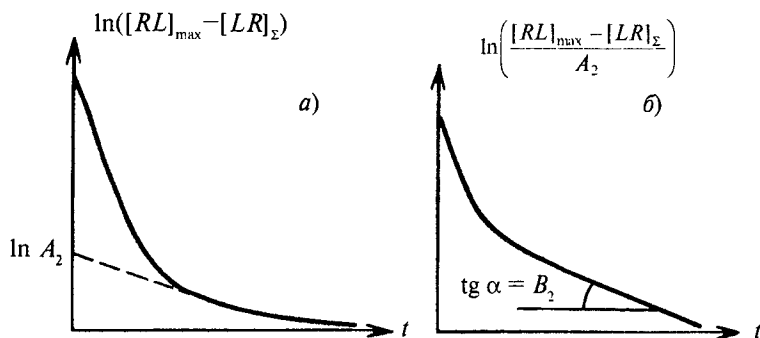


Рис. 3.42. Определение параметров «медленной» экспоненты.

a — определение предэкспоненциального множителя; *б* — определение показателя экспоненты.

найти в статистических программных пакетах для ЭВМ, например SPSS, Statistica for Windows, BMDP и др.

Необходимо запомнить, что *максимальное число типов мест связывания не превышает числа экспонент, аппроксимирующих данные по кинетике ассоциации лиганда с рецептором*. При этом на каждую экспоненту должно приходиться не менее 5–7 экспериментальных точек. Таким образом, для определения двух экспонент (двух типов мест связывания) необходимо не менее 12–14 экспериментальных точек, для определения трех типов мест связывания (трех экспонент) необходимо не менее 17–21 точки и т.д.

Связывание нескольких молекул лиганда с одной молекулой рецептора.

Кооперативное лиганд-рецепторное взаимодействие

Связывание нескольких молекул лиганда с одной молекулой рецептора называется **кооперативным**, если сродство рецептора к каждой последующей молекуле лиганда меняется. Кооперативное связывание называется связыванием с *положительной кооперативностью*, если сродство к каждой последующей молекуле лиганда возрастает. Если же сродство к каждой последующей молекуле лиганда убывает, то говорят об *отрицательной кооперативности*.

Понятие «кооперативность» было введено в 1910 г. А. Хиллом. Хилл изучал связывание кислорода с гемоглобином и постулировал, что гемоглобин может связать несколько молекул кислорода. Для анализа взаимо-

действий подобного рода Хилл предложил специальные координаты (см. ниже). В 1922 г. за исследования в области механизмов дыхания А. Хилл получил Нобелевскую премию.

Модель кооперативного взаимодействия Хилла является наиболее простой. В ферментативной кинетике (гл. 2) была рассмотрена более сложная модель — модель Моно-Уаймена-Шанжё. Ниже приведен кинетический анализ для наиболее простой модели.

Кооперативное лиганд-рецепторное взаимодействие можно описать при помощи следующей схемы:



Схема (3.15) учитывает «симметрию» молекулы рецептора: ассоциация лиганда может произойти с одним из двух мест связывания. Точно так же диссоциация лиганда из сложных лиганд-рецепторных комплексов — L_2R — может идти по любому месту связывания.

Закон действующих масс для схемы (3.15) записывается следующим образом:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{d[L]}{dt} &= -2k_{+1}[L][R] + k_{-1}[LR] - k_{+2}[LR][L] + 2k_{-2}[L_2R] \\ \frac{d[R]}{dt} &= -2k_{+1}[L][R] + k_{-1}[LR] \\ \frac{d[LR]}{dt} &= 2k_{+1}[L][R] - k_{-1}[LR] - k_{+2}[L][LR] + 2k_{-2}[L_2R] \\ \frac{d[L_2R]}{dt} &= k_{+2}[LR][L] - 2k_{-2}[L_2R] \end{aligned} \right. \quad (3.15')$$

В общем случае данные уравнения могут быть решены только численно. Приведем решения для случая, когда начальная концентрация лиганда много больше концентрации рецепторов:

1. Для простых лиганд-рецепторных комплексов

$$[LR] = [LR]^{равн} - E \exp[-\beta_1 t] - F \exp[-\beta_2 t] ;$$

$$[LR]^{равн} = \frac{[R_0][L]}{[L] + [L]^2 / Kd_2 + Kd_1 / 2} .$$

2. Для сложных лиганд-рецепторных комплексов

$$[L_2R] = [L_2R]^{равн} - E_1 \exp[-\beta_1 t] - F_1 \exp[-\beta_2 t];$$

$$[L_2R]^{равн} = \frac{[L]}{2Kd_2} [LR]^{равн}.$$

3. Для суммарной концентрации рецепторных комплексов

$$[LR]_s = [LR] + 2[L_2R],$$

где

$$2\beta_{1,2} = (2k_{+1} + k_{+2})L + k_{-1} + k_{-2} \pm$$

$$\pm \sqrt{(2k_{+1}L + k_{+2}L + k_{-1} + 2k_{-2})^2 - 8(k_{+1}k_{+2}L^2 + 2k_{-2}k_{+1}L + k_{-1}k_{-1})}.$$

На основании данного решения уравнения (3.15') возможно

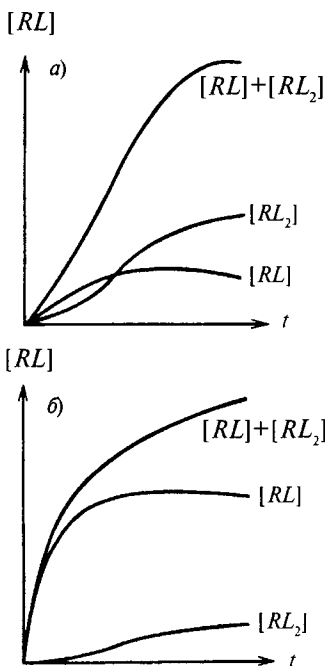


Рис. 3.43. Кинетика ассоциации лиганда с рецептором в случае положительной (а) и отрицательной (б) кооперативности.

определение кинетических констант, однако это весьма трудоемкий процесс. Детально он рассмотрен в [7]. Ограничимся приведением графиков зависимостей концентрации лиганд-рецепторных комплексов от времени лиганд-рецепторного взаимодействия для случая положительной (рис. 3.43а) и отрицательной (рис. 3.43б) кооперативности [1].

Так как определение кинетических параметров при наличии кооперативного лиганд-рецепторного взаимодействия затруднено, во многих экспериментах изучают равновесные параметры рецепторного связывания.

Аналитический вид графиков в координатах Скэтчарда для случая кооперативного связывания приведен на рис. 3.44. Величина γ (кажущаяся степень кооперативности) определяется как отношение констант диссоциации: $\gamma = Kd_2/Kd_1$. Таким образом, при $\gamma < 1$ наблюдается отрицательная кооперативность, а при $\gamma > 1$ — положительная.

Абсцисса точки пересечения с

осью X изотермы ассоциации, представленной в координатах Скэтчарда, равна концентрации мест связывания. Аффинность рецепторов может быть определена лишь с помощью координат Хилла (см. ниже).

Как видно из рис. 3.44, в случае отрицательной кооперативности аналитический вид графика в координатах Скэтчарда неотличим от случая взаимодействия одного лиганда с несколькими типами мест связывания. Различить эти два случая удастся только с помощью координат Бьеррума (см. ниже).

Необходимо запомнить, что только в случае положительной кооперативности в кинетической кривой насыщения, представленной в координатах Скэтчарда, есть возрастающий участок. Ни одна другая модель рецепторного связывания не приводит к появлению возрастающего участка изотермы насыщения, представленной в координатах Скэтчарда.

Анализ в случае наличия кооперативного связывания может быть сильно упрощен, если предположить, что кооперативное лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой



Заметим, что схема (3.16) верна только для случая сильно выраженной положительной кооперативности. При этом число n называют [истинной] степенью кооперативности. При условии избытка концентрации лиганда закон действующих масс для схемы (3.16) записывается следующим образом:

$$\frac{d[L_n R]}{dt} = k_{+1}[L]^n([R_0] - [L_n R]) - k_{-1}[L_n R].$$

Решение данного уравнения:

$$[L_n R] = \frac{[L]^n [R_0]}{[L]^n + K_d} (1 - \exp[-t(k_{+1}[L]^n + k_{-1})]). \quad (3.16')$$

При этом график в координатах Скэтчарда для схемы (3.16) аналогичен случаю положительной кооперативности на рис. 3.44.

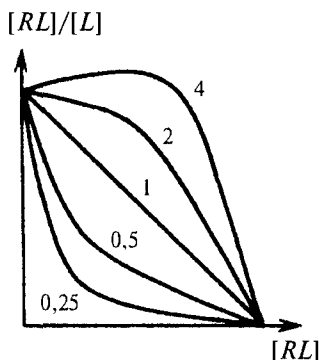


Рис. 3.44. Аналитический вид графика в координатах Скэтчарда в зависимости от кажущейся степени кооперативности (обозначена цифрами).

Дискриминация моделей рецепторного связывания

Будти мудры, как змии, и просты, как голуби.

Евангелие от Матфея

Как следует из проведенного в настоящей главе анализа, любое отклонение графика в координатах Скэтчарда от прямой линии означает, что лиганд-рецепторное взаимодействие идет по более сложной схеме, чем «один лиганд-один некооперативный рецептор». Поэтому координаты Скэтчарда достаточно часто используются для дискриминации моделей рецепторного связывания.

На рис. 3.45 приведены наиболее типичные кривые насыщения, представленные в координатах Скэтчарда, для различных моделей рецепторного связывания. Как видно из рисунка, координаты Скэтчарда позволяют определить сложный характер лиганд-рецепторного взаимодействия, но зачастую не позволяют определить ту модель рецепторного связывания, которая позволяет наилучшим образом описывать экспериментальные данные. Поэтому для определения модели рецепторного связывания используют другие координатные методы. Рассмотрим только два дополнительных метода преобразования координат Хилла и Бьеррума.

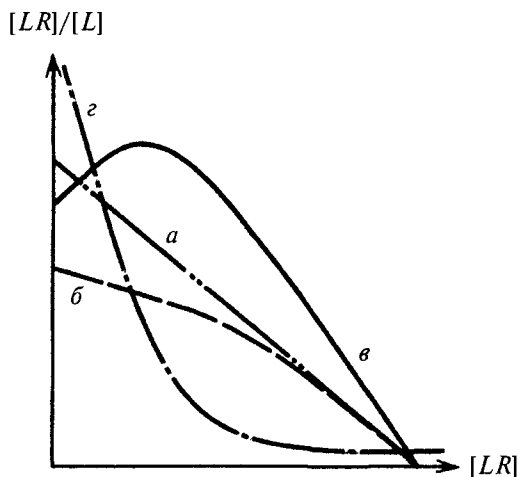


Рис. 3.45. Аналитический вид графиков в координатах Скэтчарда для различных моделей лиганд-рецепторного взаимодействия.

а — один лиганд — один некооперативный рецептор; *б* — связывание в неравновесных условиях; *в* — случаи положительной кооперативности; *г* — наличие двух типов связывающих мест или отрицательной кооперативности.

Метод преобразования координат Хилла

Анализ кооперативных лиганд-рецепторных взаимодействий, а также различных случаев, подозреваемых в кооперативном связывании, следует проводить в координатах Хилла (Хилл, 1910) [37].

Переход к координатам Хилла можно получить на основании схемы (3.16). Для этого запишем закон сохранения вещества для этой схемы в условиях равновесия:

$$0 = \frac{d[L_n R]}{dt} = k_{+1}[L]^n[R] - k_{-1}[L_n R];$$

$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{1}{Kd} = \frac{[L_n R]}{[R][L]^n};$$

$$\frac{[L_n R]}{[R]} = \frac{[L_n R]}{[R_0] - [L_n R]} = \frac{[L]^n}{Kd};$$

$$\log \frac{[L_n R]}{[R_0] - [L_n R]} = \log \frac{[L]^n}{Kd}.$$

И окончательно

$$\log \frac{[L_n R]}{[R_0] - [L_n R]} = n \log [L] - \log Kd. \quad (3.17)$$

Таким образом, график в координатах

$$\left(\log \frac{[L_n R]}{[R_0] - [L_n R]}, \log [L] \right)$$

(координаты Хилла) представляет собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным степени кажущейся кооперативности (γ) (рис. 3.46).

Заметим, что в случае *положительной кооперативности* $\gamma \leq n$. Значения γ , меньшие n , могут наблюдаться, если не все места связывания на рецепторе ассоциированы с лигандом. В случае *отрицательной кооперативности* $\gamma \approx 1/n$. При этом значения γ , определенные с помощью координат Хилла с точностью до погрешности вычисления, совпадают со значениями γ , определенными с помощью метода Скэтчарда (степень отклонения от прямой линии — см. рис. 3.44).

Необходимо запомнить, что, как следует из уравнения (3.17) и только что проведенных рассуждений, тангенс угла наклона изотермы насыщения, представленной в координатах Хилла,

$$\log [L_n R]/([R_0] - [L_n R])$$

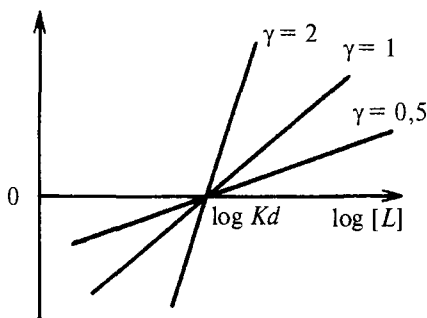


Рис. 3.46. Метод преобразования координат Хилла.

сов. Если лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой (3.15), то точка пересечения графика с осью абсцисс примерно равна константе диссоциации.

Координаты Хилла позволяют практически во всех случаях достоверно определить наличие положительной кооперативности. Случай с $\gamma < 1$ может быть как при наличии отрицательной кооперативности, так и при наличии нескольких типов мест связывания. Для того чтобы дискриминировать эти два случая, используются координаты Бьеррума.

Метод преобразования координат Бьеррума

Координаты Бьеррума были уже описаны при рассмотрении рН-зависимостей титрования многоосновных кислот и оснований (см. § 1.4).

В случае лиганд-рецепторного взаимодействия переход к координатам Бьеррума может быть получен на основании следующих соображений. Пусть лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой (3.2): $L + R \leftrightarrow LR$. Тогда в условиях равновесия концентрация лиганд-рецепторных комплексов равна (3.1):

$$[LR] = \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd},$$

откуда

$$y = \frac{[LR]}{[R_0]} = \frac{[L]}{Kd + [L]}.$$

равен кажущейся степени кооперативности (γ). При $\gamma > 1$ говорят о *положительной кооперативности*, при $\gamma < 1$ — об *отрицательной кооперативности* и при $\gamma \approx 1$ — об *отсутствии кооперативных взаимодействий*. В случае, если лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой (3.16), абсцисса точки пересечения графика с осью X равна логарифму равновесной константы диссоциации лиганд-рецепторных комплексов.

Величина y называется *степенью насыщения*:

$$[L] + Kd = \frac{[L]}{y};$$

$$Kd = \frac{[L]}{y} - [L] = \frac{[L](1 - y)}{y};$$

$$\log Kd = \log [L] + \log \frac{1 - y}{y};$$

$$-\log [L] = -\log Kd + \log \frac{1 - y}{y}.$$

Полученное после преобразований уравнение напоминает известное из гл. 1 уравнение Хендерсона-Хассельблаха:

$$pC = pK + \lg \frac{1 - y}{y}.$$

Переход к координатам Бьеррума ($y, \log L$) или $(\log y, \log L)$ описывается уравнением

$$-\log [L] = -\log Kd + \log \frac{1 - y}{y}. \quad (3.18)$$

Число перегибов в этих координатах равно числу типов мест связывания. Абсцисса проекции точки перегиба на ось Х равна логарифму константы диссоциации (рис. 3.47). Следует заметить, что метод преобразования координат Бьеррума позволяет определить несколько типов связывающих мест, если их константы диссоциации отличаются не менее чем в 5–10 раз. При этом чем больше отличие в концентрации мест связывания, тем более необходимы большие отличия в константах диссоциации.

Так, например, при одинаковой концентрации связывающих мест для появления двух перегибов

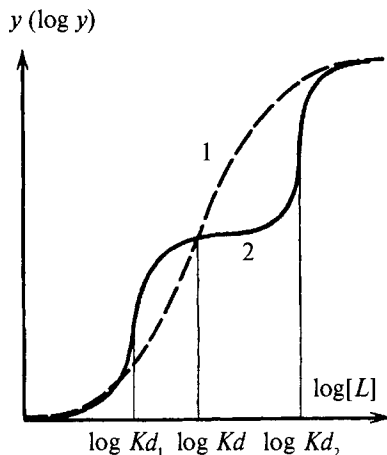


Рис. 3.47. Аналитический вид кривых насыщения, представленных в координатах Бьеррума при наличии одного (1) и двух (2) типов связывающих мест.

в координатах Бьеррума достаточно отличия констант диссоциации в 5 раз. Если концентрация мест связывания одного типа в 2 раза превосходит концентрацию мест связывания другого типа, то необходимо отличие констант диссоциации в 10 раз.

Обычно концентрации мест связывания отличаются на порядок и более. Следовательно, для обнаружения двух перегибов в координатах Бьеррума необходимо отличие констант диссоциации на два и более порядка. Такое отличие редко наблюдается в реальных исследованиях. Поэтому использование координат Бьеррума ограничено.

Следует заметить, что чувствительность координат Бьеррума может быть существенным образом улучшена за счет использова-

ния координат $\left(\frac{dy}{d \log L}, \log L \right)$. Число максимумов в этих коорди-

натах соответствует числу перегибов в координатах Бьеррума. При этом основное влияние на точность использования данных координат оказывает метод вычисления производной. В простейшем случае производная оценивается методом конечных разностей:

$$\frac{dy}{d \log L} \approx \frac{y_i - y_j}{\log L_i - \log L_j}, i \neq j.$$

Более точная оценка производной может быть получена с помощью метода сплайн-интерполяции, не рассматриваемого в настоящей книге. Данный метод позволяет построить наиболее гладкую кривую, проходящую через все экспериментальные точки. При этом в процессе построения этой кривой вычисляются значения коэффициентов сплайнового многочлена, которые равны производной функции в точке.

Таким образом, *наиболее сложной представляется дискриминация между случаем отрицательной кооперативности и связывания лиганда с двумя типами мест связывания.*

Вопрос в пользу наличия двух типов связывающих мест может быть решен положительно при условии наличия двух перегибов в координатах Бьеррума. При этом открытым остается вопрос: обладают ли эти типы связывающих мест кооперативными свойствами?

Аналитическое исследование показало, что тангенс угла наклона графика в координатах Хилла, меньший единицы, не означает наличия случая отрицательной кооперативности. Такой же график может наблюдаться при условии наличия двух типов связывающих мест с близкими значениями констант диссоциации (отличающимися меньше чем на порядок). Поэтому координаты Хилла для дискриминации случая отрицательной кооперативно-

сти и наличия нескольких типов связывающих мест неприменимы.

В ряде случаев определенную информацию можно получить из кинетики ассоциации лиганда с рецептором. Наличие двух экспонент в кинетике свидетельствует о наличии двух типов связывающих мест. При этом вопрос о кооперативных свойствах этих рецепторов остается открытым.

Результаты графического анализа можно дополнить специальными математическими методами, требующими сложных вычислений и реализованных с помощью компьютерных программ. Основы одного из таких методов — метода имитационного моделирования — рассматриваются ниже, в § 3.8.

С нашей точки зрения, *наиболее информативным методом дискриминации кооперативного связывания и взаимодействия лиганда с двумя типами рецепторов является метод параллельного определения характеристик связывания и клеточных функций* (рис. 3.48). При этом для кооперативного связывания характерно наличие стадии индукции. В случае наличия двух типов связывающих мест возможно «разнознаковое» влияние на клеточную функцию (см. также рис. 3.21).

Следует заметить, что выбирать надо клеточную функцию, максимально «приближенную» к рецептору, потому что каскадные механизмы проведения и усиления сигнала сами могут обладать кооперативными свойствами (см. § 3.2). Для G-сопряженных рецепторов наиболее оптимальным является измерение уровня цАМФ.

Заключение

Как следует из проведенного анализа, для определения концентрации рецепторов, их аффинности, константы скорости ассоциации и модели рецепторного связывания используются различные координатные методы. Суммируя их, можно сделать ряд важных выводов:

1. *Константа скорости ассоциации (диссоциации)* определяется

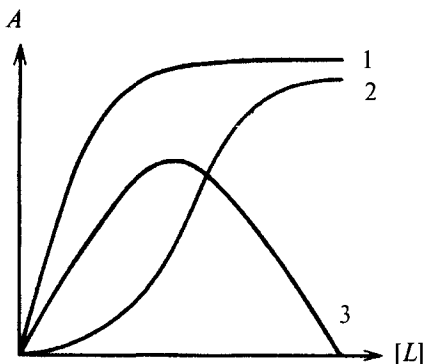


Рис. 3.48. Связь величины клеточного ответа (A) и концентрации добавленного лиганда.

1 — некооперативное связывание; 2 — кооперативное связывание; 3 — «разнознаковое» влияние лиганда на клеточную функцию.

по тангенсу угла наклона кривой связывания, представленной в полулогарифмических координатах, если лиганд-рецепторное взаимодействие не является кооперативным.

2. *Суммарная концентрация мест связывания* равна абсциссе точки пересечения с осью X кривой насыщения, представленной в координатах Скэтчарда. Концентрация мест связывания определяется тем точнее, чем больше экспериментальных данных использовано для вычисления точки пересечения изотермы насыщения с осью абсцисс. Если имеется несколько типов связывающих мест, то их концентрация определяется по точкам пересечения с осью абсцисс асимптот, проведенных через участки изотермы связывания, полученные при малых и больших концентрациях добавленного лиганда (см рис. 3.39).

3. *Аффинность рецепторов* определяется:

— в координатах Скэтчарда в случае наличия некооперативного связывания — по тангенсу угла наклона кривой насыщения или асимптот, проведенных к участкам изотермы, полученным при малых и больших концентрациях добавленного лиганда (см. рис. 3.14 и 3.39);

— в координатах Хилла, если лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой (3.16): $R + nL \leftrightarrow L_nR$. При этом константа диссоциации равна логарифму точки пересечения изотермы насыщения с осью абсцисс (ось X) (см. рис. 3.46). Для всех остальных типов лиганд-рецепторного взаимодействия данный способ определения константы диссоциации является *приблизительным*.

— в координатах Бьеррума для любой модели рецепторного связывания константа диссоциации равна логарифму абсциссы точки перегиба изотермы связывания (см. рис. 3.47).

4. Рассмотренные координатные методы могут быть успешно использованы для *дискриминации моделей рецепторного связывания* (табл. 3.8).

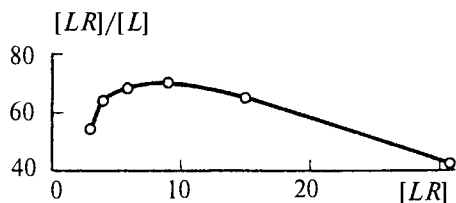


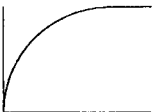
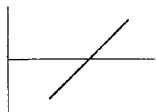
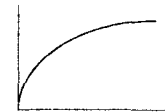
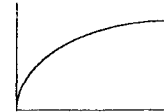
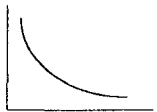
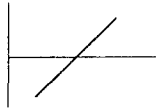
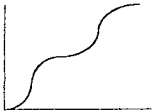
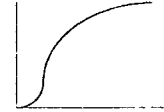
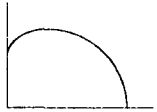
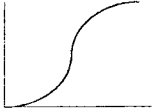
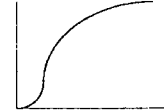
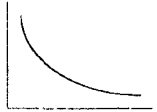
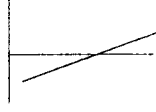
Рис. 3.49. Анализ взаимодействия налоксона с мембранами мозга крыс (анализ Скэтчарда).

Пример 3.7. В работе [32] изучали связывание налоксона с мембранами мозга крыс. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.9. Определить модель рецепторного связывания и параметры рецепторного связывания.

На рис. 3.49 экспериментальные данные, описывающие связывание налоксона с мем-

Таблица 3.8

Дискриминация основных моделей рецепторного связывания

№ п/п	Модель	$([RL], r)$	$([RL], [L])$	Координаты Скэтчарда	Координаты Хилла	Координаты Бьеррума
1	Один лиганд— один рецептор (равновесие)					
2	Один лиганд— два рецептора					
3	Положительная кооперативность					
4	Отрицательная кооперативность					

Связывание налоксона с мембранами мозга крыс

Концентрация добавленного лиганда, нМ	Концентрация связанного лиганда, фм на 1 мг ткани
54,5	3
62,5	4
90,9	6
128,6	9
233	15
672	30,9

бранами мозга крыс, представлены в координатах Скэтчарда. График отклоняется от прямой линии. При этом на графике есть возрастающий участок.

Можно предположить, что налоксон связывается с мембранами мозга с положительной кооперативностью. Определить концентрацию мест связывания не удастся, так как отсутствуют данные, позволяющие определить точку пересечения графика с осью абсцисс.

В координатах Хилла (рис. 3.50а) предположение о наличии положительной кооперативности подтверждается: угол наклона равен 0,7 рад. Следовательно, кажущаяся степень кооперативности g равна $\gamma = \text{arctg}(0,7) = 1,6$. Точка пересечения графика с осью абсцисс равна $\log(2,5 \text{ нМ})$. Следовательно, $K_d = 3,2 \text{ нМ}$.

Аналогичное значение для K_d определяется из координат Бьеррума (рис. 3.50б). Эти координаты не позволяют предположить наличие более чем одного типа мест связывания.

Пример 3.8. В работе [35] изучали связывание [D-Ala-2,D-Leu-5]энкефалина (ДАДЛЭ) с мембранами головного мозга крыс. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.10. Определить модель параметров рецепторного связывания.

Кривая насыщения, представленная в координатах Скэтчарда, имеет

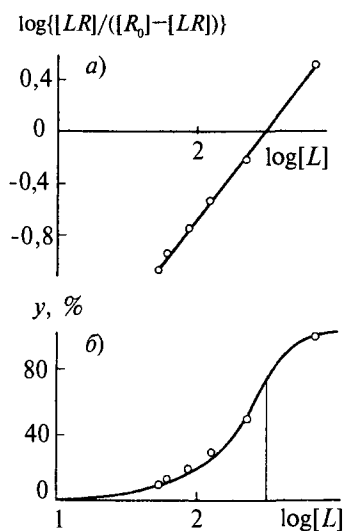


Рис. 3.50. Анализ взаимодействия налоксона с мембранами мозга крыс. Координаты Хилла (а) и Бьеррума (б).

Связывание ДАДЛЭ с мембранами мозга крыс

Количество добавленного лиганда, нМ	Количество связанного лиганда, пм на 1 г ткани
0,5	2,5
1	4
15	8
20	14
35	16
100	17

нелинейный вид (рис. 3.51). Проведя асимптоту через участки графика, полученные при больших концентрациях добавленного лиганда, можно оценить суммарное число мест связывания как 17–18 пм на 1 г ткани.

Исходя из вида кривой насыщения, представленной в координатах Скэтчарда, можно предположить, что ДАДЛЭ или взаимодействует с двумя типами связывающих мест, или имеется связывание ДАДЛЭ мембранами мозга с отрицательной кооперативностью. Как было указано выше, координаты Хилла не позволяют дискриминировать эти два случая. Поэтому представим изотерму связывания в координатах Бьеррума (рис. 3.52). Исходя из вида графика в этих координатах нельзя предположить существование более чем одного типа мест связывания. По точке перегиба $\log(1,3 \text{ нМ})$ определяем константу диссоциации (20 нМ).

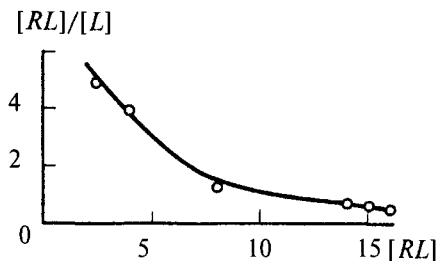


Рис. 3.51. Координаты Скэтчарда в случае взаимодействия ДАДЛЭ с мембранами мозга крыс.

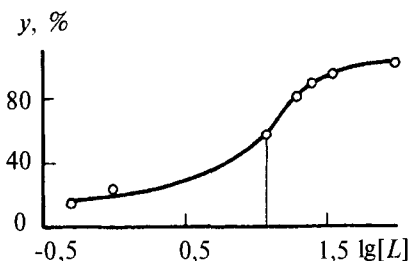


Рис. 3.52. Анализ Бьеррума для случая взаимодействия ДАДЛЭ с мембранами мозга крыс.

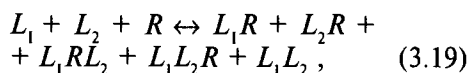
КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные предпосылки модели лиганд-рецепторного взаимодействия, описываемой схемой (1.2) и уравнением (1.1)? Какие из этих предположений могут нарушаться? 2. Выведите уравнение, описывающее концентрацию лиганд-рецепторных комплексов в зависимости от количества добавленного лиганда, если концентрации лиганда и рецептора соизмеримы? Как определять параметры рецепторного связывания в этом случае? Приводит ли изменение концентрации лиганда за счет лиганд-рецепторного взаимодействия к изменению аналитического вида графиков, построенных в координатах Скэтчарда? 3. Какие изменения наблюдаются в графиках, построенных в координатах Скэтчарда, при отсутствии равновесия в системе «лиганд-рецептор»? 4. Какие характерные изменения наблюдаются в кинетике лиганд-рецепторного взаимодействия, если изменяется суммарная концентрация лиганда или рецепторов? За счет каких процессов это может происходить? 5. Как можно разграничить процессы рецепторного связывания, транспорта и деградации лиганда? 6. Какие изменения в кинетике связывания наблюдаются при наличии двух типов мест связывания? 7. Дайте определение понятию «кооперативность». Какие виды кооперативного лиганд-рецепторного взаимодействия вы знаете? 8. Выведите уравнение для преобразований Хилла. 9. Как с помощью координат Хилла определять степень кооперативности? Сравните понятия «степень кооперативности» и «кажушаяся степень кооперативности». 10. Выведите уравнение для преобразований Бьеррума. Как определять число мест связывания в координатах Бьеррума? 11. Как с помощью координатных методов определить модель лиганд-рецепторного взаимодействия? 12. Как определяются основные кинетические и равновесные параметры рецепторного связывания?

3.4. Взаимодействие нескольких лигандов с одним центром связывания

До сих пор предполагалось, что с рецептором или рецепторами различных типов связывается один тип лигандов. Данное предположение верно лишь при ряде исследований, проводимых *in vitro*. Однако, как будет показано далее, оно нарушается при проведении радиорецепторных исследований и (или) при определении константы диссоциации конкурентными методами. Кроме того, *in vivo* в микроокружении рецепторов одного типа, как правило, существует достаточно большое количество разнообразных лигандов, отличающихся по степени сродства и специфичности к данному типу рецепторов.

Рассмотрим только случаи взаимодействия двух типов лигандов с одним типом мест связывания. Предположим, что два лиганда взаимодействуют с одним рецептором, связываясь с одним и тем же или разными участками рецепторной молекулы, а также друг с другом. При этом самую общую схему такого взаимодействия можно представить в следующем виде:



где L_1 и L_2 — лиганды различных типов, образующие с рецептором R комплексы произвольной стехиометрии, а также лиганд-лигандный комплекс (продукт реакции лигандов двух типов) L_1L_2 .

Выделяют следующие виды взаимодействия нескольких лигандов с одним типом рецепторов.

1. По конкуренции за места связывания:

а) *неконкурентным*. Связывание нескольких лигандов происходит с несколькими различными местами связывания на одном и том же рецепторе;

б) *конкурентным*. Несколько лигандов связываются с одним и тем же местом связывания на рецепторе;

в) *бесконкурентным*. Лиганд второго типа взаимодействует не с рецепторами, а с комплексами, образованными лигандом первого типа с рецептором.

2. По изменению аффинности рецепторов:

а) *без изменения аффинности рецепторов*. Связывание лигандов одного вида не приводит к изменению аффинности рецепторов к лигандам других видов.

б) *с изменением аффинности*. Связывание одного или нескольких лигандов приводит к изменению сродства рецептора к остальным лигандам.

3. По наличию взаимодействия между лигандами

а) *без взаимодействия*. Добавленные в инкубационную среду лиганды не взаимодействуют между собой; их концентрация может



Зайцев С.В.

Физикохимик, биохимик. Работает в области физико-химической биологии. Совместно с С.Д. Варфоломеевым развил теорию молекулярной рецепции, исследовал свойства нейропептидоморфиновых (опиатных) рецепторов.

изменяться только за счет процессов лиганд-рецепторного взаимодействия*;

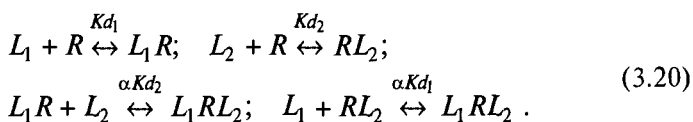
б) с *взаимодействием*. В этом случае концентрация добавленных лигандов может уменьшаться за счет химической реакции между ними. Этот механизм взаимодействия лигандов получил название «химического антагонизма» [1].

Заметим, что также возможно наличие нескольких из перечисленных механизмов взаимодействия лигандов.

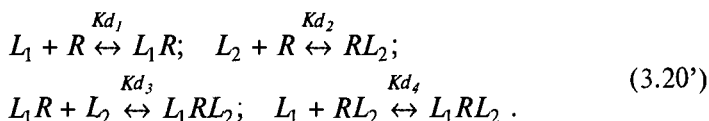
Рассмотрим только случаи «классического» взаимодействия двух лигандов с одним типом рецепторов: неконкурентное, конкурентное и бесконкурентное связывание. Более сложные модели взаимодействия двух лигандов с одним рецептором можно найти в [1, 2].

Неконкурентное связывание лигандов

При неконкурентном связывании два лиганда взаимодействуют с разными участками связывания одного и того же рецептора согласно схеме



Заметим, что схема (3.20) может быть заменена абсолютно идентичной ей схемой, содержащей три константы:



Первые два уравнения схемы (3.20), описываемые константами Kd_1 и Kd_2 , характеризуют связывание лигандов первого и второго типа с нативными рецепторами. Третье уравнение схемы (3.20) описывает связывание лигандов второго типа с лиганд-рецепторными комплексами $L_1 R$. Заметим, что при этом число мест связывания и механизм связывания второго лиганда может быть отличен от первого лиганда. Если $Kd_1 = Kd_3$, то неконкурентное связывание протекает *без изменения аффинности* рецепторов, иначе неконкурентное взаимодействие двух лигандов с

* Реально, помимо процессов рецепторного связывания, может наблюдаться транспорт лигандов и их расщепление (инактивация, спонтанная или ферментативная). Эти вопросы рассмотрены выше, в § 3.3.

одним рецептором протекает с изменением его *аффинности*. И наконец, четвертое уравнение схемы (3.20) описывает связывание лиганда первого типа с лиганд-рецепторными комплексами RL_2 . Если $Kd_2 = Kd_4$, то данное связывание протекает без изменения аффинности рецепторов, иначе — с изменением.

Запишем закон действующих масс для схемы (3.20) в равновесных условиях:

$$\left\{ \begin{array}{l} Kd_1 = \frac{[L_1][R]}{[L_1R]} = \frac{[L_1]([R_0] - [L_1R] - [L_1RL_2])}{[L_1R]} \\ Kd_2 = \frac{[L_2]([R_0] - [RL_2] - [L_1RL_2])}{[RL_2]} \\ Kd_3 = \frac{[L_2][L_1R]}{[L_1RL_2]} \\ Kd_4 = \frac{[L_1][RL_2]}{[L_1RL_2]} \end{array} \right. \quad (3.21)$$

Система уравнений (3.21) является линейной алгебраической системой. Ее решение легко может быть получено с помощью метода Крамера. Однако полученное решение практически ничего не дает для анализа неконкурентного взаимодействия двух лигандов. Поэтому на практике редко используют решение системы (3.21), чаще пользуясь методом двойных обратных координат.

Метод двойных обратных координат

Анализ связывания двух лигандов с одним рецептором чаще всего проводят в двойных обратных координатах ($1/LR$, $1/L$).

Переход к двойным обратным координатам можно получить на основании следующих рассуждений. Пусть лиганд-рецепторное взаимодействие идет по схеме (3.2): $L + R \leftrightarrow LR$. Тогда в условиях равновесия (см. уравнение 3.1)

$$[LR] = \frac{[L][R_0]}{[L] + Kd}.$$

Или

$$[LR] = \frac{[L][R_0]}{[L] + Kd}. \quad (3.22)$$

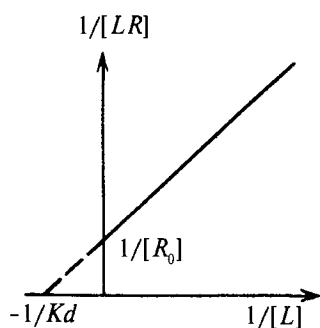


Рис. 3.53. Метод двойных обратных координат.

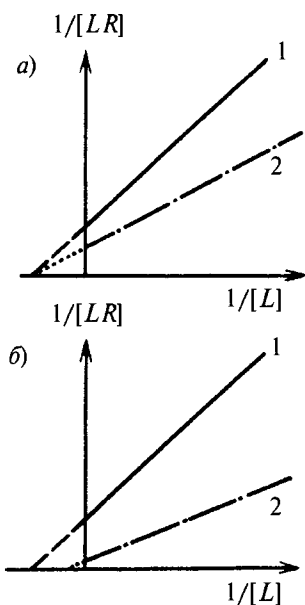


Рис. 3.54. Неконкурентное связывание двух лигандов. а — без изменения аффинности, б — с изменением; 1 — один лиганд, 2 — два лиганда.

Таким образом, график в двойных обратных координатах (Лайнуивера—Берка*) ($1/LR$, $1/L$) представляет собой прямую линию, которая пересекает ось ординат (ось Y) в точке $1/R_0$ и ось абсцисс (ось X) в точке $-1/Kd$ (рис. 3.53).

Заметим, что из-за достаточно больших вычислительных ошибок, возникающих при вычислении обратных величин, двойные обратные координаты редко используются для определения концентрации рецепторов и их аффинности. Однако они позволяют дискриминировать различные механизмы взаимодействия двух лигандов с одним типом мест связывания.

Неконкурентное связывание двух лигандов с одним рецептором приводит к изменению суммарных мест связывания лигандов. Поэтому в случае неконкурентного связывания ордината точки пересечения с осью Y графика в двойных обратных координатах в присутствии одного или двух лигандов изменяется (рис. 3.54).

С другой стороны, неконкурентное связывание может происходить с изменением и без изменения аффинности мест связывания лигандов. В случае если аффинность мест связывания лигандов рецептором не меняется, абсцисса пересечения с осью X графика в двойных обратных координатах в присутствии одного или двух лигандов не меняется (рис. 3.54а). И наоборот, изменение аффинности рецепторов при неконкурентном свя-

* В работе [36] утверждается, что данные координаты были введены Вульфом. Для того, чтобы не оспаривать авторство, будем их называть двойными обратными координатами.

**Связывание ДАДЛЭ с мембранами мозга в присутствии 1,5 нМ
и отсутствии ДАМФЭ**

Количество добавленного лиганда, нМ	Количество связанного лиганда, пм на 1 г ткани (с ДАМФЭ)
0,5	2,5 (1,0)
1	4 (1,5)
15	8 (2,7)
20	14 (2,8)
25	15 (2,8)

ывании приводит к изменению абсциссы точки пересечения с осью X графика в двойных обратных координатах в присутствии одного или двух лигандов (рис. 3.54б).

Пример 3.9 В работе [35] изучали связывание [D-Ala-2,D-Leu-5]энкефалина (ДАДЛЭ) с мембранами мозга в присутствии (пример 3.8) и отсутствии [D-Ala-2, MePhe-4, Gly-ol-5]-энкефалина (ДАМФЭ). Определить механизм взаимодействия этих лигандов с μ -опиоидными рецепторами на основании данных табл. 3.11.

На основании графика в двойных обратных координатах (рис. 3.55) делаем вывод о том, что эти два лиганда неконкурентно связываются с мембранами головного мозга, меняя аффинность μ -опиоидных рецепторов.

Бесконкурентное связывание лигандов

При бесконкурентном связывании лигандов лиганд второго типа связывается не с рецепторами, а с лиганд-рецепторными комплексами:

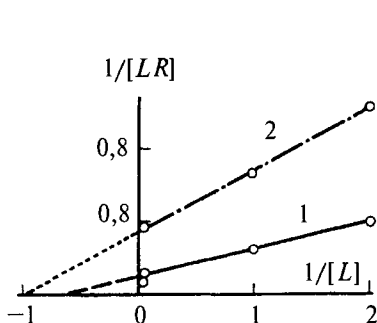


Рис. 3.55. Связывание ДАДЛЭ с мембранами мозга крыс в присутствии (кривая 2) и отсутствии (кривая 1) 1,5 нМ ДАМФЭ.

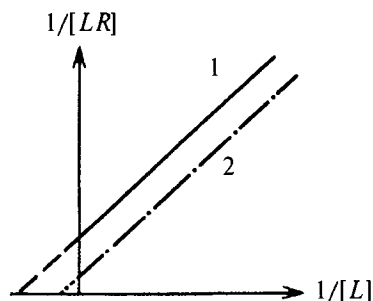
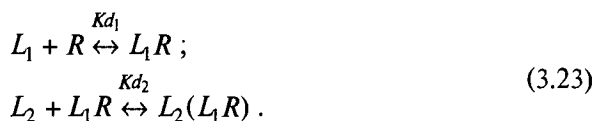


Рис. 3.56 Бесконкурентное связывание одного (1) и двух (2) лигандов.



Закон действующих масс для схемы (3.23) записывается следующим образом:

$$\begin{cases}
 Kd_1 = \frac{[L_1][R]}{[L_1 R]} = \frac{[L_1]([R_0] - [L_1 R] - [L_2(L_1 R)])}{[L_1 R]} \\
 Kd_2 = \frac{[L_2][L_1 R]}{[L_2(L_1 R)]} .
 \end{cases}
 \tag{3.24}$$

Как и в предыдущих случаях, не решая уравнение (3.24), воспользуемся аналитическим решением этого уравнения. Как было показано в [1–2], при бесконкурентном связывании лигандов в двойных обратных координатах наблюдается *параллельный перенос прямых* (рис. 3.56).

Антагонизм

Особое значение при взаимодействии двух лигандов с рецепторами имеет случай, когда между лигандами наблюдается *антагонизм*.

Антагонизм проявляется в различиях реализации биологи-

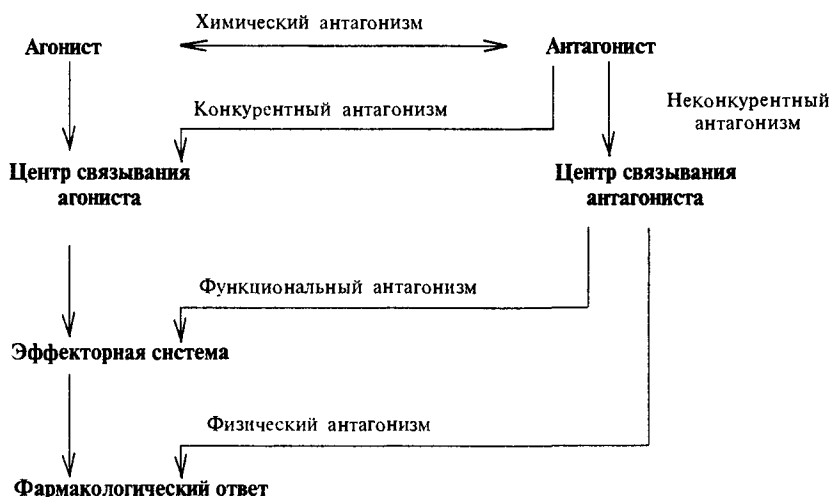


Рис. 3.57. Различные механизмы антагонизма [по 1].

ческих эффектов в ответ на лиганд-рецепторное взаимодействие. Поэтому антагонизм является больше фармакологическим, чем биокинетическим понятием. Антагонисты могут реализовывать свое действие с помощью различных механизмов (рис. 3.57).

Химический антагонизм проявляется в развитии химической реакции между агонистом и антагонистом. Вследствие этой реакции концентрация агониста уменьшается, что приводит к угнетению биологического ответа, вызванного агонистом.

Конкурентный и неконкурентный антагонизм осуществляется по механизмам конкурентного (см. ниже) и неконкурентного (см. выше) взаимодействия лигандов с рецепторами.

Функциональный антагонизм осуществляется при проведении и усилении рецепторного сигнала. При этом агонист взаимодействует с одной системой проведения сигнала, стимулируя клеточную функцию, а антагонист взаимодействует с другой системой, угнетая эту клеточную функцию.

Физический антагонизм проявляется при развитии фармакологического ответа. Как правило, он реализуется за счет взаимодействия агониста и антагониста с различными органами и тканями.

Физический антагонизм можно представить, предположив, что больному с гипертензией (повышенным давлением) одновременно назначили вазоконстрикторный (сосудосуживающий) и диуретический (мочегонный) препараты. Диуретик увеличивает выделение жидкости из организма, что приводит к уменьшению артериального давления за счет снижения объема циркулирующей крови. Однако действие диуретика нивелируется вазоконстрикторным препаратом, который вызывает спазм сосудов, повышая кровяное давление.

Для **дискриминации** различных механизмов антагонизма используются методы анализа зависимостей «доза-эффект», которые подробно рассмотрены в книге [1].

Конкурентное связывание лигандов

С точки зрения биокинетики наиболее важным случаем взаимодействия двух лигандов с одним центром связывания является случай *конкурентного связывания*. Интерес к конкурентному взаимодействию лигандов не случаен: он связан с наличием большого числа конкурентных методов анализа. Обычно конкурентное связывание наблюдается в тех случаях, когда лиганды имеют близкую молекулярную структуру (например, адреналин и дофамин) или когда один лиганд является составной частью молекулы другого лиганда (например, энкефалины и эндорфины).

Вначале рассмотрим практический метод определения наличия процесса конкурентного связывания лигандов, а затем перейдем к рассмотрению кинетики конкурентного связывания и конкурентных методов анализа.

При конкурентном связывании лигандов два типа лигандов взаимодействуют с одним типом связывающих участков на рецепторе согласно схеме



В равновесии закон действующих масс для схемы (3.25) запишется следующим образом

$$\begin{cases} Kd_1 = \frac{[R][L_1]}{[L_1 R]} = \frac{[L_1]([R_0] - [L_1 R] - [L_2 R])}{[L_1 R]} \\ Kd_2 = \frac{[R][L_2]}{[L_2 R]} = \frac{[L_2]([R_0] - [L_1 R] - [L_2 R])}{[L_2 R]} . \end{cases} \quad (3.26)$$

Решение уравнения (3.26) будет получено ниже, сейчас же перейдем к практическому анализу результатов экспериментов с конкурентным вытеснением лигандов.

При конкурентном связывании лигандов число мест связывания не меняется, зато изменяется аффинность, определяемая методом двойных обратных координат. Это приводит к тому, что в двойных обратных координатах ордината точки пересечения графика с осью Y остается постоянной, а абсцисса точки пересечения

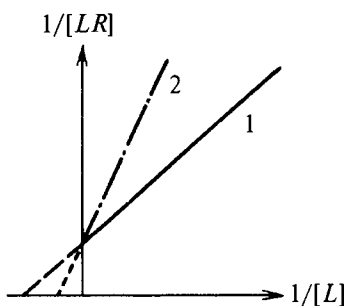


Рис. 3.58. Конкурентное взаимодействие одного (1) и двух (2) лигандов.

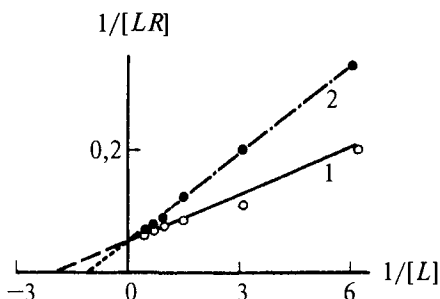


Рис. 3.59. Связывание брезазоцина с мембранами мозга крыс в присутствии (2) и отсутствии (1) 1,5 нМ ДАМФЭ.

**Связывание бремазоцина с мембранами мозга крыс в отсутствии
и присутствии ДАМФЭ**

Количество добавленного лиганда, нМ	Количество связанного лиганда, пм на 1 г ткани (в присутствии ДАМФЭ)
0,16	5 (2,9)
0,32	9 (5,0)
0,64	11,7 (8,1)
1	13 (11,1)
1,35	14 (12,5)
2	15 (14,3)

ния графика с осью X меняется в присутствии одного или двух лигандов (рис. 3.58).

Пример 3.10. В работе [35] изучали связывание бремазоцина в отсутствии (пример 3.7) и в присутствии 1,5 нМ [D-Ala-2, Me-Phe-4, Gly-ol-5]энкефалина (ДАМФЭ). По данным, приведенным в табл. 3.12, определить механизм взаимодействия между лигандами.

На основании графика в двойных обратных координатах (рис. 3.59) делаем вывод о том, что в данном случае имеется конкурентное связывание лигандов.

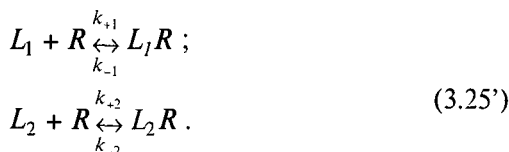
Конкурентное связывание лигандов.

Кинетика процесса образования

Утром познав истину,
вечером можно умереть.

Конфуций

Как было показано выше, процесс конкурентного связывания лигандов описывает схема



Закон действующих масс для данной схемы запишется следующим образом:

$$\begin{aligned}\frac{d[L_1R]}{dt} &= k_{+1}[L_1][R] - k_{-1}[L_1R]; \\ \frac{d[L_2R]}{dt} &= k_{+2}[L_2][R] - k_{-2}[L_2R].\end{aligned}\quad (3.26')$$

Запишем закон сохранения вещества для схемы (3.25'):

$$\begin{aligned}[R_0] &= [R] + [L_1R] + [L_2R]; \\ [L_1]_0 &= [L_1] + [L_1R]; \\ [L_2]_0 &= [L_2] + [L_2R],\end{aligned}$$

где $[R_0]$, $[L_1]_0$, $[L_2]_0$ — начальные концентрации рецепторов, лиганда первого и второго типа.

С учетом закона сохранения вещества уравнения (3.26') переписутся следующим образом:

$$\begin{aligned}\frac{d[L_1R]}{dt} &= k_{+1}([L_1]_0 - [L_1R])([R_0] - [L_1R] - [L_2R]) - k_{-1}[L_1R]; \\ \frac{d[L_2R]}{dt} &= k_{+2}([L_2]_0 - [L_2R])([R_0] - [L_1R] - [L_2R]) - k_{-2}[L_2R].\end{aligned}\quad (3.27)$$

Система (3.27) является нелинейной системой двух дифференциальных уравнений. Данная система не может быть решена аналитически; ее решение может быть получено только численно.

Рассмотрим ряд предельных случаев.

1. *Общая концентрация центров связывания намного превышает концентрацию всех лигандов*, т.е. $[R_0] \gg [L_1]_0 + [L_2]_0$.

Поскольку концентрация лиганд-рецепторных комплексов не может превышать концентрацию лигандов, то $[L_1]_0 > [L_1R]$; $[L_2]_0 > [L_2R]$; $[R_0] \gg [L_1R] + [L_2R]$.

Следовательно, в любой момент времени $[R_0] \approx [R]$.

Тогда система (3.27) переписется следующим образом:

$$\begin{aligned}\frac{d[L_1R]}{dt} &= k_{+1}([L_1]_0 - [L_1R])[R_0] - k_{-1}[L_1R]; \\ \frac{d[L_2R]}{dt} &= k_{+2}([L_2]_0 - [L_2R])[R_0] - k_{-2}[L_2R].\end{aligned}$$

Данная система дифференциальных уравнений является линейной. Поэтому ее решение может быть получено с помощью метода неопределенных коэффициентов или преобразований Лапласа. Решение записывается следующим образом:

$$[L_1 R] = \frac{k_{+1}[R_0][L_1]_0 - [k_{+1}[R_0][L_1]_0 - (k_{+1}[R_0] + k_{-1})[L_1 R]_0] \exp[\lambda_1 t]}{k_{+1}[R_0] + k_{-1}};$$

$$[L_2 R] = \frac{k_{+2}[R_0][L_2]_0 - [k_{+2}[R_0][L_2]_0 - (k_{+2}[R_0] + k_{-2})[L_2 R]_0] \exp[\lambda_2 t]}{k_{+2}[R_0] + k_{-2}};$$

$$\lambda_1 = -(k_{+1}[R_0] + k_{-1}), \quad \lambda_2 = -(k_{+2}[R_0] + k_{-2}),$$

где $[L_1 R]_0$, $[L_2 R]_0$ — начальные концентрации лиганд-рецепторных комплексов первого и второго типа.

Таким образом, в условиях избытка концентрации рецепторов по отношению к концентрации лигандов кинетические зависимости концентраций лиганд-рецепторных комплексов описываются одной экспонентой. При этом процесс связывания одного лиганда с рецептором протекает независимо от процесса связывания другого лиганда. Последнее понятно физически: поскольку концентрация центров связывания находится в избытке, то связывание одного лиганда практически не влияет на концентрацию мест связывания для другого лиганда. Следовательно, процессы комплексообразования двух лигандов с рецептором протекают независимо.

2. Общая концентрация лигандов намного превышает концентрацию мест связывания $[R_0] \ll [L_1]_0$; $[R_0] \ll [L_2]_0$.

Тогда уравнение (3.27) переписывается следующим образом:

$$\frac{d[L_1 R]}{dt} = k_{+1}[L_1]_0([R_0] - [L_1 R] - [L_2 R]) - k_{-1}[L_1 R];$$

$$\frac{d[L_2 R]}{dt} = k_{+2}[L_2]_0([R_0] - [L_1 R] - [L_2 R]) - k_{-2}[L_2 R].$$

Полученная система уравнений является линейной. Ее решение приводится в книге [2]. Мы приведем только конечный результат:

$$[L_1 R] = C_{11} \exp[\lambda_1 t] + C_{12} \exp[\lambda_2 t] + \frac{\Delta_1}{\Delta};$$

$$[L_2 R] = C_{21} \exp[\lambda_1 t] + C_{22} \exp[\lambda_2 t] + \frac{\Delta_2}{\Delta}.$$

Показатели экспоненты задаются как корни квадратного уравнения:

$$\lambda^2 + (k_{+1}[L_1]_0 + k_{+2}[L_2]_0 + k_{-2})\lambda + k_{-1}k_{+2}[L_2]_0 +$$

$$+ k_{+1}k_{-2}[L_1]_0 + k_{-1}k_{-2} = 0.$$

Показано, что при любых значениях констант скоростей реакций комплексообразования и распада лиганд-рецепторных комплексов, λ_1 и λ_2 действительные, отрицательные числа. Для определенности потребуем, чтобы $|\lambda_1| < |\lambda_2|$.

$$C_{11} = \frac{\lambda_2 \left(\frac{\Delta_1}{\Delta} - [L_1 R]_0 \right) + k_{+1} [L_1]_0 [R_0] - k_{-1} [L_1 R]_0}{\lambda_1 - \lambda_2};$$

$$C_{12} = \frac{\lambda_1 \left([L_1 R]_0 - \frac{\Delta_1}{\Delta} \right) - k_{+1} [L_1]_0 [R_0] + k_{-1} [L_1 R]_0}{\lambda_1 - \lambda_2};$$

$$C_{21} = \frac{\lambda_2 \left(\frac{\Delta_2}{\Delta} - [L_2 R]_0 \right) + k_{+2} [L_2]_0 [R_0] - k_{-1} [L_2 R]_0}{\lambda_1 - \lambda_2};$$

$$C_{12} = \frac{\lambda_1 \left([L_2 R]_0 - \frac{\Delta_2}{\Delta} \right) - k_{+2} [L_2]_0 [R_0] + k_{-2} [L_2 R]_0}{\lambda_1 - \lambda_2}.$$

Свободные члены определяются соотношениями $\Delta = k_{-1} k_{+2} [L_2]_0 + k_{+1} k_{-2} [L_1]_0 + k_{-1} k_{-2}$; $\Delta_1 = k_{+1} k_{-2} [R_0] [L_1]_0$; $\Delta_2 = k_{-1} k_{+2} [R_0] [L_2]_0$.

Важно отметить, что *при наличии избытка концентрации лигандов по отношению к концентрации мест связывания в кинетике ассоциации лигандов с рецептором наблюдается две экспоненты.*

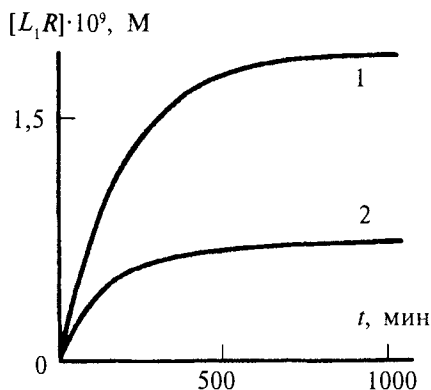


Рис. 3.60. Кинетические кривые комплексообразования лиганда L_1 с одним типом мест связывания в присутствии (2) и отсутствии (1) конкурентного лиганда L_2 [2].

На рис. 3.60 приведены теоретические кривые накопления лиганд-рецепторных комплексов в отсутствии и присутствии конкурентного лиганда. Как следует из рисунка, наличие конкурентного лиганда не только приводит к уменьшению концентрации лиганд-рецепторных комплексов другого лиганда, но также к увеличению времени установления равновесия в системе.

3. Конкурентное связывание лигандов в условиях, когда константы скорости ассоциации и диссоциации обоих лигандов равны $k_{+1}=k_{+2}$; $k_{-1}=k_{-2}$

Такого рода процессы могут наблюдаться, например, при использовании меченого и немеченого лигандов в радиорецепторных исследованиях (см. § 3.6), при постановке опытов по диссоциации меченого лиганда с рецептором (см. § 3.1) и т.д.

Система дифференциальных уравнений закона действующих масс (3.27) в этих условиях переписывается следующим образом:

$$\frac{d[L_1R]}{dt} = k_{+1}[L_1][R] - k_{-1}[L_1R]; \quad \frac{d[L_2R]}{dt} = k_{+1}[L_2][R] - k_{-1}[L_2R].$$

Для решения полученной системы введем вспомогательную переменную $U = [L_1R] + [L_2R]$. Тогда

$$\frac{d([L_1R] + [L_2R])}{dt} = k_{+1}([L_1] + [L_2])[R] - k_{-1}([L_1R] + [L_2R]).$$

Выразим концентрацию лиганда и рецепторов через новую переменную $[R] = [R_0] - ([L_1R] + [L_2R]) = [R_0] - U$; $[L_1] + [L_2] = [L_1]_0 + [L_2]_0 - U$.

Тогда

$$\frac{dU}{dt} = k_{+1}([L_1]_0 + [L_2]_0 - U)([R_0] - U) - k_{-1}U.$$

Полученное уравнение решается за счет нахождения корней квадратного уравнения

$$0 = k_{+1}([L_1]_0 + [L_2]_0 - U)([R_0] - U) - k_{-1}U.$$

После того как корни квадратного уравнения найдены, правая часть полученного дифференциального уравнения раскладывается на простые множители, при этом дифференциальное уравнение становится уравнением с разделяющимися переменными. Подобный способ решения дифференциальных уравнений был подробно рассмотрен в § 3.3 при анализе кинетики взаимодействия соизмеримых концентраций лиганда и рецептора. Приведем окончательный результат:

$$U = \frac{(a+b) \left(\frac{(a-b)(a+b-U_0)}{(a+b)(a-b-U_0)} - \exp[-2bk_{+1}t] \right)}{\frac{a+b-U_0}{a-b-U_0} - \exp[-2bk_{+1}t]},$$

где

$$U_0 = [L_1R]_0 + [L_2R]_0;$$

$$a = \frac{[L_1]_0 + [L_2]_0 + [R_0] + k_{-1} / k_{+1}}{2};$$

$$b = \sqrt{a^2 - ([L_1]_0 + [L_2]_0)[R_0]}.$$

Подставим найденную зависимость вспомогательной переменной от времени в дифференциальное уравнение закона действующих масс:

$$\frac{d[L_1R]}{dt} = k_{+1}([L_1]_0 - [L_1R])([R_0] - U(t)) - k_{-1}[L_1R].$$

Полученное дифференциальное уравнение является линейным неоднородным дифференциальным уравнением, которое может быть решено с помощью специальных методов. Приведем окончательное решение:

$$\begin{aligned} [L_1R] = & \left(\frac{\frac{a+b-U_0}{a-b-U_0} - 1}{\frac{a+b-U_0}{a-b-U_0} - \exp[-2bk_{+1}t]} \right) \{ [L_1R]_0 \exp[-(k_{-1} + k_{+1}([R_0] - a + b))t] + \\ & + \frac{[L_1]_0}{1 - \frac{a+b-U_0}{a-b-U_0}} \left[\frac{([R_0] - a - b)k_{-1}}{k_{-1} + k_{+1}([R_0] - a - b)} (\exp[-2bk_{+1}t - \right. \\ & \left. - \exp[-(k_{-1} + k_{+1}([R_0] - a + b))t] + \right. \\ & \left. + \frac{a+b-U_0}{a-b-U_0} (a-b-[R_0])k_{-1}}{k_{-1} + k_{+1}([R_0] - a + b)} (\exp[-(k_{-1} + k_{+1}([R_0] - a + b))t] + 1) \right] \}. \end{aligned}$$

Таким образом, в условиях $k_{+1} = k_{+2}$; $k_{-1} = k_{-2}$ процесс конкурентного взаимодействия лигандов с одним центром связывания может быть полностью описан аналитически.

Важно отметить следующее. *Процесс изменения концентрации центра связывания описывается одной экспонентой, а процесс изменения концентрации лиганда — двумя экспонентами.*

4. *Процесс конкурентного связывания лигандов является процессом необратимой диссоциации лиганд-рецепторных комплексов, т.е. протекает при следующих начальных условиях:*

$$t = 0: [L_1] = [L_2] = 0;$$

при этом в течение всего времени наблюдения за процессом выполняются неравенства:

$$k_{+1}/k_{-1} \ll [L_1R]/[L_1R]; \quad k_{+2}/k_{-2} \ll [L_2R]/[L_2R].$$

В этих условиях дифференциальные уравнения закона действующих масс (3.27) записываются следующим образом:

$$\frac{d[L_1R]}{dt} = -k_{-1}[L_1R]; \quad \frac{d[L_2R]}{dt} = -k_{-2}[L_2R].$$

Тогда

$$[L_1R] = [L_1R]_0 \exp[-k_{-1}t]; [L_2R] = [L_2R]_0 \exp[-k_{-2}t].$$

Таким образом, при необратимой диссоциации лиганд-рецепторных комплексов зависимости концентраций этих комплексов от времени содержат по одному экспоненциальному члену, при этом зависимость от времени суммарной концентрации лиганд-рецепторных комплексов содержит два экспоненциальных члена.

Время установления равновесия в системе в случае конкуренции двух лигандов за один тип рецепторов

1. В случае, когда общая концентрация центров связывания намного превышает концентрацию всех лигандов, т.е. $[R_0] \gg [L_1]_0 + [L_2]_0$, время установления равновесия определяется наименьшим по абсолютной величине параметром $\lambda_1 = -(k_{+1}[R_0] + k_{-1})$; $\lambda_2 = -(k_{+2}[R_0] + k_{-2})$.

2. В случае, когда общая концентрация лигандов намного превышает концентрацию мест связывания $[R_0] \ll [L_1]_0$; $[R_0] \ll [L_2]_0$, время установления равновесия определяется в первую очередь параметром λ_1 , так как по определению $|\lambda_1| < |\lambda_2|$. В этом приближении $k_{+1}[L_1]_0 \gg k_{-1}$ и $k_{+2}[L_2]_0 \gg k_{-2}$. Следовательно, параметр λ_1 , а значит, и время установления равновесия в системе определяются константами скоростей диссоциации: $\lambda_1 \approx (k_{-1} + k_{-2})/2$.

Равновесное связывание в случае конкуренции двух лигандов за один тип рецепторов

Предположим, что процесс комплексообразования лигандов по схеме (3.25) протекает достаточно долго так, что концентрации лигандов, лиганд-рецепторных комплексов и свободных рецепторов не меняются с той точностью, с которой их можно измерить. Следовательно, данный процесс достиг состояния равновесия (протекает в условиях равновесия).

Из рассмотренных выше частных случаев можно определить равновесную концентрацию лиганд-рецепторных комплексов.

1. Если общая концентрация центров связывания намного превышает концентрацию всех лигандов, т.е. $[R_0] \gg [L_1]_0 + [L_2]_0$, то

$$[L_1R] = \frac{k_{+1}[R_0][L_1]_0}{k_{+1}[R_0] + k_{-1}} = \frac{[R_0][L_1]_0}{[R_0] + Kd_1};$$
$$[L_2R] = \frac{k_{+2}[R_0][L_2]_0}{k_{+2}[R_0] + k_{-2}} = \frac{[R_0][L_2]_0}{[R_0] + Kd_2}.$$

При этом равновесное связывание одного лиганда не зависит от процесса равновесного связывания другого лиганда.

2. Если общая концентрация лигандов намного превышает концентрацию мест связывания $[R_0] \ll [L_1]_0$; $R_0] \ll [L_2]_0$, то

$$[L_1 R] = \frac{[R_0][L_1]_0}{[L_1]_0 + Kd_1 \left(1 + \frac{[L_2]_0}{Kd_2}\right)};$$

$$[L_2 R] = \frac{[R_0][L_2]_0}{[L_2]_0 + Kd_2 \left(1 + \frac{[L_1]_0}{Kd_1}\right)}.$$

3. Если константы скорости ассоциации и диссоциации обоих лигандов равны $k_{+1} = k_{+2}$, $k_{-1} = k_{-2}$, то

$$[L_1 R] = \frac{[L_1]_0([R_0] - a + b)}{[R_0] - a + b + Kd_1}; \quad [L_2 R] = \frac{[L_2]_0([R_0] - a + b)}{[R_0] - a + b + Kd_1},$$

где

$$a = \frac{[L_1]_0 + [L_2]_0 + [R_0] + k_{-1} / k_{+1}}{2}; \quad b = \sqrt{a^2 - ([L_1]_0 + [L_2]_0)[R_0]}.$$

4. В общем случае

$$[L_1 R] = \frac{[\bar{R}][\bar{L}_1]}{[\bar{L}_1] + Kd_1 \left(1 + \frac{[\bar{L}_2]}{Kd_2}\right)}; \quad [L_2 R] = \frac{[\bar{R}][\bar{L}_2]}{[\bar{L}_2] + Kd_2 \left(1 + \frac{[\bar{L}_1]}{Kd_1}\right)}.$$

При этом равновесные концентрации свободных лигандов определяются по формулам:

$$[\bar{L}_1] = \frac{Kd_1[L_1]_0}{Kd_1 + [\bar{R}]}; \quad [\bar{L}_2] = \frac{Kd_2[L_2]_0}{Kd_1 + [\bar{R}]}.$$

Равновесная концентрация свободных рецепторов определяется как действительный положительный корень кубического уравнения:

$$\{Ka_1 + Ka_2 - Ka_1Ka_2[R_0]\} \cdot [\bar{R}]^2 + \{1 + Ka_1Ka_2([L_1]_0 + [L_2]_0) - (Ka_1 + Ka_2)[R_0]\} \cdot [\bar{R}] + Ka_1Ka_2[\bar{R}]^3 + Ka_1[L_1]_0 + Ka_2[L_2]_0 - [R_0] = 0,$$

где $Ka = 1/Kd$ — константа аффинности лиганд-рецепторных комплексов.

Таким образом, за исключением случая, когда концентрация мест связывания превышает концентрацию обоих лигандов, конкурентное

связывание одного лиганда влияет на параметры связывания другого лиганда.

Это дает возможность определения константы комплексобразования одного лиганда, если известна константа комплексобразования другого лиганда (см. ниже). Однако, как следует из полученных соотношений, такое определение возможно лишь при условии соизмеримости $1/Kd_2[\bar{L}_2]$ и $1 + 1/Kd_1[L_1]$.

На практике это соответствует точке перегиба на калибровочной кривой вытеснения одним лигандом другого (рис. 3.61). Точка перегиба наблюдается при вытеснении 50% первого лиганда, связанного с рецепторами. При этом концентрацию второго лиганда обозначают IC_{50} (50% inhibitory concentration).

В простейшем случае для определения константы диссоциации конкурентными методами используют следующий алгоритм [2]. Проводят опыты по конкурентному вытеснению меченого лиганда, сродство которого к рецепторам известно, избытком другого, немеченого («холодного») лиганда, сродство которого к рецепторам неизвестно. Затем рассчитывают константу ингибирования по следующей формуле:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]_0}{Kd}},$$

где $[L^*]_0$ — начальная концентрация меченого лиганда; Kd — его константа диссоциации.

Показано, что если лиганд взаимодействует с несколькими типами рецепторов, то *отношение констант ингибирования равно отношению констант диссоциации. При некооперативном характере взаимодействия лиганда с рецептором константа ингибирования равна константе диссоциации «холодного» лиганда* (см. ниже «Определение констант связывания конкурентными методами»). Таким образом, *константа ингибирования характеризует степень специфичности данного лиганда по отношению к данному типу рецепторов.*

Выше было проанализировано влияние наличия конкурентного ингибитора на поведение кривой насыщения в двойных обратных координатах. Приведем результаты анализа влияния конкурентного ингибитора на поведение кривой насыщения в координатах Скэтчарда. Эти результаты были получены и исследованы в работе [34].

При наличии конкурентного ингибитора кривая насыщения, представленная в координатах Скэтчарда, гипербола с асимптотами (рис. 3.62), первая из которых имеет наклон $Ka_1 = 1/Kd_1$ и

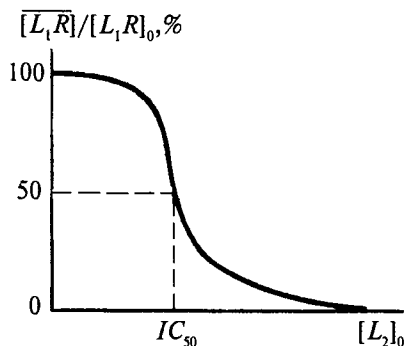


Рис. 3.61. Комплексообразование двух конкурентных лигандов с одним центром связывания. Вытеснение первого лиганда вторым.

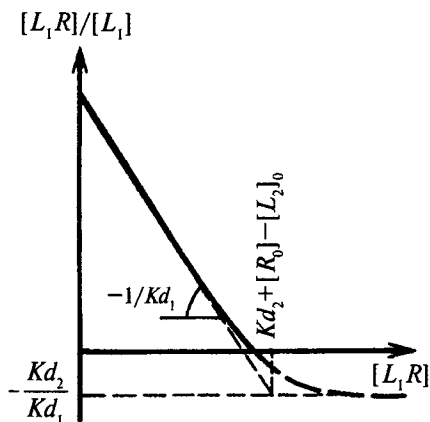


Рис. 3.62. Конкурентное связывание двух лигандов с одним рецептором (метод Скэтчарда).

отсекает на оси абсцисс (ось X) отрезок, равный $[R_0] - [L_2]_0$. Вторая асимптота имеет горизонтальное направление и пересекает ось ординат (ось Y) в точке $-Kd_2/Kd_1 = -Ka_1/Ka_2$. Асимптоты пересекаются в точке с координатами: по оси $X - Kd_2 + [R_0] - [L_2]_0$ по оси $Y - Kd_2/Kd_1$.

Конкурентное связывание двух лигандов, представленное в координатах Скэтчарда, анализируют в соответствии со следующим алгоритмом:

1. По тангенсу угла наклона первой (наклонной) асимптоты определяется величина $-1/Kd_1$. Вычисляется сродство рецепторов к лиганду первого типа.

2. По точке пересечения второй (горизонтальной) асимптоты с осью Y определяется величина $-Kd_2/Kd_1$. Вычисляется сродство рецепторов к лиганду второго типа.

3. Абсцисса точки пересечения асимптот равна $Kd_2 + [R_0] - [L_2]_0$. По ней вычисляют суммарную концентрацию мест связывания.

Недостатком данного метода является то, что ряд характеристик определяется в IV квадранте, в то время как все экспериментальные данные лежат в I квадранте. Это затрудняет поиск горизонтальной асимптоты, внося погрешность в определение сродства рецепторов к лиганду второго типа и числа мест связывания. Однако эта ошибка нивелируется, если известен хотя бы один из трех искомых параметров: Kd_1 , Kd_2 , $[R_0]$.

Определение кинетических констант конкурентными методами

Рассмотренная выше кинетика процессов комплексообразования в случае конкуренции двух лигандов за один центр связывания показала, что эти процессы в самом общем случае не описываются аналитически. Даже в приближении наличия большого избытка концентрации лигандов по отношению к концентрациям рецепторов аналитические выражения, связывающие концентрации компонентов системы со временем лиганд-рецепторного взаимодействия, сложным образом зависят от начальных условий. Исключение составляет случай избытка концентрации мест связывания по отношению к суммарной концентрации лигандов.

Поэтому в тех случаях, когда определение кинетических параметров комплексообразования возможно за счет отдельного изучения кинетики связывания двух лигандов, следует выбирать именно этот способ. При этом параметры связывания определяются аналогично рассмотренному в § 3.1. Точно так же находят кинетические параметры, если концентрация мест связывания в избытке по отношению к суммарной концентрации лигандов.

Однако в ряде случаев эти условия невыполнимы. Тогда для определения кинетических параметров связывания используют рассматриваемый ниже метод.

1. Исходя из экспериментов по равновесному связыванию находят константы ассоциации (диссоциации) лигандов с рецепторами.

2. Путем вытеснения меченого лиганда избытком немеченого (постановка опытов по диссоциации лиганд-рецепторных комплексов — см. § 3.1) определяют константы скорости диссоциации каждого из лигандов.

3. Рассчитывают константы скорости диссоциации по приводимым формулам:

$$k_{+1} = k_{-1}Ka_1 = k_{-1}/Kd_1; \quad k_{+2} = k_{-2}Ka_2 = k_{-2}/Kd_2.$$

Кинетические константы можно также определить путем численного подбора на ЭВМ параметров уравнений, описывающих зависимость концентраций компонентов системы от времени.

Определение равновесных констант конкурентными методами

Стоя на кафедре, я с удовольствием наблюдаю за тем, как прихожане слушают мою проповедь и одобрительно кивают головами... во сне.

С. Смит

Как было показано в § 3.3, в ряде случаев определение равновесных констант комплексообразования прямыми методами затруднено или невозможно. Тогда используют конкурентные методы определения констант связывания. Рассмотрим некоторые из них. Во избежание возможной путаницы в дальнейшем будем обозначать индексом «1» все, что относится к лиганду с известной константой связывания, а индексом «2» — все, что относится к лиганду с определяемой константой.

Существующие конкурентные методы определения равновесных констант можно подразделить на два подтипа:

1. Методы, основанные на ингибировании связывания. Вытеснение постоянной концентрации первого лиганда возрастающими концентрациями второго.

2. Методы, основанные на анализе кривых связывания первого лиганда при постоянной концентрации второго.

Примеры и тех, и других методов были рассмотрены выше. Заметим, что выбор метода зависит от условий эксперимента, цели опыта, доступности и стоимости реактивов. Поэтому априори трудно отдать предпочтение тому или иному варианту.

Рассмотрим некоторые методы конкурентного определения равновесных параметров.

1. Константу ассоциации можно определить, если известна концентрация второго лиганда, уменьшающая связывание первого лиганда вдвое (IC_{50}) (см рис. 3.61). Можно показать, что в этих условиях

$$Ka_2 = 1 / Kd_2 = \frac{1 + Ka_1([L_1]_0 + [R_0] - [L_1R]_0)}{IC_{50}}.$$

Рассмотрим два предельных случая:

а) если Ka_1 и Ka_2 соизмеримы и $1/Ka_2 \gg [L_1]_0 + [R_0]$, то $Ka = 1/IC_{50}$;

б) если концентрация обоих лигандов существенно превосходит концентрацию мест связывания, то $Ka_2 = (1 + Ka_1[L_1]_0)/IC_{50}$.

Согласно введенному выше определению константу ингибирования получаем как:

$$Ki = \frac{IC_{50}}{1 + [L_1]_0 / Kd_1}.$$

Следовательно, в случае некооперативного характера взаимодействия двух лигандов с одним центром связывания выполняется равенство $Ki = 1/Ka_2$.

Достаточно часто IC_{50} определяют с помощью специального преобразования координат (logit-координаты), которые являются аналогом координат Хилла (см § 3.3):

$$\text{logit} = \ln \frac{[L_1 R]}{[L_1 R]_0 - [L_1 R]}.$$

Величину IC_{50} находим по точке пересечения с осью X графика в координатах $(\text{logit}, [L_2]_0)$ (рис. 3.63).

2. Достаточно широкое применение нашел другой метод определения равновесных констант связывания, предложенный Диксоном в 1953 г.

Метод Диксона основан на построении кривых вытеснения первого лиганда вторым при двух различных концентрациях первого лиганда. При этом кривые вытеснения, представленные в координатах $(1/[L_1 R], [L_2]_0)$ (координаты Диксона), являются прямыми линиями. Их точка пересечения имеет абсциссу, равную $-Kd_2$ (рис. 3.64). Ордината точки пересечения равна $1/[R_0]$.

В тех случаях, когда концентрация мест связывания известна из независимых экспериментов, возможно определение сродства рецепторов к лиганду при одной концентрации первого лиганда. Для

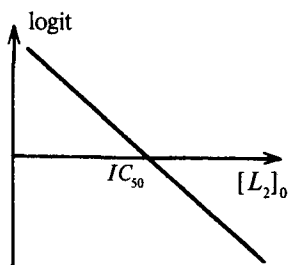


Рис. 3.63. Определение IC_{50} с помощью logit-координат.

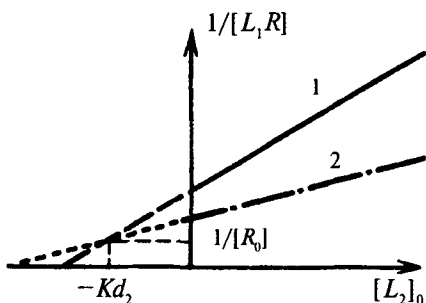


Рис. 3.64. Определение константы диссоциации лиганда второго типа с рецепторами (координаты Диксона).

1, 2 — различные концентрации первого лиганда.

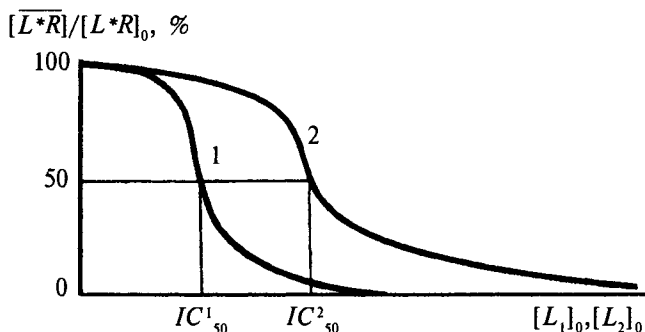


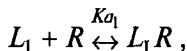
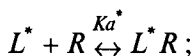
Рис. 3.65. Кривые конкурентного вытеснения меченого лиганда двумя немечеными.

этого по оси ординат откладывают величину $1/[R_0]$ и проводят горизонтальную линию до пересечения с кривой вытеснения, представленной в координатах Диксона. Абсцисса точки пересечения равна Kd_2 .

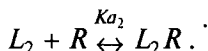
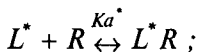
3. Для нахождения равновесных констант комплексообразования очень удобным является метод, основанный на определении отношения общих концентраций соединения с неизвестной константой связывания и соединения с известной константой связывания, при которых оба соединения приводят к одинаковому (обычно 50%) уменьшению связывания данной концентрации меченого (индикаторного) лиганда (рис. 3.65). Фактически это означает определение IC_{50} для каждого из лигандов.

Отношение IC_{50}^2/IC_{50}^1 называют *относительной способностью к вытеснению меченого лиганда*.

Предположим, что процесс вытеснения меченого лиганда как первым, так и вторым лигандом аналогичен представленному на схеме (3.25). Тогда для первого лиганда процесс вытеснения запишется в виде следующей схемы:



для второго лиганда



Тогда связь между относительной способностью $P = [RL^*]/[L^*]$ к вытеснению меченого лиганда и относительной константой связывания Ka_1/Ka_2 определяется следующим образом [2]:

$$\frac{Ka_1}{Ka_2} = \frac{P[L^*]_0 - [L^*R]}{[L^*]_0 - [L^*R]}.$$

Если отношение P соответствует уменьшению связывания меченого лиганда на 50%, т.е. $P = P_{50}$, то

$$\frac{Ka_1}{Ka_2} = \frac{[L^*]_0 P_{50} - 0,5[L^*R]_0}{[L^*]_0 - 0,5[L^*R]_0}.$$

Заметим, что значение P_{50} выбрано произвольно. Однако точность определения отношения констант больше в области $0,5[L^*R]_0$, чем на конечных участках кривой вытеснения.

4. Константа ассоциации Ka_2 может быть определена в самом общем случае, если даже неизвестны Ka_1 и $[R_0]$.

Рассмотрим процесс (3.25) конкурентного связывания лигандов. В отсутствие второго лиганда (по определению)

$$Ka_1 = \frac{[\overline{L_1R}]}{[L_1][R]} = \frac{[\overline{L_1R}]}{[L_1]([R_0] - [\overline{L_1R}])};$$

в присутствии второго лиганда

$$Ka_1 = \frac{[\overline{L_1R}]}{[L_1][R]} = \frac{[\overline{L_1R}]}{[L_1]([R_0] - [\overline{L_1R}] - [\overline{L_2R}])}.$$

Знаком «штрих» помечены параметры, измеренные при наличии двух лигандов в системе. При $[\overline{L_1\tilde{R}}] = [\overline{L_1\tilde{R}}]'$ получаем $[\overline{L_1}][R_0] - [\overline{L_1\tilde{R}}] = [\overline{L_1}]'([R_0] - [\overline{L_1\tilde{R}}]' - [\overline{L_2\tilde{R}}]')$.

Следовательно:

$$[\overline{L_2R}]' = \frac{([R_0] - [\overline{L_1R}])\left(\frac{[\overline{L_1}']}{[\overline{L_1}]} - 1\right)}{\frac{[\overline{L_1}']}{[\overline{L_1}]}}.$$

Тогда

$$Ka_2 = \frac{[\overline{L_2R}]'}{[\overline{L_2R}]'([R_0] - [\overline{L_1R}] - [\overline{L_2R}]')} = \frac{\frac{[\overline{L_1}']}{[\overline{L_1}]} - 1}{\frac{[\overline{L_1}']}{[\overline{L_1}]}}.$$

Или

$$Kd_2 = \frac{1}{Ka_2} = \frac{[L_2]_0}{\frac{[L_1]'}{[L_1]} - 1} - ([R_0] - \overline{[L_1 R]}) \frac{1}{\frac{[L_1]'}{[L_1]}}.$$

Таким образом, константу диссоциации лиганд-рецепторных комплексов и концентрацию мест связывания можно определить

в координатах $\left(\frac{\frac{[L_2]_0}{\frac{[L_1]'}{[L_1]} - 1}}{\frac{[L_1]'}{[L_1]}}, \frac{1}{\frac{[L_1]'}{[L_1]}} \right)$ (рис. 3.66).

Если $([R_0] - [R_1 L]_0)$, то $\frac{1}{Ka_2} = \frac{[L_2]_0}{\frac{[L_1]'}{[L_1]} - 1}$.

Полученное уравнение в координатах $(\log \left| \frac{[L_1]'}{[L_1]} - 1 \right|, \log [L_2]_0)$

дает линейную функцию с тангенсом угла наклона, равным единице. Полученная в этих координатах прямая отсекает на оси абсцисс отрезок длиной $\log Ka_2$. Эти координаты принято называть координатами Шилда (Шильда) (Schild, 1949).

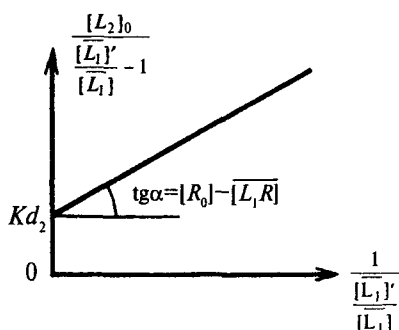


Рис. 3.66. Определение константы диссоциации рецепторов с лигандом второго типа и числа мест связывания конкурентными методами.

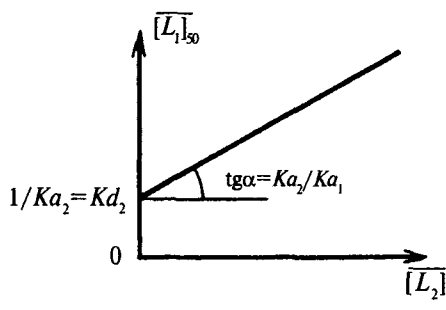


Рис. 3.67. Определение равновесных констант конкурентными методами.

5. Константу связывания рецепторов с лигандом второго типа можно определить из анализа зависимостей концентраций комплексов «рецептор—лиганд первого типа» от концентрации лиганда второго типа.

Если известна равновесная концентрация первого лиганда, $[\bar{L}_1]_{50}$, при которой связывание составляет 50% максимального связывания ($[R_0]/2$), то [2]

$$Ka_2 = \frac{Ka_1[\bar{L}_1]_{50} - 1}{[\bar{L}_2]}.$$

Иллюстрация данного метода приведена на рис. 3.67.

6. Равновесные константы конкурентного связывания лигандов с рецептором можно проводить методом Скэтчарда, рассмотренным выше.

Конкурентные методы анализа

Рассмотрение процесса конкурентного взаимодействия двух лигандов с одним центром связывания показало, что в условиях избытка концентрации лигандов по отношению к концентрации рецепторов связывание одного лиганда оказывает влияние на параметры связывания другого. Этот факт был положен в основу одного из самых чувствительных методов анализа — *конкурентного*.

Общий принцип анализа следующий. К системе, содержащей определяемый лиганд, добавляют известное количество меченого лиганда. Лиганд метят или радиоактивной меткой, или ферментом. Затем добавляют специфически связывающие лиганд белки (рецепторы, антитела, ферменты). Далее комплексы меченого лиганда с центрами связывания отделяют от меченого лиганда в растворе. Определяют распределение метки. Последнее может быть оценено на основании измерения активности связанного и не-связанного лиганда, а если известна удельная активность, то только по изменению меченого лиганда в комплексе или в растворе.

Полученные результаты сравнивают с калибровочной кривой и по ней определяют концентрацию исследуемого лиганда. В зависимости от используемых специфических центров связывания подразделяют: *иммуноанализ* (центры связывания — антитела), *рецепторный анализ* (центры связывания — мембранные и растворимые рецепторы), *конкурентный анализ с использованием специфических связывающих белков*, *конкурентный ферментный анализ*. Ряд примеров конкурентного анализа приведен в табл. 3.13.

Несмотря на то что конкурентные методы, представленные в

Конкурентные методы анализа [2]

Тип специфического реагента	Общее название	Классы соединений, для которых применялись эти методы	Примеры
Антитела	Иммуноанализ	Полипептидные гормоны Белки Стероидные гормоны Циклические нуклеотиды Витамины Ферменты Лекарственные вещества	Инсулин, гормоны роста, адренокортикотропный гормон (АКТГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) Альбумины, тиреоглобулины, иммуноглобулины различных классов Альдостерон, тестостерон, эстрадиол, прогестерон цАМФ, цГМФ, цТМФ, цУМФ Фолиевая кислота Дофамин-β-гидроксилаза Морфин, дигитоксин
Рецепторы (мембранные и внутриклеточные)	Рецепторный анализ	Полипептидные гормоны Стероидные гормоны	АКТГ, ЛГ Эстроген
Сывороточные и внутриклеточные связывающие белки	Конкурентный анализ с использованием связывающих белков	Тиреоидные гормоны Стероидные гормоны Витамины Циклические нуклеотиды	Тиротоксин, трийодтиронин Кортизол, прогестерон, эстрадиол Витамины В₁₂, D; фолиевая кислота цАМФ, цГМФ
Ферменты	Конкурентный ферментный анализ	Витамины Циклические нуклеотиды Медиаторы	Фолиевая кислота цАМФ, цГМФ Ацетилхолин

табл. 3.13, основаны на использовании различных центров связывания, их теоретическое описание близко к схеме (3.25).

Ключевыми характеристиками любого метода анализа, в том числе и конкурентного, являются его чувствительность и специфичность. Рассмотрим подробно факторы, определяющие эти

характеристики. При этом для простоты будем предполагать, что конкурентное взаимодействие меченого и немеченого лиганда осуществляется по схеме (3.25).

Чувствительность конкурентных методов анализа

Существуют различные подходы к определению чувствительности метода. С нашей точки зрения, наиболее корректным является метод, предложенный Экинсом и др. [33]. При этом под *чувствительностью* понимают минимально измеряемую с помощью данного метода концентрацию лиганда (ΔL).

Как следует из определения, чувствительность метода анализа в каждом конкретном случае зависит от выбора координат, в которых представляются результаты экспериментов по связыванию. В § 3.1, 3.3 и в настоящем разделе было рассмотрено достаточно большое число методов преобразования координат; многие другие методы можно найти в специальной литературе. Однако все методы преобразования координат взаимосвязаны между собой, поэтому в настоящем параграфе рассмотрим вопросы определения чувствительности анализа в координатах $P = [RL^*]/[L^*]$ от $[L]_0$, учитывая, что рассматриваемый подход легко может быть перенесен на остальные зависимости; все выводы по оптимизации процесса анализа, полученные для координат (P, L) , сохраняют силу и для других представлений.

Итак, чувствительность метода определяется количеством немеченого лиганда ΔL , которое вызывает распределение связанного и несвязанного меченого лиганда на величину ΔP , равную стандартной ошибке ΔP_0 определения P_0 (где P_0 — значение P в отсутствие немеченого лиганда, рис. 3.68):

$$\Delta L = \frac{\Delta P_0}{\left| \frac{dP}{dL} \right|_0}. \quad (3.28)$$

Из этого определения следует, что чувствительность метода тем выше, чем круче калибровочная кривая (чем больше значение

$\left| \frac{dP}{dL} \right|_0$) и чем меньше ошибка в определении ΔP_0 .

Рассмотрим на ряде конкретных примеров, как зависит чувствительность анализа от концентраций компонентов системы и констант связывания.

1. Процесс связывания протекает по схеме

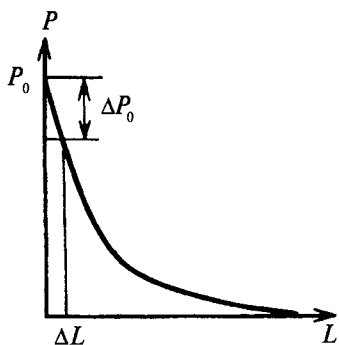
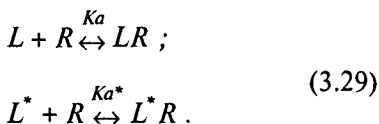


Рис. 3.68. Определение чувствительности конкурентных методов анализа.



Если при этом меченое и немеченое соединения имеют одну и ту же химическую природу или в более общем случае, комплексообразование с меченым и немеченым лигандом протекает с одинаковой степенью сродства ($K_a = K_a^*$), то из уравнения (3.28) следует, что зависимость P от исходных концентраций имеет следующий вид:

$$P^2 + P(1 + K_a[L + L^*]) - K_a R_0 = 0 ,$$

где R_0 — суммарная концентрация мест связывания.

Учитывая, что P никогда не равно нулю, получаем

$$P + 1 + K_a(L + L^*) - K_a R_0 - (K_a R_0 / P) = 0 .$$

Продифференцировав полученное выражение по L , придем к следующему соотношению:

$$\frac{dP}{dL} + K_a + \frac{K_a R_0}{P^2} \frac{dP}{dL} = 0 ,$$

преобразование которого приводит к равенству:

$$\frac{dP}{dL} = - \frac{P}{\frac{P}{K_a} + \frac{R_0}{P}} .$$

Так как при $L = 0$ и $P = P_0$, то

$$\left| \frac{dP}{dL} \right|_0 = \frac{P_0}{\frac{P_0}{K_a} + \frac{R_0}{P_0}} .$$

Используя определение чувствительности конкурентного метода анализа (3.28), получаем

$$\Delta L = \frac{\Delta P}{P_0} \left(\frac{P_0}{K_a} + \frac{R_0}{P_0} \right) .$$
(3.30)

Таким образом, чувствительность конкурентного метода ана-

лиза тем выше, чем больше специфичность связывающих участков (чем больше Ka) и чем меньше число связывающих участков (R_0) и стандартная ошибка метода (ΔP_0).

Если известна зависимость ΔP_0 от исходной концентрации меченого лиганда и других экспериментальных параметров, то с помощью соотношения (3.30) можно подобрать оптимальные условия для проведения конкурентных методов анализа с максимальной чувствительностью. Приведем результаты этих вычислений по [2].

Если наибольший вклад в ошибку определения P вносит ошибка подсчета количества меченого лиганда по числу радиоактивных распадов, то оптимальными параметрами проведения эксперимента являются следующие:

$$L^* = 4/Ka; R_0 = 3/Ka.$$

Для того чтобы оптимизировать условия проведения эксперимента с учетом всех возможных экспериментальных ошибок, число мест связывания определяют, решая уравнение

$$\varepsilon^2 StV(R_0 - Kd)^2 + (R_0 - Kd) - 4Kd = 0,$$

где S — удельная радиоактивность меченого соединения; t — оптимальное время регистрации числа радиоактивных распадов; V — объем инкубационной смеси; ε — максимальная ошибка определения P . В пределе $\varepsilon \rightarrow 0$, $[R_0] \rightarrow 3/Ka$.

2. Если предположить, что процесс регистрации протекает по схеме (3.29), но при этом $Ka \neq Ka^*$, то оптимальные условия проведения эксперимента задаются более сложным образом, чем это было рассмотрено выше [2].

Если предположить, что максимальную ошибку в определение P_0 вносит статистика подсчета числа радиоактивных распадов, то оптимальное число связывающих мест задается соотношением

$$[R_0] = \frac{P_0}{Ka^*} (2 + P_0),$$

где P_0 определяется уравнением

$$Ka^* \frac{1}{P_0} \left[\frac{1}{P_0^{3/2}} + \frac{2}{P_0^{1/2}} + 1 \right] - Ka \left[\frac{1}{P_0^{3/2}} + \frac{2}{P_0} + 1 \right] = 0. \quad (3.31)$$

Таким образом, при $Ka \neq Ka^*$ оптимальная чувствительность не соответствует $P_0 = 1$ (рис. 3.69). Например, при $Ka/Ka^* = 10$ оптимальная чувствительность наблюдается при $P_0 = 1/13$.

При учете других экспериментальных ошибок значение P_0 будет также определяться величиной ε . При этом на практике

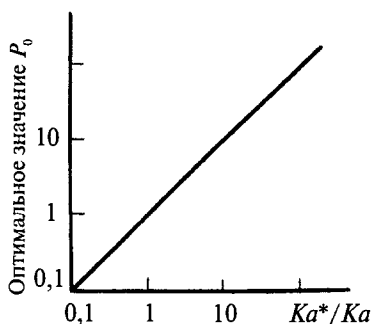


Рис. 3.69. Влияние соотношения констант ассоциации меченого и немеченого лигандов на оптимальное значение P_0 [33].

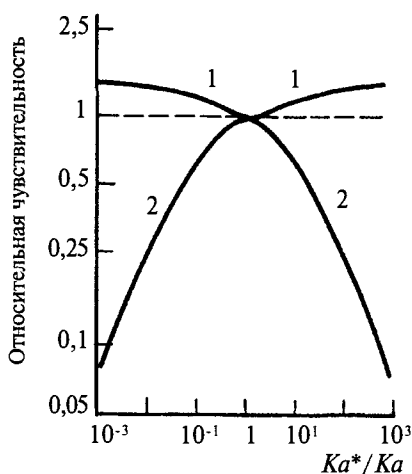


Рис. 3.70. Влияние соотношения констант ассоциации меченого и немеченого лиганда на относительную чувствительность конкурентного метода анализа [33].

1 — анализ проводится в оптимальных условиях по P_0 (уравнение 3.31); 2 — анализ проводится при $P_0 = 1$.

анализы проводят при $P_0 = 1$, так как при этом ϵ минимальна.

Как показал соответствующий расчет, в условиях, когда экспериментальная ошибка определяется ошибкой определения числа радиоактивных распадов, использование меченого соединения с константой связывания выше или ниже константы связывания определяемого соединения приводит к повышению чувствительности анализа, если оптимальные условия для P_0 задаются соотношением (3.31) (рис. 3.70, кривая 1). Если анализ проводится при $P_0 = 1$, то увеличение или понижение констант связывания приводит к уменьшению чувствительности (рис. 3.70, кривая 2).

При наличии в системе других экспериментальных ошибок ϵ , помимо ошибки регистрации числа радиоактивных распадов, повышение чувствительности наблюдается при Ka^* несколько выше, чем Ka (рис. 3.71). При $Ka^* > 10Ka$ наблюдается понижение чувствительности. Таким образом, условия проведения эксперимента надо подбирать так, чтобы Ka^* в несколько раз превосходило Ka .

Специфичность и кросс-реактивность при конкурентном анализе

Одним из требований, предъявляемых к конкурентному анализу, является *специфичность* по отношению к определяемому соединению. *Специфичность метода анализа характеризуется от-*

носительной способностью к вытеснению меченого лиганда тем или иным соединением и самим определяемым веществом $K = La/L_0$, где La — общая концентрация соединения, используемого для проверки специфичности метода анализа (как правило, это вещество, близкое по строению или структуре к определяемому), приводящая к вытеснению меченого лиганда в той же степени, что и общая концентрация определяемого соединения L_0 (рис. 3.72).

Показано, что в общем случае [2]

$$K = \frac{\left[1 + \frac{Ka}{Ka^*} P\right] Kac}{\left[1 + \frac{Kac}{Ka^*} P\right] Ka},$$

где Ka^* — константа ассоциации меченого соединения; Kac — константа ассоциации соединения, определяемого при анализе; Ka — константа ассоциации соединения, использованного для проверки специфичности метода, P — параметр связывания, соответствующий концентрациям La и Lac , $P = [\overline{L^*R}]/[\overline{L^*}]_0$.

При $Ka^* = Kac$

$$K = \left(1 - \frac{[\overline{L^*R}]}{[\overline{L^*}]_0}\right) \frac{Kac}{Ka} + \frac{[\overline{L^*R}]}{[\overline{L^*}]_0}.$$

Следовательно, специфичность зависит от параметра $[\overline{L^*R}]/[\overline{L^*}]_0$. Поэтому желательно определять специфичность в максимально стандартных условиях и, если возможно, в одной экспериментальной серии. Также целесообразно для определения чувствительности использование инвариантной величины Kac/Ka .

С проблемой специфичности самым тесным образом связана проблема *кросс-реактивности* — вытеснения меченого лиганда не только определяемым соединением, но и другими лигандами.

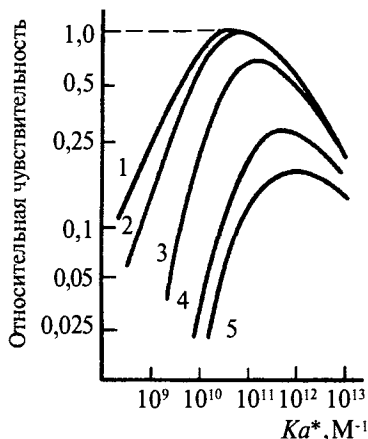


Рис. 3.71. Зависимость относительной чувствительности конкурентного метода анализа от константы ассоциации меченого лиганда (константа ассоциации немеченого лиганда равна 10^{11} М⁻¹) при наличии в системе экспериментальных ошибок ε (%).
1 — 0; 2 — 0,1; 3 — 1; 4 — 5; 5 — 10 [33].

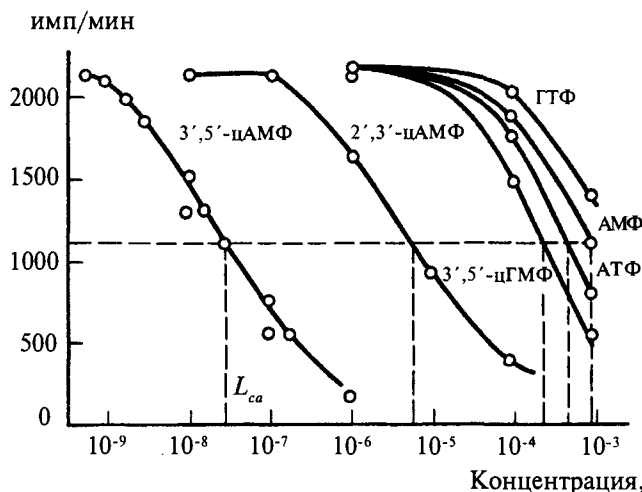


Рис. 3.72. Конкурентное ингибирование нуклеотидами связывания меченого ^{125}I -метилового эфира сукцинил-цАМФ-тирозина с антителами к цАМФ (данные работы *Steiner et al.*, 1969).

Кросс-реактивность приводит к двум нежелательным последствиям:

1. Определяемая по калибровочной кривой концентрация искомого лиганда не соответствует истинной.
2. Положительную реакцию на искомый лиганд могут дать объекты, в которых этот лиганд отсутствует.

Кросс-реакции, как правило, связаны с присутствием в анализируемой системе фрагментов лигандов, их предшественников и т.п. Проблема кросс-реактивности часто возникает при использовании сывороточных антител, так как сыворотка представляет собой набор гетерогенных антител.

Одним из критериев на идентичность определяемого лиганда в образце со стандартным препаратом является тест на параллельность кривых разведения. Однако это весьма грубый тест. Кроме того, на практике бывает весьма трудно заметить отсутствие параллельности кривых. Поэтому для подтверждения идентичности определяемого лиганда со стандартным препаратом часто проводят анализ с использованием нескольких тест-систем (в частности, для иммуноанализа с использованием нескольких сывороток). Совпадение результатов в этом случае — более обоснованное указание на совпадение определяемого лиганда со стандартным.

Следует отметить, что выявлению кросс-реактивности спо-

собствует также использование нескольких меченых лигандов. Поскольку относительно маловероятно, что кросс-реактивное соединение будет одинаково конкурировать с каждым центром связывания с различным лигандом, то совпадение результатов кривых разведения в этом случае более надежно свидетельствует о совпадении определяемого лиганда со стандартным.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие виды взаимодействия двух лигандов вы знаете? Как их дискриминировать? 2. Выведите уравнение двойных обратных координат. 3. Какие виды антагонизма вы знаете? 4. Напишите основные уравнения кинетики конкурентного комплексообразования. 5. Определите кинетические и равновесные константы конкурентными методами. 6. Каковы принципы конкурентного анализа? 7. Перечислите основные виды конкурентных методов анализа. 8. Дайте определение чувствительности и специфичности методов анализа. Какие методы повышения чувствительности и специфичности вы знаете? 9. Дайте определение кросс-реактивности. С помощью каких тестов можно выявить наличие (отсутствие) кросс-реактивности?

3.5. Влияние различных факторов на связывание лигандов с рецепторами

Лучшее исследование происходит тогда, когда я делаю то, о чем не знаю, что я делаю.

К. Браун

До сих пор было рассмотрено лиганд-рецепторное взаимодействие в предположении, что условия проведения кинетического эксперимента остаются постоянными. Однако если мы хотим изучать свойства рецепторов не только *in vitro*, но и *in vivo*, то мы должны отказаться от подобного предположения. Это связано с тем, что при развитии различных состояний организма может изменяться температура тела, pH или ионная сила растворов, в том числе и в микроокружении рецепторов.

Кроме того, в § 3.3 уже обсуждался вопрос о разграничении процессов рецепции, деградации и транспорта лигандов. Одним из методов дискриминации этих механизмов был метод изменения условий проведения эксперимента. Поэтому в рамках настоящего параграфа на примере опиатных рецепторов будут рассмотрены вопросы влияния ионов металлов, температуры и pH на связывание лигандов с рецепторами.

Влияние ионов металлов на рецепторное связывание

Влияние ионов металлов на рецепторное связывание описано практически для всех рецепторных систем [5]. При этом ионы одних металлов способны специфически связываться только с рецепторами строго определенных типов, другие же ионы влияют практически на все рецепторы.

Пример 3.11. В работе [44] изучали связывание динорфина с мембранами головного мозга крыс при $\text{pH} = 7,5$ в присутствии и отсутствии 1 мМ ЭДТА (динатриевая соль этилен-диамин-N, N, N', N'-тетра-уксусной кислоты). Результаты представлены в табл. 3.14. Определить механизм влияния ионов металлов на рецепторное связывание.

Из таблицы видно, что ЭДТА действительно оказывает влияние на рецепторное связывание. Это говорит о том, что эндогенные ионы участвуют в формировании центра рецепторного связывания динорфина. Для определения механизма этого влияния представим экспериментальные данные в двойных обратных координатах (рис. 3.73). Как следует из рисунка, влияние ионов металлов протекает с изменением аффинности мест связывания и без изменения их числа.

Механизмы влияния ионов металлов на рецепторное связывание будут рассмотрены ниже.

Рассмотрим закономерности влияния ионов металлов и методы их изучения на двух примерах из [5]: связывание [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина и морфина с опиоидными рецепторами.

Таблица 3.14

Связывание динорфина с мембранами мозга крыс

Количество добавленного динорфина, нМ	Количество связанного динорфина, фмоль на 1 г ткани (в присутствии ЭДТА)
0,25	9,43 (4,63)
0,5	11,90 (8,40)
2	22,22 (20,0)
3	26,32 (25,0)
5	43,48 (30,1)
7	43,48 (32,7)
9	43,48 (33,3)

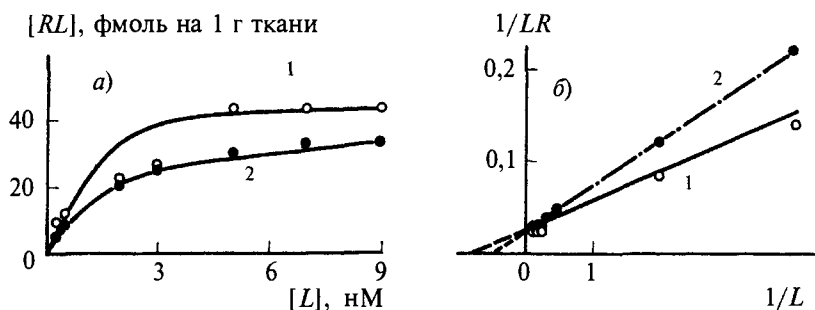


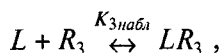
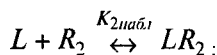
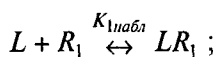
Рис. 3.73. Связывание динорфина с мембранами мозга крыс в присутствии (2) и отсутствии (1) 1 мМ ЭДТА.

а — экспериментальные данные; *б* — спрямление экспериментальных данных в двойных обратных координатах.

Влияние ионов щелочно-земельных и переходных металлов на рецепцию [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина

Для выяснения роли эндогенных двухвалентных катионов в процессе комплексообразования [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ) с опиоидными рецепторами головного мозга было исследовано влияние прединкубации препаратов со специфическими комплексодами — ЭДТА и ЭГТА [5]. После инкубации мембран в растворах хелаторов (10 мМ) с последующей отмывкой уровень рецепторного связывания ДАДЛЭ снижался в 2–3 раза в равной степени для ЭГТА и ЭДТА. Представляло интерес определить, на какие параметры связывания рецептора с лигандом оказывает влияние прединкубация с хелаторами.

С этой целью изучалось комплексообразование ДАДЛЭ с препаратами мембран, прединкубированных с 10 мМ ЭГТА. Данные экспериментов обрабатывались с использованием подходов, описанных в § 3.1, 3.3 и 3.4. Как показал проведенный анализ, связывание ДАДЛЭ с мембранами головного мозга как в присутствии хелаторов, так и в их отсутствие описывается моделью с тремя независимыми центрами связывания:



где аффинность центров убывает в порядке их нумерации (R_1 —

**Влияние прединкубации мембранного препарата головного мозга крыс
на параметры связывания ДАДЛЭ (37°C)**

Препарат мембран	Константы диссоциации, нМ			Концентрация центров связывания, пмоль на 1 мг белка		
	$K_{1набл}$	$K_{2набл}$	$K_{3набл}$	$[R_1]_0$	$[R_2]_0$	$[R_3]_0$
Контрольный	0,56	4,9	127	0,0027	0,051	0,179
Прединкубирован- ный с ЭГТА	0,53	17,3	130	0,0030	0,057	0,170

супервысокоаффинный центр; R_2 — высокоаффинный центр; R_3 — низкоаффинный центр); $K_{1набл}$ — наблюдаемые константы диссоциации. Супервысокоаффинный центр соответствует δ_1 -опиоидным рецепторам, высокоаффинный центр — δ -опиоидным рецепторам, низкоаффинный центр — μ -опиоидным рецепторам.

Были рассчитаны параметры рецепторного связывания в присутствии и отсутствии хелаторов (табл. 3.15). Как следует из таблицы, эндогенные ионы металлов оказывают влияние только на $K_{2набл}$.

Как показали литературные данные, из всех ионов щелочно-земельных и переходных металлов наиболее важными для функционирования мембранно-связанных (в частности, опиоидных) рецепторов являются ионы Ca^{++} , Mn^{++} и Mg^{++} . Поэтому в работе [5] было в первую очередь изучено влияние именно этих ионов металлов на рецепцию.

Результаты исследований влияния эффектов ионов кальция и марганца на связывание ДАДЛЭ с мембранами мозга крыс показали наличие процессов «активации» связывания в присутствии этих ионов (табл. 3.16). Этот процесс обратим. Действительно, отмывка мембранного препарата рецепторов от добавленных ионов путем промывания в буфере приводит к снижению эффекта «ионной активации», а промывка 3 мМ ЭДТА полностью снимает этот эффект.

Результаты исследования влияния ионов кальция и марганца на процессы равновесного комплексообразования ДАДЛЭ с рецепторами, представленные в табл. 3.17, позволяют сделать следующие выводы:

1. Ионы металлов практически не влияют на концентрацию ДАДЛЭ связывающих центров.

2. Добавление ионов кальция и марганца не оказывает влияния на связывание ДАДЛЭ с супервысокоаффинным центром

Таблица 3.16

**Обратимость эффектов ионов металлов на связывание ДАДЛЭ
с мембранами мозга (37°C)**

Условия	Уровень связывания (число радиоактивных распадов в минуту)						
	без солей	1 мМ CaCl ₂	1 мМ MgCl ₂	0,5 мМ MnCl ₂	0,15 мМ LaCl ₂	20 мкМ ZnCl ₂	50 мкМ NiCl ₂
В присутствии солей металлов	1960	2500	3200	5780	3500	270	3780
После отмывки буфером	1850	220	2700	2950	1800	1450	2860
После отмывки ЭДТА	1780	1750	2050	1810	1550	1700	2000

связывания и не изменяет число мест связывания этого лиганда.

3. В присутствии ионов кальция и магния повышается сродство данного лиганда к высокоаффинному (δ) рецептору. Сродство к низкоаффинному (μ) рецептору повышается только в присутствии ионов марганца.

Характер изменения значений констант диссоциации комплексов ДАДЛЭ с δ - и μ -опиоидными рецепторами при увеличении концентраций ионов кальция и марганца в среде показан на рис. 3.74 и 3.75. Значения $K_{2набл}$ гиперболически уменьшаются в присутствии низких концентраций этих ионов и возрастают при концентрации ионов более 10 мМ. Последнее может быть связа-

Таблица 3.17

**Влияние ионов металлов на связывание ДАДЛЭ
с мембранами головного мозга (37°C)**

Препарат мембран	Константа диссоциации, нМ			Концентрация центров связывания, пмоль на 1 мг белка		
	$K_{1набл}$	$K_{2набл}$	$K_{3набл}$	$[R_1]_0$	$[R_2]_0$	$[R_3]_0$
Контрольный	0,56	4,9	127	0,0027	0,051	0,179
Прединкубированный с ЭГТА	0,47	17,2	120	0,0029	0,058	0,179
Прединкубированный с ЭГТА+5 мМ CaCl ₂	0,50	3,98	109	0,0035	0,060	0,159
Прединкубированный с ЭГТА+1 мМ MnCl ₂	0,41	4,1	16	0,0039	0,063	0,164

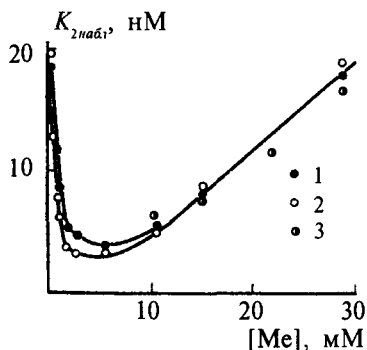


Рис. 3.74. Эффект ионов кальция (1) и марганца (2), ионной силы раствора (3) на константу диссоциации ДАДЛЭ с высокоаффинными рецепторами мембран головного мозга

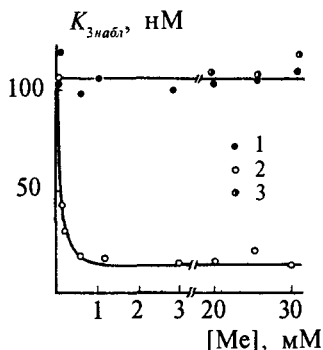


Рис. 3.75. Эффект ионов кальция (1), марганца (2) и ионной силы раствора (3) на константу диссоциации ДАДЛЭ с низкоаффинными рецепторами мембран головного мозга

но с увеличением эффекта ионной силы раствора. Действительно, добавление к 5 мМ CaCl_2 5 мМ KCl оказывает сходные эффекты (рис. 3.74, кривая 3), несмотря на то что ионы калия не оказывают специфического влияния на опиоидные рецепторы.

Катионы кальция и ионная сила раствора не влияют на связывание ДАДЛЭ с μ -опиоидными рецепторами. Между тем влияние ионов марганца на μ -опиоидные рецепторы сходно с таковым на δ -опиоидные рецепторы (рис. 3.75).

Определение механизма влияния ионов металлов на процессы комплексообразования [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с рецепторами

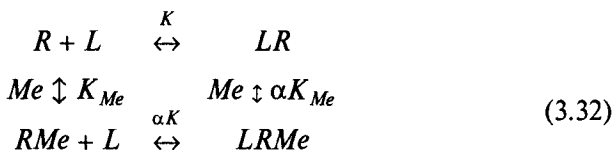
Активирующее влияние ионов металлов на сродство [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ) к мембранным рецепторам может быть следствием:

- 1) связывания ионов металлов с молекулой рецептора;
- 2) комплексообразования ионов металла с молекулой лиганда с образованием активного конформационного комплекса.

Для исключения процесса комплексообразования ионов металлов с лигандом были проведены специальные эксперименты. Во-первых, с помощью специальных Ca^{++} селективных электродов измеряли концентрацию ионов кальция в присутствии и отсутствии ДАДЛЭ. Было показано, что ДАДЛЭ не оказывает влияния на концентрацию ионов кальция. Во-вторых, с помощью ме-

тогда кругового дихроизма было показано, что ДАДЛЭ в присутствии ионов кальция не меняет свою конформацию.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что *при концентрациях ионов, которые оказывают влияние на рецепцию ДАДЛЭ, процесс их комплексообразования с данным лигандом не происходит.* Это позволяет предположить, что *изменение параметров рецепторного связывания ДАДЛЭ ионами металлов связано со взаимодействием ионов металлов с рецепторами.* Данное взаимодействие носит обратимый характер. Схема взаимодействия ионов металлов с рецепторами аналогична приведенной в примере 3.10:



Показано, что для схемы (3.32) зависимость концентрации комплекса «лиганд–рецептор» от концентрации лиганда имеет следующий вид [5]:

$$B = [LR] + [LRMe] = [R_0] [L]/(K_{набл} + [L]), \quad (3.33)$$

где

$$K_{набл} = \frac{\alpha K ([Me] + K_{Me})}{[Me] + \alpha K_{Me}}.$$

С использованием этих соотношений можно по известной зависимости наблюдаемых констант диссоциации от концентрации ионов определить все параметры схемы (3.32). На практике для анализа используют следующие обстоятельства. При $[Me] = 0$ $K_{набл} = K$. Связывание лиганда с «безметальной» формой рецептора характеризует $K_{набл}$. При $[Me] \rightarrow \infty$ $K_{набл} = \alpha K$.

Выражение (3.33) можно линеаризовать в координатах

$$1/K_{набл} = K_{Me} \{ (1/K - 1/K_{набл})/[Me] \} + 1/\alpha K \quad (3.34)$$

и по зависимости $1/K_{набл}$ от $(1/K - 1/K_{набл})/[Me]$ определить все параметры схемы (3.32) (рис. 3.76). При этом тангенс угла наклона равен константе диссоциации комплекса «металл–рецептор». Как следует из рис. 3.76, экспериментальные данные хорошо линеаризуются в координатах уравнения (3.34). Следовательно, механизм связывания ДАДЛЭ с мембранами мозга соответствует схеме (3.32).

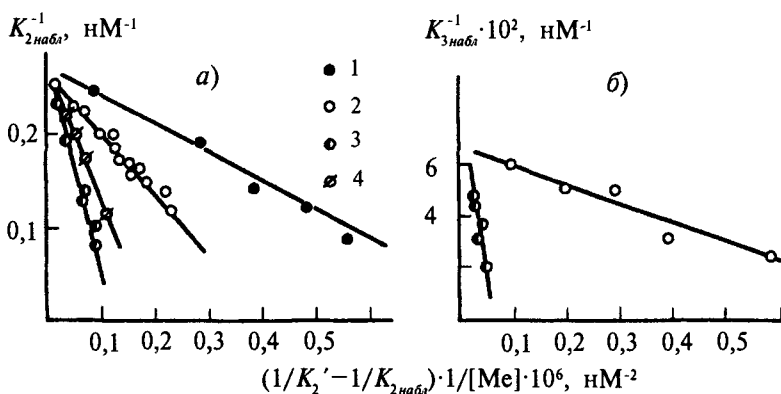


Рис. 3.76. Эффект влияния ионов Ca^{++} (1), Mn^{++} (2), Mg^{++} (3) Sr^{++} (4) на связывание ДАДЛЭ с высокоаффинным (а) и низкоаффинным (б) центрами связывания в координатах уравнения, определяемых выражением (3.34).

Помимо влияния ионов кальция и марганца, было также рассмотрено влияние ионов Mg^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , La^{+++} и др. (табл. 3.18). Проведенный анализ показал, что:

1. Эти ионы металлов не оказывают влияния на супервысокоаффинный (δ_1) опиоидный рецептор.

2. Существует гиперболический характер изменения наблюдаемых констант диссоциации при повышении концентраций ионов.

3. Эффекты ионов металлов обратимы.

4. Процесс комплексообразования ионов металлов и ДАДЛЭ отсутствует.

На основании данных табл. 3.18 были сделаны следующие выводы:

1. Существует по меньшей мере три группы металлов, различающихся по способности активировать опиоидные рецепторы:

- а) ионы, активирующие связывание ДАДЛЭ с δ - и μ -опиоидными рецепторами (магний, марганец, лантаноиды);

- б) ионы, активирующие связывание ДАДЛЭ с δ -опиоидными рецепторами (кальций, цезий);

- в) ионы, активирующие связывание ДАДЛЭ с μ -опиоидными рецепторами (кобальт, никель).

2. Значение параметра α для каждого типа рецептора практически совпадает. Это позволяет предположить наличие специфического катионсвязывающего участка на соответствующих суб-

**Влияние ионов металлов на связывание ДАДЛЭ
с мембранами головного мозга (37° С)**

Ион металла	Высокоаффинный (δ) рецептор		Низкоаффинный (μ) рецептор	
	K_{Me} , мкМ	α^{-1}	K_{Me} , мкМ	α^{-1}
Ca ⁺⁺	1050	4,3	2200	1,0
Sr ⁺⁺	1400	3,3	He опр.	He опр.
Mn ⁺⁺	210	4,2	70	7,4
La ⁺⁺⁺	40	3,7	210	7,6
Nd ⁺⁺⁺	11	3,5	50	5,7
Sm ⁺⁺⁺	2,1	3,8	22	6,3
Eu ⁺⁺⁺	2,9	2,8	8	6,0
Cd ⁺⁺⁺	1,4	3,9	5	6,4
Co ⁺⁺	5000	He опр.	4,8	6,2
Ni ⁺⁺	5000	He опр.	1,8	5,9

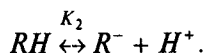
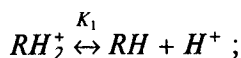
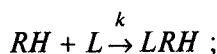
типах рецепторов, в состав которого может входить ионогенная группа. Для проверки этого предположения в работе [5] было исследовано влияние рН на параметры связывания ДАДЛЭ с мембранами мозга.

Влияние рН на параметры рецепторного связывания

Зависимость параметров рецепторного связывания от рН среды обычно имеет сложный, «колоколообразный» вид (см. § 1.4).

Пример 3.12. В работе [5] изучали кинетику связывания ДАДЛЭ ([D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина) с мембранами мозга в зависимости от рН среды. Результаты представлены в табл. 3.19. Определить параметры рН-зависимости.

Как следует из рис. 3.77, данная рН-зависимость имеет сложный колоколообразный вид. Схему влияния рН на рецепторное связывание можно представить следующим образом:



Зависимость $\log k_{\text{эф}}$ от pH среды при взаимодействии ДАДЛЭ с мембранами мозга (высокоаффинный центр связывания) (37°C)

pH	$\log k_{\text{эф}}$	pH	$\log k_{\text{эф}}$
5	7	7,2	8
5,5	7,5	7,3	7,9
6	8	7,4	7,8
6,2	8,2	7,5	7,6
6,5	8,3	7,6	7,4
7	8,2	7,7	7,2
7,1	8,1	7,8	7

Аналогично рассмотренному в § 1.4, из графика (рис. 3.77) находим: $\log k = 8,4$, $pK_1 = 6,4$, $pK_2 = 7,1$ или: $k = 2,51 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $K_1 = 4 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, $K_2 = 8 \cdot 10^{-8} \text{ М}$.

Проведенное в работе [5] исследование показало, что изменение pH в диапазоне от 5,5 до 8,0 не оказывает влияния на супервысокоаффинный центр связывания ДАДЛЭ. Изменение концентрации мест связывания также не наблюдается. Однако происходит изменение $K_{2\text{набл}}$ от 4,4 нМ при pH 6,8 до 59 и 40 нМ при pH 8,0 и 5,5 соответственно, а $K_{3\text{набл}}$ — от 111 нМ при pH 6,8 до 557 и 512 нМ при pH 8,0 и 5,5 соответственно.

Была изучена обратимость влияния ионов водорода на параметры рецепторного связывания [5]. Показано, что при $\text{pH} < 6,0$ изменения параметров рецепторного связывания ДАДЛЭ с мембранами мозга частично необратимы; а при $\text{pH} > 6,0$ — обратимы.

Механизм влияния ионов металлов на процесс комплексообразования [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с μ -опиоидными рецепторами

С целью выяснения механизма катионной активации связывания [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ) было исследовано влияние ионов водорода в диапазоне pH 6,2–8,3 на параметры связывания в присутствии и отсутствии ионов металлов.

Анализ экспериментальных данных (рис. 3.78) показал, что процесс низкоаффинного связывания (с μ -опиоидными рецепторами) контролируется ионогенной группой с $pK_a = 7,9$. Поскольку группы с такими значениями pK_a могут присутствовать как в лиганде, так и в рецепторе, было проведено титрование

ДАДЛЭ в указанном диапазоне рН, которое показало, что pK_a ДАДЛЭ равно 7,9 (по-видимому, за счет N-концевого тирозина). Полученные данные позволили предположить, что увеличение $K_{3набл}$ при переходе к щелочной среде обусловлено депротонированностью N-концевой группы ДАДЛЭ.

Добавление ионов кальция в концентрациях до 5 мМ не повлияло на характер рН-зависимости связывания ДАДЛЭ с μ -рецепторами. Присутствие ионов марганца в концентрации 2 мМ приводило к сильному смещению рН-зависимости в сторону более низких значений констант диссоциации. Было также исследовано влияние ионов никеля, которые активируют только низкоаффинный центр связывания ДАДЛЭ (μ -опиоидный рецептор). Было показано, что зависимость кон-

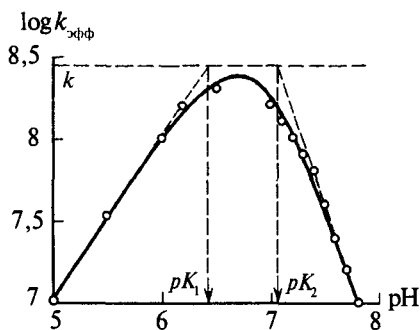


Рис. 3.77. Определение параметров рН-зависимости связывания ДАДЛЭ с мембранами мозга.

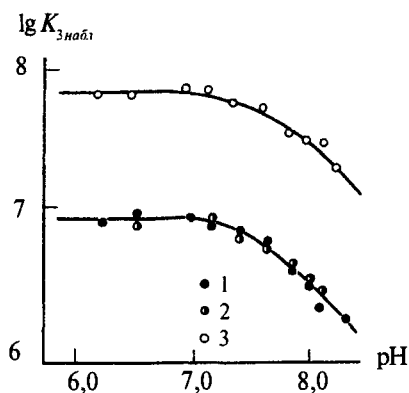


Рис. 3.78. Влияние ионов металлов на рН-зависимость константы диссоциации ДАДЛЭ с низкоаффинным центром связывания.

1 — препарат, прединкубированный с ЭГТА; 2 — то же, что (1) + 5 мМ $CaCl_2$; 3 — то же, что (1) + 2 мМ $MnCl_2$, 37°C.

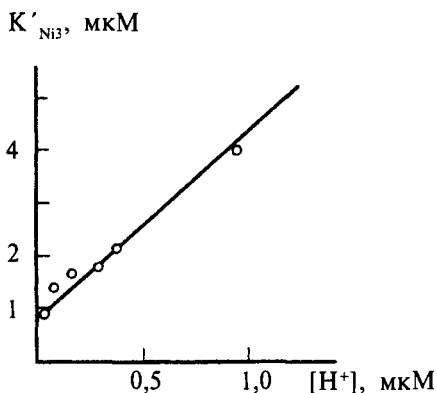
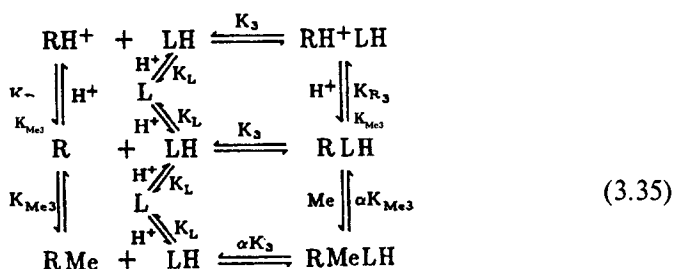


Рис. 3.79. Влияние ионов водорода на константу диссоциации комплекса иона никеля с низкоаффинным центром связывания ДАДЛЭ (μ -рецептор).

станты диссоциации никеля с опиоидными рецепторами линейно зависит от рН среды (рис. 3.79). Следовательно, имеется конкурентное связывание ионов водорода и ионов металлов с низкоаффинным центром связывания ДАДЛЭ.

Проведенный комплекс исследований и полученные результаты позволяют предположить следующую схему влияния рН и ионов металлов на связывание ДАДЛЭ с низкоаффинными центрами связывания мембран мозга (μ -опиоидный рецептор):



где K_3 — «истинная» равновесная константа, характеризующая сродство LH формы лиганда L к рецептору R ; K_{Me3} — константа диссоциации комплекса иона со свободным рецептором; α — параметр, характеризующий влияние комплексообразования иона металла с рецептором на константу K_3 ; K_L — константа ионизации лиганда; K_{R3} — константа ионизации катионсвязывающего центра μ -опиоидного рецептора.

Можно показать, что в соответствии со схемой (3.35) выражение для наблюдаемой константы диссоциации запишется следующим образом:

$$K_{3набл} = \alpha K_3 \frac{([Me] + K'_{Me3})(1 + K_L / [H^+])}{[Me] + \alpha K'_{Me3}},$$

$$K'_{Me3} = K_{Me3} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{R3}} \right). \quad (3.36)$$

Таким образом, анализ схемы (3.35) позволяет определить значения «истинной» константы диссоциации, характеризующей взаимодействие лиганда в форме LH с низкоаффинным рецептором. Она составляет 100 нМ. Константы комплексообразования ионов металлов при рН 7,4 близки к приводимым в табл. 3.18.

Выше было показано, что ионы кальция не оказывают влияния на $K_{\text{набл}}$ при всех исследованных значениях pH. Были проведены соответствующие эксперименты по определению механизма взаимодействия этих ионов с μ -опиоидными рецепторами (рис. 3.80). Показано, что константа, характеризующая действие иона марганца на μ -опиоидные рецепторы (K'_{Mn3}), линейно увеличивается с увеличением концентрации ионов кальция. Это свидетельствует о конкурентном характере ингибирования эффектов ионов марганца ионами кальция.

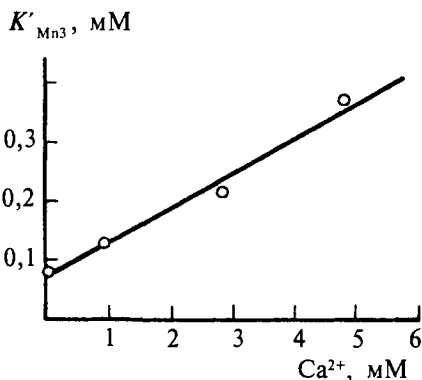


Рис. 3.80. Зависимость эффективной константы диссоциации комплекса марганца с низкоаффинными рецепторами от концентрации ионов кальция.

Полученные данные позволяют сделать ряд заключений:

1. Активирующее влияние ионов металлов на связывание ДАДЛЭ с μ -опиоидными рецепторами происходит при их комплексообразовании с катионсвязывающим участком рецептора, что приводит к уменьшению константы диссоциации комплекса рецептора с пептидом.

2. При протонировании ионогенных групп катионсвязывающего участка рецептора, так же как и при связывании ионов кальция с ним, параметры низкоаффинного связывания ДАДЛЭ не меняются. Однако оба эти процесса конкурируют с процессами связывания ионов магния, марганца, никеля, кобальта, лантаноидов и других с рецепторами. Следовательно, указанные катионы связываются с одной и той же функциональной группой рецептора, при этом эффективными активаторами низкоаффинной рецепции ДАДЛЭ являются только ионы переходных металлов (d- и f-элементы).

Механизм влияния ионов металлов на процесс взаимодействия [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с δ -опиоидными рецепторами

Для выяснения механизма действия ионов металлов на связывание [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ) с высокоаф-

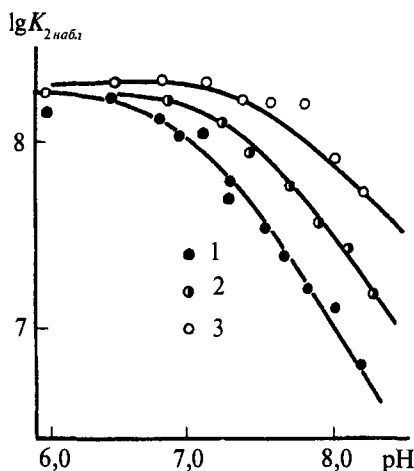


Рис. 3.81. Влияние ионов кальция на рН-зависимость константы диссоциации ДАДЛЭ с δ -опиоидными рецепторами.

1 — препарат, прединкубированный с ЭГТА; 2 — то же, что (1) + 6 мМ CaCl_2 ; 3 — то же, что (1) + 5 мМ CaCl_2 . (37°C).

финными местами связывания (δ -опиоидные рецепторы) исследованы рН-зависимости $K_{2\text{набл}}$ при различных концентрациях ионов кальция, селективно повышающих сродство к данному типу мест связывания (рис. 3.81).

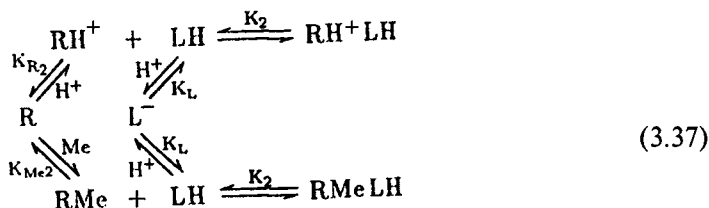
Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Присутствие в среде ионов кальция приводит к тому, что уменьшение сродства рецепторов к лиганду происходит при более высоких значениях рН.

2. Ионы кальция не влияют на минимальное значение $K_{2\text{набл}}$.

Согласно проведенным расчетам кривые на рис. 3.81 соответствуют кривым титрования с $pK_a = 7,9$, что отражает процесс ионизации лиганда (см. выше).

Однако взаимодействие ДАДЛЭ с высокоаффинными рецепторами (δ -опиоидные рецепторы) контролируется еще одной ионогенной группой с $pK_2 = 7,0$. Как следует из данных по титрованию ДАДЛЭ, молекула лиганда не содержит подобного ионогенного центра. Можно предположить, что данный центр содержит рецептор. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о конкуренции ионов кальция с протонами за эту ионогенную группу. Таким образом, процесс взаимодействия ДАДЛЭ с δ -опиоидным рецептором в присутствии ионов металлов можно представить в виде следующей схемы:



**Истинные равновесные константы диссоциации комплексонов металлов
с δ -опиодными рецепторами**

Ион	Ca ⁺⁺	Sr ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Mg ⁺⁺	La ³⁺	Nd ³⁺	Sm ³⁺	Eu ³⁺	Cd ³⁺	Co ⁺⁺	Ni ⁺⁺
K_{Me2} , мкМ	370	510	75	850	17	4	0,9	1,0	0,54	5000	5000

где K_{R2} — истинная константа ионизации ионогенной группы рецептора, K_2 — истинная константа диссоциации лиганд-рецепторного комплекса.

Можно показать, что в соответствии со схемой (3.37) поведение системы описывается уравнениями:

$$K_{2набл} = K_2 \frac{\left(1 + \frac{K_L}{[H^+]}\right) \left\{ K_{Me2} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{R2}}\right) + [Me] \right\}}{K_{Me2} \frac{[H^+]}{K_{R2}} + [Me]}; \quad (3.38)$$

$$\alpha = \frac{\frac{[H^+]}{K_{R2}}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{R2}}}; \quad K'_{Me} = K_{Me2} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{R2}}\right).$$

Вычисленное в соответствии с описанными выше методами значение $1/\alpha$ равно 3,95 и близко к значениям $1/\alpha$, приведенным в табл. 3.18. В пользу схемы (3.37) также свидетельствуют показанные на рис. 3.82 экспериментальные данные. В соответствии с уравнением (3.38) константа K'_{Me2} должна линейно зависеть от концентрации ионов водорода. Это согласуется с экспериментальными данными

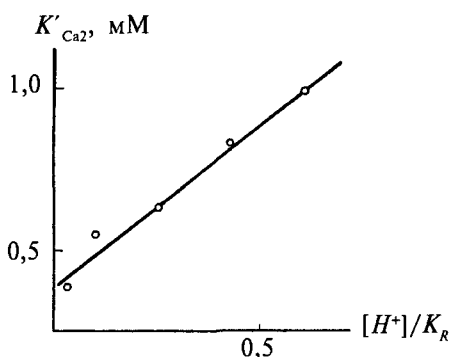


Рис. 3.82. Зависимость константы диссоциации комплекса ионов кальция с высокоаффинным центром связывания ДАДЛЭ от концентрации ионов водорода.

ми, приведенными на рис. 3.82. Подобным образом определены константы диссоциации других металлов (табл. 3.20).

Таким образом, ионы металлов по-разному влияют на взаимодействие ДАДЛЭ с высоко- и низкоаффинными центрами связывания. При этом на сродство рецепторов к металлам оказывает влияние концентрация ионов водорода в среде.

Ионы цинка и верапамил как ингибиторы связывания [D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина с δ -опиоидными рецепторами

Выше было подробно проанализировано влияние ионов двух- и трехвалентных металлов на высоко- и низкоаффинные места связывания [D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ). Противоположными ингибиторными эффектами обладают ионы Zn^{++} и верапамил. Механизмы их действия рассмотрены ниже.

Соответствующие экспериментальные результаты, приведенные на рис. 3.83, позволяют сделать следующие выводы:

1. Ионы цинка не влияют на связывание ДАДЛЭ с низкоаффинным центром связывания (μ -опиоидные рецепторы) вплоть до концентраций 25 мкМ и ингибируют связывание ДАДЛЭ с высокоаффинными центрами (δ -опиоидные рецепторы) с $IC_{50} = 7$ мкМ.

2. Ионы цинка не меняют значение константы диссоциации ионов кальция с высокоаффинным центром связывания. Следова-

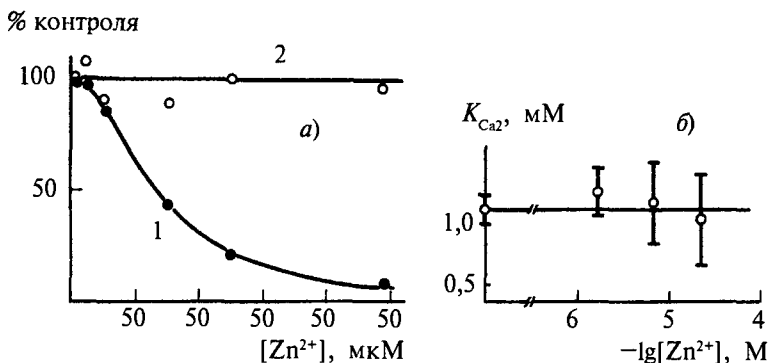


Рис. 3.83. Эффект влияния ионов цинка на связывание ДАДЛЭ с высокоаффинными (1) и низкоаффинными (2) центрами связывания (а) (в % от связывания в отсутствии цинка) и на константу диссоциации комплекса иона кальция с высокоаффинным центром связывания ДАДЛЭ (б).

вательно, ионы цинка не взаимодействуют с описанным выше регуляторным катионсвязывающим участком рецептора.

Экспериментальные данные по влиянию классического антагониста ионов кальция, блокатора кальциевых каналов, верапамила на связывание ДАДЛЭ с опиоидными рецепторами, приведенные на рис. 3.84, позволяют сделать следующие выводы:

1. Верапамил обратимо ингибирует связывание ДАДЛЭ с δ -опиоидным рецептором ($IC_{50} = 0,3 \cdot 10^{-4}$ М).

2. Верапамил не препятствует активирующему влиянию ионов кальция на δ -опиоидный рецептор (не изменяет константу связывания этих ионов с рецептором). Следовательно, ингибирующее действие верапамила опосредовано не через катионсвязывающий участок δ -рецептора.

Механизм регуляции двух- и трехвалентными ионами металлов связывания морфина с опиоидными рецепторами

Влияние ионов металлов на процесс связывания морфина с опиоидными рецепторами было исследовано в монографии [5]. Результаты исследований приведены в табл. 3.21. Они позволяют сделать следующие выводы:

1. Прединкубация с ЭГТА и последующее добавление ионов металлов не влияют на параметры связывания морфина с супер-высокоаффинным центром связывания (δ_1 -опиоидный рецептор).

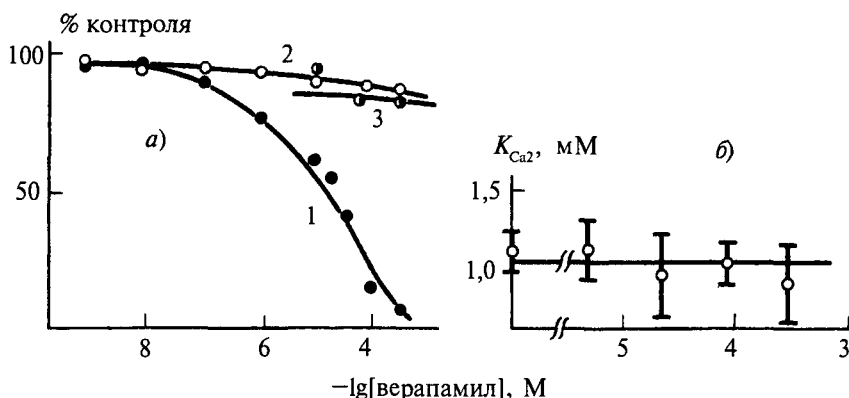


Рис. 3.84. Эффект верапамила на связывание ДАДЛЭ.

1 — с высокоаффинными; 2 — низкоаффинными центрами; 3 — уровень связывания ДАДЛЭ с высокоаффинными центрами после отмывки от верапамила. Влияние верапамила на константу диссоциации ионов кальция с высокоаффинным центром связывания ДАДЛЭ.

Таблица 3.21

**Параметры связывания морфина с супервысоко-
и высокоаффинными центрами связывания**

Условия	Константа диссоциации, нМ		Концентрация центров связывания, пмоль на 1 мг белка	
	$K_{1наб1}$	$K_{2наб1}$	$[R_1]_0$	$[R_2]_0$
Контроль (1)	0,87	13,20	0,0068	0,160
Прединкубация с ЭГТА (2)	0,85	14,50	0,0060	0,155
То же, что (2)+ 1 мМ Mn^{++}	0,80	2,85	0,0054	0,143
То же, что (2)+ 1 мМ Ni^{++}	0,69	2,97	0,0049	0,160
То же, что (2)+ 1 мМ La^{+++}	0,77	3,20	0,0059	0,150
То же, что (2)+ 1 мМ Ca^{++}	0,80	25,30	0,0058	0,155

Примечание. В силу большой ошибки определения параметров низкоаффинного центра связывания морфина параметры этого центра в таблице не приводятся.

2. Ионы металлов влияют на сродство морфина к высокоаффинному центру (μ -опиоидный рецептор). Было показано, что эти ионы не связываются с морфином. Следовательно, их эффект опосредован взаимодействием с катионсвязывающим центром μ -рецепторов.

Линеаризация экспериментальных данных в координатах уравнения (3.34) (рис. 3.85) и характер рН-зависимости (рис. 3.86)

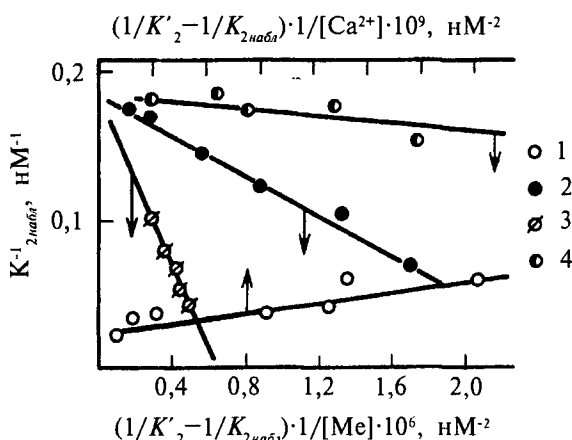


Рис. 3.85. Эффект слияния ионов Ca^{++} (1), Mn^{++} (2), La^{+++} (3), Gd^{+++} (4) на связывание морфина с высокоаффинным центром.

Параметры влияния ионов металлов на процесс связывания морфина с μ -опиоидными рецепторами

Ион металла	Ca^{++}	Mn^{++}	Ni^{++}	La^{+++}	Gd^{+++}
K'_{2Me} , мкМ	2600	75	6,6	270	11
α^{-1}	0,49	5,0	5,4	4,9	4,9

говорят о том, что механизм влияния ионов металлов на процесс связывания морфина с μ -рецепторами аналогичен рассмотренному выше механизму влияния ионов металлов для [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с δ -и μ -рецепторами. На основании этого вывода были рассчитаны параметры взаимодействия ионов металлов с μ -рецепторами (табл. 3.22).

4. Из табл. 3.22 следует, что ионы кальция оказывают угнетающее воздействие на процесс связывания морфина с μ -рецепторами ($\alpha^{-1} < 1$).

О природе катионсвязывающих групп опиоидных рецепторов

Выше было подробно проанализировано влияние pH и ионов металлов на параметры рецепторного связывания опиоидных рецепторов на примере двух веществ: [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (ДАДЛЭ) и морфина. Были определены параметры взаимодействия металлов с опиоидными рецепторами. Рассмотренные данные позволяют сделать ряд выводов о природе катионсвязывающих групп опиоидных рецепторов.

Значения констант диссоциации ионов Ca^{++} и Sr^{++} говорят о сильном взаимодействии этих металлов с δ -рецепторами. В то же время Ni^{++} и Co^{++} крайне слабо взаимодействуют с этими центрами.

Судя по величине $pK_a = 7,0$, такой функ-

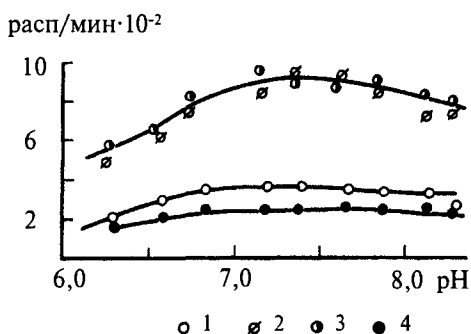


Рис. 3.86. pH-зависимость связывания морфина с высокоаффинными центрами: в отсутствие ионов металлов (1), 5 мкМ NiCl_2 (2), 3 мМ MnCl_2 (3), 5 мМ CaCl_2 (4). 37°C .

циональной группой может быть остаток фосфорной кислоты. Следует заметить, что сходными значениями pK_a могут обладать и другие группы, в зависимости от микроокружения.

Для определенного выявления катионсвязывающих участков был предложен следующий метод. Были построены корреляционные зависимости значений констант диссоциации комплексов ионов металлов с рецептором, найденные выше, от величин констант нестойкости комплексов соответствующих катионов с различными модельными соединениями (аминокислотами и др.), взятыми из литературы [Siller, Martell, 1964; Martell Smith, 1974; Perrin, 1979]. Выводы о природе катионсвязывающих групп делаются на основании коэффициентов корреляции указанных зависимостей. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 3.23 и на рис. 3.87. Видно, что коэффициенты корреляции, близкие к единице, наблюдаются в случае δ -рецептора для аниона HPO_4^{2-} и фосфосерина. Таким образом, представленные данные указывают на участие фосфатной группы с регуляцией связывания лигандов с рецепторами.

Возникает вопрос: в состав какой молекулы (остатка) входит фосфатная группа? Это может быть фосфорилированный остаток серина или треонина, и тогда встает вопрос: как и с помощью каких протеинкиназ он фосфорилируется и какими фосфатазами он дефосфорилируется? Фосфатная группа может также

Таблица 3.23

Коэффициенты линейной корреляции зависимостей констант диссоциации комплексов металлов с центрами связывания от логарифмов констант нестойкости комплексов соответствующих ионов металлов с модельными лигандами

Модельный лиганд	Высокоаффинный центр связывания ДАДЛЭ	Низкоаффинный центр связывания ДАДЛЭ
HPO_4^{2-}	0,97	-0,50
Фосфосерил (R-PO_4^{2-})	0,99	Не определяли
Имидазол	-0,90	0,91
Гистидин	-0,78	0,97
CH_3COO^-	0,43	0,47
Аспарагиновая кислота	0,26	0,75
Глутаминовая кислота	0,18	Не определяли
SO_4^{2-}	0,23	-0,30
Лизин	Не определяли	0,68
Тирозин	0,48	0,33
Серин	-0,62	Не определяли
Цистеин	-0,57	Не определяли

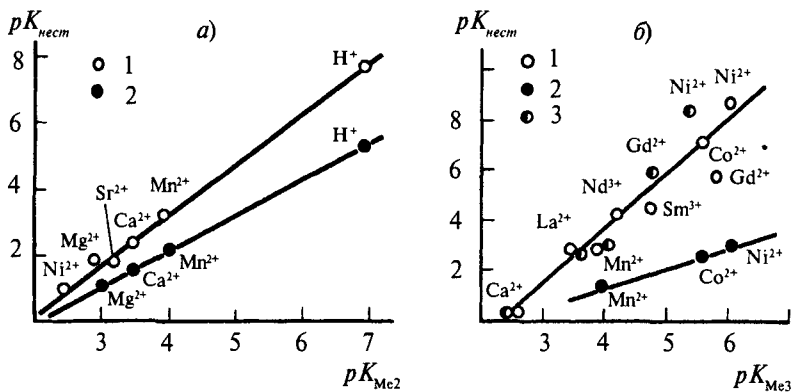


Рис. 3.87. Корреляционные зависимости констант $pK_{\text{Ме3}}$.

a — нестойкости комплексов металлов ($K_{\text{нест}}$) с анионами HPO_4^{2-} (1) и фосфосерина (2) от констант диссоциации ионов металлов с высокоаффинным центром связывания ДАДЛЭ ($K_{\text{Ме2}}$); *б* — нестойкости комплексов металлов ($K_{\text{нест}}$) с гистидином (1, 3) и имидазолом (2) от констант диссоциации комплексов металлов с низкоаффинным (1, 2) центром связывания ДАДЛЭ и высокоаффинным (3) центром связывания морфина.

являться остатком фосфорной кислоты какого-либо нуклеотида (ГТФ, ГДФ), участвующего в системе передачи сигнала с рецептора, либо, наконец, полярной группой фосфолипидов цитоплазматической мембраны. В пользу последнего предположения говорят, например, многочисленные данные об участии фосфолипидов мембран в процессах рецепции.

Для подтверждения участия фосфатных групп в процессе регуляции δ -рецепторов было изучено влияние модифицированного препарата мембран головного мозга крыс молибдатом аммония на связывание ДАДЛЭ с рецептором. Показано, что уровень связывания ДАДЛЭ с модифицированным $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ δ -рецептором в два раза выше контрольного, при этом связывание с μ -рецептором не менялось. Добавление ионов кальция существенно увеличивает связывание ДАДЛЭ с высокоаффинными рецепторами в контрольном препарате, но не в препарате, прединкубированном с $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$. Связывание ДАДЛЭ с низкоаффинными рецепторами практически не отличается как для контрольного, так и для прединкубированного препарата. Таким образом, результаты по химической модификации высокоаффинных участков связывания ДАДЛЭ $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ подтверждают предположение об участии фосфатных групп в связывании ионов металлов.

Проведенные корреляционные исследования показали, что для низкоаффинного центра связывания коэффициенты корре-

ляции близки к единице для имидазола и гистидина (см. табл. 3.23). Таким образом, можно предположить, что в состав катионсвязывающего участка входит имидазольная группа. Это подтверждает pK_a данного рецептора, равное 6,4. На возможное участие остатков гистидина в формировании структуры связывающих центров μ -рецепторов указывают результаты химической модификации этих рецепторов диэтилпирокарбонатом (ДЭПК). Этот препарат при значениях pH, близких к нейтральным, обладает высокой активностью по отношению к имидазольным группам гистидина.

Результаты по химической модификации препаратов мембран головного мозга ДЭПК позволяют сделать ряд выводов:

1. ДЭПК влияет на связывание ДАДЛЭ с μ -, но не с δ -рецептором.

2. Присутствие опиатных лигандов в процессе модификации защищает рецептор от действия ДЭПК. При этом значения концентраций лигандов, уменьшающие инактивацию на 50%, близки к значениям констант диссоциации соответствующих лигандов.

3. Селективные ионы-активаторы комплексообразования ДАДЛЭ с μ -рецепторами (ионы Ni^{++}) защищают рецептор от модификации.

Из полученных данных следует, что модифицированная группа входит в состав связывающего участка μ -рецептора. При этом ингибирующее влияние ДЭПК на связывание ДАДЛЭ обусловлено химической модификацией гистидина.

Таким образом, низкоаффинный центр связывания ДАДЛЭ (высокоаффинный центр связывания морфина, μ -рецептор) содержит остатки гистидина. Свойства этого центра зависят от присутствия в среде ионов магния и переходных металлов.

Высокоаффинный центр связывания ДАДЛЭ содержит остатки фосфатных групп $R-O-PO_4^{2-}$. Поскольку активирующим влиянием обладают только ионы переходных металлов, можно предположить, что для проявления активирующего эффекта существенно наличие d- или f- орбиталей.

Влияние температуры на лиганд-рецепторное взаимодействие

Пример 3.13. В работе [5] изучали связывание 0,3 нМ морфина с мембранами мозга в зависимости от температуры инкубации. Экспериментальные данные приведены в табл. 3.24. Определить характер температурной зависимости.

Аналогично тому, как это было описано в § 1.4, представим экспериментальные данные в координатах ($\ln k$, $1/T$) (рис 3.88). Как следует из рисунка, данный график не является линейным на всем протяжении. В интервале 32–40°C в координатах ($\log k$, $1/T$) наблюдается вполне удовлетворительная линейность, позволяющая оценить термодинамические параметры связывания морфина с мембранами головного мозга.

В интервале 0–31°C наблюдается заметное отклонение графика в координатах ($\log k$, $1/T$) от типичного вида. Этот факт указывает на серьезные изменения в процессах взаимодействия морфина с рецепторами при температуре ниже 32°C.

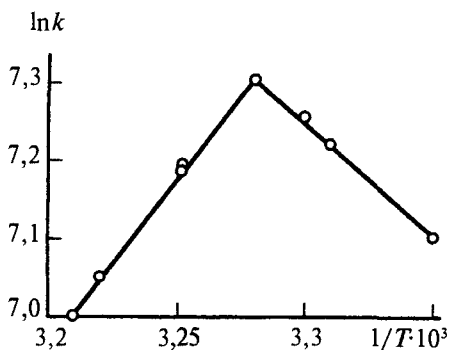


Рис. 3.88. Температурная зависимость скорости ассоциации морфина с мембранами мозга.

Зависимость свойств рецепторов от температуры

Было проведено подробное исследование физико-химических свойств опиоидных рецепторов в зависимости от температуры. Результаты этого исследования можно распространить и на другие рецепторные системы. Они приведены ниже.

1. *Константа скорости ассоциации лиганда с рецептором зависит от температуры.* Так, достижение равновесия по процессу связывания морфина с мембранами мозга достигается: за 3 ч при 0°C, за 40 мин при 25°C, за 15 мин при 37°C и за 10 мин при 40°C.

Таблица 3.24

Связывание морфина с мембранами мозга

Температура, К	Константа скорости ассоциации, нМ ⁻¹ ·мин ⁻¹
312	1097
311	1153
308	1323
305	1480
303	1416
302	1368
299	1213

2. При любой температуре связывание лиганда с рецептором обратимо.

3. Равновесная константа диссоциации лиганда с рецептором зависит от температуры.

4. В диапазоне исследованных температур (0–40°C) температурная инактивация рецепторного связывания обратима.

5. В диапазоне исследованных температур (0–40°C) концентрации рецепторов не изменяются.

6. В интервале температур 32–40°C температурные зависимости констант ассоциации лигандов с рецепторами удовлетворительно линеаризуются в координатах Аррениуса (см. пример 3.15), что позволяет определить термодинамические параметры лиганд-рецепторного взаимодействия. При температуре ниже 32°C в координатах Аррениуса наблюдаются серьезные нарушения линейности, что говорит о серьезных изменениях процесса взаимодействия лигандов с рецепторами.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы механизмы влияния ионов металлов на рецепторное связывание? 2. Какова наиболее типичная форма pH-зависимости константы скорости ассоциации лиганда с рецептором? 3. Каковы закономерности влияния температуры на рецепторное связывание?

3.6. Радиорецепторный метод*

Успешные исследования стимулируют повышение финансирования, приводящее к невозможности дальнейших исследований.

*Закон медицинских исследований
по Паркинсону*

Радиорецепторный метод является основным методом исследования свойств рецепторов. Метод основан на определении количества связанного с рецепторами радиоактивного лиганда по числу радиоактивных распадов в зависимости от параметров кинетического эксперимента.

В настоящее время в радиорецепторных исследованиях наиболее часто используются радиоактивные препараты, выпускаемые в готовом виде различными биохимическими фирмами. Однако это не исключает возможность приготовления радиоактивных

* Данный параграф посвящен специальным вопросам. Поэтому он может быть опущен при первом чтении книги.

Наиболее часто используемые радиоактивные изотопы

Изотоп	Тип распада	Время полураспада	Метод регистрации
^3H	β^-	12,3 года	ЖСС
^{11}C	β^+	20,5 мин	ЖСС
^{14}C	β^-	5760 лет	ЖСС
^{22}Na	β^+, γ	2,6 года	ЖСС или Na(Tl)
^{24}Na	β^-, γ	21,4 ч	ЖСС или Na(Tl)
^{28}Mg	β^-	170 мин	ЖСС
^{32}P	β^-	14,3 сут	ЖСС или по Черенкову
^{35}S	β^-	87,1 сут	ЖСС
^{36}Cl	$\beta^-, \beta^+, \text{K-захват}$	$3,1 \cdot 10^5$ лет	ЖСС
^{38}Cl	β^-, γ	38,5 мин	ЖСС или по Черенкову
^{42}K	β^-, γ	12,4 ч	ЖСС, Na(Tl) или по Черенкову
^{45}Ca	K-захват, γ	28 сут	ЖСС или Na(Tl)
^{55}Fe	K-захват	2,94 года	ЖСС
^{59}Fe	β^-, γ	46,3 сут	ЖСС
^{125}I	$\gamma, \text{ЭЗ}$	60 сут	ЖСС или Na(Tl)
^{131}I	β^-, γ	8,1 сут	ЖСС или Na(Tl)

Примечание: ЖСС — жидкостный сцинтилляционный счет; NaI(Tl) — сцинтилляционный счетчик с детектором на основе кристалла иодида натрия, активированного таллием; по Черенкову — измерения на основе черенковского излучения.

лигандов в лаборатории. Практические вопросы введения радиоактивной метки в лиганд подробно рассмотрены в [21].

Наибольшее распространение в радиорецепторных исследованиях получили лиганды, меченные ^3H или ^{125}I . Некоторые радиоактивные изотопы, применяемые для радиорецепторных исследований, приведены в табл. 3.25 [11].

История развития радиорецепторного метода

Исторически радиорецепторный метод своим появлением обязан Г. Хевиши и Ф. Панету, которые в 1913 г. предложили метод меченых атомов. Данный метод основан на введении в вещество наиболее просто определяемого изотопа элемента. В 1934 г. Хевиши предлагает использовать данный метод для изучения биохимических процессов. За развитие метода меченых атомов в 1943 г. Хевеши получил Нобелевскую премию.

В конце 1950 — начале 1960 гг. Р. Ялоу и С. Берсон разрабатывают практические методы иодирования биомакромолекул. Благодаря развитию методов иодирования Ялоу и Берсону в 1960 г. удается предложить радиоиммунологический метод, являющийся предпосылкой радиорецепторного. В 1977 г. за развитие данного метода Ялоу была удостоена Нобелевской премии.

В 1963 г. Ф. Гринвуд усовершенствовал методы иодирования. Это позволило увеличить удельную радиоактивность меченых препаратов, что привело к увеличению чувствительности радиоиммунологических исследований. А с конца 1960 гг. стали широко применяться и другие изотопы, помимо иода.

В 1968 г. С. Коренман на основе радиоиммунологического метода предложил радиорецепторный.

Основные преимущества и недостатки радиорецепторного метода

Преимущества радиорецепторного метода:

1. Высокая чувствительность, связанная с высоким сродством рецепторов к лигандам.
2. Специфичность, обусловленная природой рецепторов и их связывающих центров.
3. Доступность рецепторных препаратов.
4. Относительная простота постановки метода.
5. Возможность дискриминации типов связывающих мест.
6. Возможность определения агонист-антагонистической природы лиганда.

Недостатки радиорецепторного метода.

Радиорецепторный метод имеет два основных недостатка:

1. Низкая стабильность мембранных препаратов рецепторов. Вследствие этого необходимо постоянное выделение изучаемых мембран. В последнее время данная проблема в значительной мере решена за счет использования лиофилизированных мембран [5]. Данные препараты обладают высокой стабильностью даже при нормальной температуре.

2. Низкая стабильность лигандов. Как правило, низкая стабильность лигандов связана с тем, что мембранные препараты содержат целый набор протеолитических ферментов, или же с транспортом лиганда (см. также § 3.3 «Дегградация и транспорт лиганда»). Обычно для решения этой проблемы в инкубационную среду добавляют ингибиторы пептидаз, снижают температуру проведения опытов, используют стабильные аналоги лигандов (D-замещенные или содержащие амидные группы на C-конце).

Принцип радиорецепторного метода

Для радиорецепторного метода используют различные типы лигандов. *Необходимым условием* проведения метода является химическая целостность лиганда. *Разделение* свободного и связанного лиганда обычно проводят путем быстрого фильтрования. *Перед постановкой радиорецепторного метода необходимо убедиться, что меченый лиганд не связывается ни с фильтрами, ни с лабораторной посудой.*

Радиорецепторные исследования начинают с изучения кинетики связывания лиганда с исследуемым препаратом. Как показали результаты исследований, меченый лиганд может связываться не только с рецепторами, но и с мембранами исследуемых клеток. Для того чтобы отличить механизмы друг от друга, ставят контрольные опыты по вытеснению меченого лиганда избытком немеченого.

При этом в радиорецепторных исследованиях под *общим связыванием* понимают связывание радиоактивного лиганда в отсутствие избытка немеченого лиганда; под *неспецифическим связыванием* понимают количество радиоактивного лиганда, которое осталось связанным с исследуемым образцом после вытеснения избытком немеченого лиганда; под *специфическим связыванием* понимают разность между общим и неспецифическим связыванием радиоактивного лиганда (рис. 3.89).

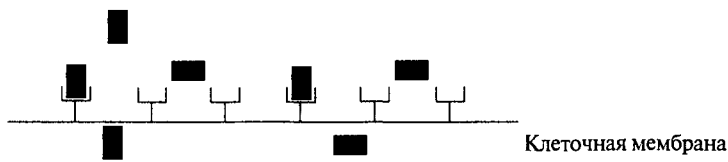
Согласно Куатрескасу [31] *специфическое связывание является рецепторным, если:*

1. Специфическое связывание отвечает требованиям пространственной и структурной комплиментарности.
2. Количество мест связывания данного лиганда является насыщаемым (ограниченным).
3. Связывающие места имеют региональную и тканевую специфичность.
4. Связывающие места обладают высокой степенью сродства к лиганду.
5. Суммарная концентрация мест связывания лиганда соответствует физиологической концентрации лиганда.

Критерии Куатрескаса не являются достаточными для определения именно рецепторного механизма связывания лигандов. Для того, чтобы быть полностью уверенным в рецепторной природе связывания, необходимо доказать сопряженность процессов связывания лиганда и изменения клеточных функций. Считается, что *рецепторная природа связывания лиганда доказана, если:*

1. Связывание лиганда является специфическим.

Общее связывание



Неспецифическое связывание

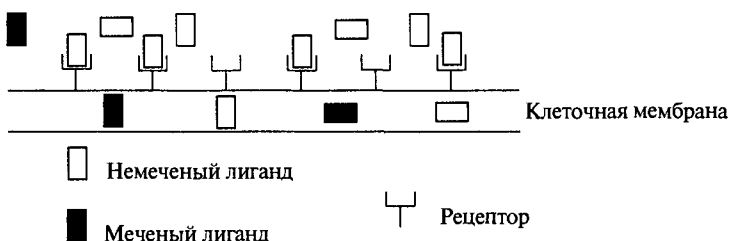


Рис. 3.89. Принцип радиорецепторного метода.

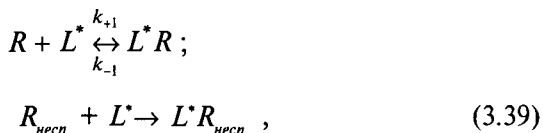
2. Специфическое связывание отвечает критериям Куатрескаса.

3. Лиганд оказывает достоверное влияние на клеточные процессы. При этом существует связь между специфическим связыванием лиганда и изменением клеточных функций.

Схема радиорецепторного метода

Постановку радиорецепторного метода можно представить в виде следующей схемы (рис. 3.89):

а) *общее связывание*:

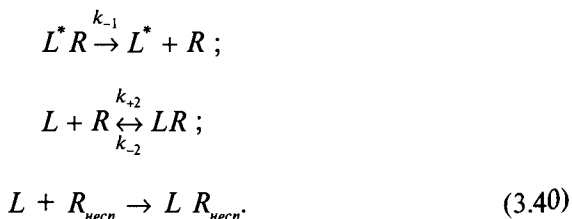


где R — места специфического связывания (специфическое связывание обратимо); L^* — меченый лиганд; $R_{несп}$ — места неспецифического связывания (неспецифическое связывание необратимо).

Согласно схеме (3.39) при постановке общего связывания количество регистрируемого связанного лиганда равно:

$$\text{Общее связывание} = \text{Неспецифическое связывание} + \text{Специфическое связывание}$$

б) *неспецифическое связывание*. Постановку опытов по вытеснению меченого лиганда избытком немеченого (опыты по определению величины неспецифического связывания) проводят в условиях избытка немеченого лиганда. Следовательно, ассоциацией меченого лиганда со специфическими местами связывания можно пренебречь. Тогда схема опыта по определению величины неспецифического связывания запишется следующим образом:



Результаты радиорецепторных исследований признаются удовлетворительными, если уровень неспецифического связывания не превышает 20–30% общего связывания.

Более высокие значения величин неспецифического связывания позволяют использовать радиорецепторный метод лишь для качественных, а не количественных исследований.

Закономерности влияния неспецифического связывания на специфическое

Неспецифическое связывание — связывание лиганда с мембранами, необратимый транспорт лиганда, его диффузия и т.д. При этом для неспецифического связывания характерно наличие большого числа мест связывания с малым сродством. Поэтому $Kd_{\text{несп}} \gg [L]$, где $Kd_{\text{несп}}$ — равновесная константа неспецифического связывания.

Наличие неспецифического связывания фактически означает связывание одного лиганда с двумя типами рецепторов (см. § 3.3). Тогда при наличии неспецифического связывания суммарная концентрация связанного лиганда в условиях равновесия для схемы (3.39) находится по формуле

$$[LR]_S = \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd} + \frac{[R_{0\text{несп}}][L]}{Kd_{\text{несп}} + [L]} \approx \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd} + \frac{[R_{0\text{несп}}][L]}{Kd_{\text{несп}}}.$$

Величину $[R_{0\text{несп}}]/Kd_{\text{несп}}$ принято называть константой неспецифического связывания [7]. Константу неспецифического связывания будем обозначать как $K_{\text{несп}}$. Тогда окончательно

$$[LR]_S = \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd} + K_{\text{несп}}[L]. \quad (3.41)$$

Если неспецифическое связывание составляет не более 20–30% общего, т.е. формулы, рассмотренные нами ранее в § 3.1, 3.3, 3.4, верны. При более высоких величинах неспецифического связывания необходимо учитывать изменение концентрации лиганда за счет неспецифического связывания. Для этого разработаны специальные методы, рассмотренные, например, в [5].

Некоторые предварительные замечания

Необходимо заметить, что радиорецепторный метод позволяет определять все вещества, которые высокоаффинно связываются с рецепторами. Поэтому если в анализируемом образце содержится несколько соединений, способных специфически связываться с рецепторами, то метод дает их эффективную концентрацию.

Концентрация, в общем случае, не является суммой концентраций данного класса соединений в образце. Так как эти вещества, являясь разнородными, отличаются по сродству к рецепторам, то при построении калибровочной кривой (см рис. 3.90) выражают полученные результаты в эквивалентах того вещества, сродство которого к рецепторам необходимо определить.

Определение общей эффективной концентрации соединений данного вида может быть как недостатком, так и

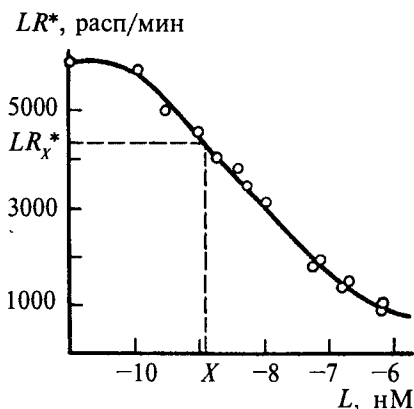


Рис. 3.90. Калибровочная кривая определения концентрации Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg по вытеснению ^3H -налоксона (0,4 нМ) в среде, содержащей 10 мМ HEPES, pH=7,4, 25°C.

достоинством радиорецепторного метода. Достоинство заключается в том, что данный метод позволяет определять общую активность в образце данного класса соединений. Недостаток состоит в сложности определения раздельного действия веществ.

В зависимости от целей, стоящих перед исследователем, радиорецепторный анализ может быть использован в двух вариантах:

1) количественный анализ; 2) качественный анализ.

Несмотря на то что оба вида анализа используют одинаковые принципы, каждый из них имеет свою специфику. Поэтому рассмотрим эти виды анализа раздельно.

Радиорецепторный метод. Количественный анализ

В основе количественного анализа соединений радиорецепторным методом лежит построение калибровочной кривой, основанной на феномене конкурентного ингибирования связывания меченого лиганда с рецепторами избытком немеченого. В простейшем случае данный процесс описывается схемами (3.39) и (3.40).

Наиболее важными характеристиками количественного анализа соединений являются следующие:

1. *Чувствительность* для радиорецепторного метода определяется как минимально определяемая из калибровочной кривой концентрация лиганда. Чувствительность метода тем выше, чем меньше ошибки метода (для радиорецепторного метода методическая ошибка составляет в среднем 3–5%). Чувствительность метода тем выше, чем больше сродство лигандов к рецептору и чем меньше величина неспецифического связывания. Также чувствительность радиорецепторного метода тем выше, чем больше удельная радиоактивность лиганда.

2. *Точность* определяется как относительная ошибка измерения. На точность радиорецепторного метода аналогично влияют те же факторы, что и на чувствительность.

3. *Диапазон определяемых концентраций.*

Ключевыми характеристиками любого метода анализа, в том числе и радиорецепторного, являются его чувствительность и точность. В § 3.4 была описана проблема специфичности и чувствительности конкурентных методов анализа. Рассмотрим чувствительность и точность радиорецепторных исследований.

Чувствительность радиорецепторного анализа

Чувствительность радиорецепторного анализа можно определить как минимальную, доступную измерению с помощью данной кривой концентрацию лиганда $[L]_{\min}$ (рис. 3.91) (B — количество связанного лиганда, от *англ.* bound). $[L]_{\min}$ определяется как наименьшая концентрация лиганда, при которой отличие уровня связывания меченого лиганда с мембранами $[B^*]_1$ и уровня связывания в отсутствие немеченого лиганда $[B^*]_0$ еще статистически значимо. Под статистической значимостью в данном случае понимается, что в предположении, если ошибки измерения указанных величин распределены по нормальному закону распределения и оценки их стандартных отклонений S_1 одинаковы, то распределение средних значений $[\bar{B}^*]_1$ и $[\bar{B}^*]_0$ подчиняется распределению Стьюдента (см. также гл. 6):

$$t = \frac{|[\bar{B}^*]_0 - [\bar{B}^*]_1|}{S_1 \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_1}}} \geq t_0, \quad (3.42)$$

где t_0 — стандартное значение одностороннего критерия Стьюдента (находится по специальным таблицам); n_1 и n_0 — число точек, использованных для определения $[\bar{B}^*]_1$ и $[\bar{B}^*]_0$.

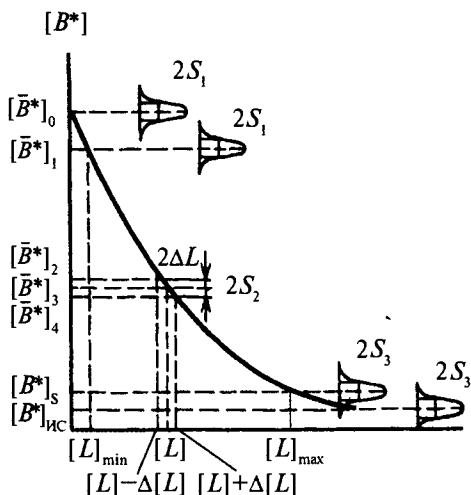


Рис. 3.91. Определение чувствительности и точности радиорецепторного метода.

$[B^*]$ — количество связанного меченого лиганда.

Как следует из соотношения (3.42), наименьшее отличие будет наблюдаться при $t = t_0$:

$$\Delta[B^*]_0 = [\overline{B^*}]_0 - [\overline{B^*}]_1 = t_0 S_1 \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_0}}. \quad (3.43)$$

При фиксированном числе точек измерения и фиксированном значении одностороннего значения критерия Стьюдента величина (3.43) будет определяться дисперсией. Во многих случаях в радиорецепторных исследованиях величина дисперсии прямо пропорциональна количеству связанного лиганда. Это связано с тем, что относительная ошибка измерения (ε) постоянна [5]:

$$S_1 = \varepsilon [B^*].$$

Тогда

$$\begin{aligned} \Delta[B^*]_0 &= \gamma [B^*]; \\ \gamma &= t_0 \varepsilon \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_0}}. \end{aligned}$$

Следовательно, чувствительность радиорецепторного анализа равна:

$$[L]_{\min} = \frac{\Delta[B^*]_0}{\left| \frac{d[B^*]}{d[L]} \right|_0} = \frac{\gamma [B^*]}{\left| \frac{d[B^*]}{d[L]} \right|_0},$$

где $\left| \frac{d[B^*]}{d[L]} \right|_0$ — значение производной в начальном участке калибровочной кривой.

Дифференцирование полученного выражения и подстановка начальных условий позволяют следующим образом определить чувствительность [5]:

$$[L]_{\min} = \gamma \left[1 + \frac{Kd_{\text{несч}}^* Kd^*}{[R_0]} \left(1 + \frac{[L^*]}{Kd^*} \right) \right] \left(1 + \frac{[L^*]}{Kd^*} \right) Kd. \quad (3.44)$$

Из (3.44) можно сделать следующие выводы:

1. Чувствительность радиорецепторного метода анализа возрастает с уменьшением ошибки определения $[B^*]$.

2. Величина $[L]_{\min}$ прямо пропорциональна константе диссоциации немеченого лиганда. Следовательно, анализ надо проводить в условиях, обеспечивающих максимальное сродство немеченого

лиганда к рецепторам (оптимум температуры, рН, ионной силы раствора и т.д.).

3. Чувствительность радиорецепторного анализа возрастает с уменьшением величины $[L^*]/Kd^*$. Следовательно, радиорецепторные исследования целесообразнее проводить при $[L^*] \ll Kd^*$. Однако на практике нет необходимости уменьшать величину $[L^*]$ более чем до $0,1-0,2 Kd^*$. С одной стороны, это связано с тем, что дальнейшее уменьшение $[L^*]$ не дает сколько-нибудь существенного увеличения чувствительности, а с другой — при низкой удельной активности лиганда приводит к существенным ошибкам подсчета числа радиоактивных распадов (табл. 3.26). Из вели-

Таблица 3.26

**Зависимость времени счета радиоактивного образца
от удельной активности меченого лиганда**

Удельная актив- ность, кюри/ ммоль	$[L^*]$, нМ	$[L^*]/Kd^*$	Удельная активность меченого соединения		I_0/I_ϕ	Время счета образца, мин	Время счета фона, мин
			расп/мин	имп/мин			
15	0,05	0,01	50	20	2	135	100
	0,025	0,05	250	100	10	65	2
	0,5	0,1	500	200	20	2,7	0,6
	1,0	0,2	1000	400	40	1,2	—
	2,5	2,5	2496	998	99,8	0,45	—
22	0,05	0,01	67,3	26,9	2,69	74	60
	0,025	0,05	336	134,5	13,5	4,8	2
	0,5	0,1	373	269	26,9	2	0,6
	1,0	0,2	1345	538	53,8	0,89	—
	2,5	2,5	3363	1345	134,5	0,3	—
59	0,05	0,01	98	39	3,9	28	9
	0,025	0,05	196	78	7,8	9	3
	0,5	0,1	1964	786	79	0,6	—
	1,0	0,2	3929	1572	157	0,25	—
	2,5	2,5	9823	3929	323	0,1	—
90	0,05	0,01	150	60	6	14	7,5
	0,025	0,05	300	120	12	5,4	2
	0,5	0,1	3997	1599	160	0,25	—
	1,0	0,2	5994	2398	240	0,17	—
	2,5	2,5	14985	5998	599	0,17	—

Примечание: I_0/I_ϕ — отношение уровней радиоактивности связанного лиганда и фона; $[L^*]$ — концентрация меченого лиганда; Kd^* — его константа диссоциации. Условия: уровень связывания меченого лиганда составляет 5% его общей концентрации, эффективность счета радиоактивности 40%, точность ее измерения 5%.

чин удельной радиоактивности следует, что отдавать предпочтение надо лигандам, меченным йодом-125 или тритием.

4. *Чувствительность радиорецепторного метода* зависит и от величины неспецифического связывания. Неспецифическое связывание определяется связыванием лиганда с мембранами, пробирками, фильтрами и т.д. Для уменьшения процесса связывания лиганда с мембранами используют мембраны, обогащенные рецепторами [5]. Уменьшение связывания лиганда с пробирками, фильтрами достигается путем использования силиконизированных пробирок, подбора специальных фильтров и т.д.

5. *Чувствительность радиорецепторного метода* понижается при уменьшении объема V реакционной смеси. Этот факт ограничивает постановку метода в малых объемах.

Точность радиорецепторного анализа. Точность радиорецепторного анализа определяется как относительная ошибка измерения концентрации вещества:

$$\left(\frac{\Delta[L]}{[L]} \right) = \frac{S_2}{[L] \left| \frac{d[B^*]}{d[L]} \right|_{[L]}}.$$

В [5] показано, что точность радиорецепторного анализа задается следующим соотношением:

$$\left(\frac{\Delta[L]}{[L]} \right)_{\min} = \frac{\varepsilon \left[1 + \frac{Kd_{\text{несн}}^* Kd^*}{[R_0]} \left(1 + \sqrt{\frac{[R_0]}{Kd_{\text{несн}}^* Kd^*} + 1} \right) \right] \left(1 + \sqrt{\frac{[R_0]}{Kd_{\text{несн}}^* Kd^*} + 1} \right)}{\sqrt{\frac{[R_0]}{Kd_{\text{несн}}^* Kd^*} + 1}}.$$

Следовательно, точность радиорецепторных исследований не зависит от сродства к рецепторам немеченого лиганда и определяется свойствами меченого лиганда и препарата мембран. *Максимальная точность достигается при концентрациях исследуемого лиганда, близких к его константе диссоциации* [5].

Влияние на радиорецепторный анализ гетерогенности рецепторов. Мембранные препараты, получаемые, как правило, из гомогената мозга, обычно содержат несколько типов рецепторов одного и того же класса, например различные типы и подтипы опиоидных рецепторов. Поэтому нередки случаи, когда лиганды, имеющие специфичность к тому или иному типу рецепторов данного типа с худшими константами, связываются и другими рецепторами данного класса. В работе [2] подробно рассмотрены

подобные системы. Показано, что наличие гетерогенной популяции рецепторов приводит к незначительному уменьшению чувствительности радиорецепторного метода.

Радиорецепторный метод. Качественный анализ

Наиболее часто качественный метод радиорецепторного анализа используется для скрининга новых соединений. Тогда он складывается из следующих этапов:

1. *Определение специфичности соединения к различным типам рецепторов.* Обычно на данном этапе проводятся опыты, основанные на конкурентном вытеснении меченых лигандов известных типов избытком неизвестного немеченого лиганда (см. § 3.4 «Определение константы диссоциации конкурентными методами»).

2. *Установление типа лиганда,* т.е. определение класса рецепторов, к которому средство данного лиганда является наибольшим. На этом этапе используются методы вытеснения меченых лигандов с разной степенью сродства к типу рецепторов, установленному на первом этапе исследования.

3. *Определение агонист-антагонистической природы лиганда.* Для этого проводятся исследования дозозависимых влияний лиганда на клеточные функции.

Использование лиофилизированных мембран в радиорецепторном анализе опиоидных пептидов

В монографии [5] приводятся результаты исследований по получению стабильных препаратов мембран, содержащих рецепторы. Показано, что в обычных мембранных препаратах инактивация рецепторных систем происходит не более чем за неделю. В связи с этим в работе [5] исследована возможность применения лиофилизированных мембран для радиорецепторного анализа.

Препараты лиофилизированных мембран имеют столь же высокое сродство к исследуемым лигандам, что и сырые мембраны. При этом следует заметить, что препараты лиофилизированных мембран дают «натриевый сдвиг», т.е. при добавлении в среду анализа натрия сродство μ -агониста морфина к рецепторам резко ухудшается, при этом сродство μ -антагониста налоксона возрастает. Величина «натриевого сдвига» на лиофилизированных мембранах сравнима с величиной «натриевого сдвига» на сырых мембранах. Следовательно при разработанном авторами [5] методе лиофилизации мембран, функциональная активность

опиоидных рецепторов практически не меняется. Это позволяет проводить эксперименты *in vitro* в условиях, приближенных к организму.

Из полученных экспериментальных данных следует, что лиофилизированные препараты мембран существенным образом более стабильны, чем сырые. Кроме того, стабильность препаратов резко возрастает при хранении их в инертной среде, содержащей аргон. Последнее, видимо, связано с окислением в кислородной среде SH-групп рецепторов.

Итак, лиофилизированные препараты обладают чрезвычайно высокой стабильностью. В запаянной ампуле с аргоном они могут храниться по меньшей мере в течение года при нормальной температуре без изменения их свойств. При этом сырые препараты, хранящиеся в инертной среде, инактивируются в течение месяца даже при -35°C .

Таким образом, препараты лиофилизированных мембран сохраняют все свойства сырых мембран (специфичность к лигандам, чувствительность к ионам, высокие константы связывания), необходимыми для качественно радиорецепторного анализа опиа-тов и опиоидных пептидов.

Радиорецепторный метод. Практические вопросы и ответы

1. *В моем исследовании неспецифическое связывание достигает очень высоких величин: 50–60% общего. Что делать?* В вашем случае радиорецепторный метод анализа применим лишь для качественных исследований. Если вы хотите использовать его для количественных исследований, попытайтесь изменить температуру, pH, ионную силу раствора или же изучать связывание лигандов не с целыми клетками, а с их мембранами. Также попытайтесь изменить концентрацию меченого лиганда или препарата, содержащего рецепторы; проверьте наличие неспецифического связывания лиганда с фильтрами, проверьте чистоту лиганда.

2. *В моем исследовании неспецифическое связывание в значительной мере подвержено вариациям и составляет от опыта к опыту от 10 до 40% при одних и тех же условиях. Что делать?* Проверьте целостность лиганда. Проверьте, не связывается ли лиганд с лабораторной посудой или с фильтрами. Проверьте чистоту посуды. Смените лиганд, фильтры и лабораторную посуду. Измените условия фильтрования. Измените число промывок фильтров. Почистите лиганд.

3. *Я хочу исследовать связывание лигандов с клеточными мембранами. Какой способ получения клеточных мембран лучше выбрать?*

Существует достаточно много способов разрушения клеток: центрифугирование, замораживание-оттаивание, изменение осмотической силы раствора. Можно работать с грубой мембранной фракцией (клеточные мембраны, ядерные мембраны, мембраны цитоплазматических органел) или с конкретными мембранами. При отсутствии каких-либо предпочтений следует выбрать тот способ разрушения клеток, при котором специфическое связывание будет наилучшим образом совпадать с клеточным специфическим связыванием. Если на целых клетках наблюдаются высокие величины неспецифического связывания, то следует выбрать тот способ разрушения клеток, при котором неспецифическое связывание будет наименьшим.

4. *Я работаю с целыми клетками. Как мне определить степень их сохранности?* Окрасьте клетки трипановой синью. Целые клетки не включают трипановую синь и под микроскопом выглядят бесцветными. Клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной включают трипановую синь в цитоплазму и под микроскопом окрашены в синий или фиолетовый цвет. Число жизнеспособных клеток должно составлять не менее 95% общего числа клеток.

5. *Мне не удалось обнаружить специфическое связывание меченого лиганда с клетками. Почему?* Возможно, на данных клетках нет рецепторов к данному типу лиганда. Возможно, удельная радиоактивность лиганда мала или нарушена целостность лиганда. Возможно, неправильно подобраны условия проведения радиорецепторного метода.

6. *При постановке экспериментов по вытеснению меченого лиганда избытком немеченого мне не удалось полностью вытеснить меченый лиганд. Почему?* Возможно, константа скорости диссоциации лиганда с рецептором мала. В этом случае попробуйте увеличить время проведения экспериментов по вытеснению меченого лиганда. Возьмите большие концентрации немеченого лиганда. С другой стороны, неполное развязывание меченого лиганда может наблюдаться из-за процессов внутриклеточного транспорта лиганда. Попытайтесь разделить рецепторный и транспортный механизм изменения концентрации лиганда при помощи методов, описанных в § 3.3. Поставьте кинетику диссоциации на клеточных мембранах.

7. *В моем исследовании удалось получить специфическое связывание, составляющее 80–90% общего. Что делать дальше?* Поставьте кинетику ассоциации и диссоциации лиганда с исследуемым препаратом. Определите кинетические параметры. Поставьте опыты по связыванию различных концентраций лиганда с исследуе-

мым препаратом в условиях равновесия. Представьте полученные результаты в координатах Скэтчарда, Хилла и Бьеррума. В соответствии с методами, описанными в § 3.3, выберите ту модель, которая наилучшим образом соответствует экспериментальным данным. Определите равновесные параметры связывания. Сравните их с критериями рецепторного связывания. Подтвердите или опровергните рецепторную природу специфического связывания.

8. *Мне удалось найти модель связывания лиганда. Однако я не наблюдаю изменения клеточных функций, которые могли бы соответствовать рецепторному связыванию. Почему?* Возможно, вы определяете не ту клеточную функцию, на которую оказывает влияние данный тип рецепторов. Возможно, недостаточна чувствительность метода. Возможно, имеются более сложные механизмы влияния рецептора на клеточную функцию, чем рассмотренные в § 3.2. Возможно, «специфическое» связывание не является рецепторным (например, имеет место случай обратимого транспорта). Во всех случаях воспользуйтесь методами разделения рецепторного, ферментативного и транспортного механизмов изменения концентрации лиганда, которые рассмотрены в § 3.3.

9. *Мне удалось установить, что специфическое связывание лиганда сопряжено с изменением клеточной функции. Однако ни одна модель лиганд-рецепторного взаимодействия, описанная в § 3.3, не описывает удовлетворительно мои данные. Почему?* Возможно, имеется нереперторный механизм влияния лиганда на клеточные функции. Возможно, имеет место более сложный механизм влияния рецепторов на клеточные функции, чем это рассмотрено в § 3.2. Возможно, имеет место более сложная модель лиганд-рецепторного взаимодействия, чем это рассмотрено в § 3.3.

10. *Как следует из результатов моих опытов, закономерности влияния различных факторов на рецепторное связывание другие, чем рассмотрение в § 3.5. Почему?* Возможно, имеют место другие закономерности влияния различных факторов на рецепторное связывание, чем это было рассмотрено ранее. Возможно, ваше связывание не является рецепторным.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Принцип радиорецепторного метода. Количественный анализ соединений. Качественный анализ соединений. 2. История разработки радиорецепторного метода. 3. Какие изотопы применяются для радиорецепторных исследований? 4. Дайте определение понятиям «специфическое связыва-

ние», «неспецифическое связывание», «общее связывание». Какая существует между ними связь? Какова их природа? 5. Как неспецифическое связывание может оказывать влияние на специфическое? 6. Какие существуют критерии дискриминации рецепторного механизма связывания? 7. Какими факторами определяется чувствительность и точность радиорецепторного метода? Как можно изменить данные параметры? 8. Какое влияние оказывает наличие нескольких типов связывающих мест на чувствительность радиорецепторного анализа?

3.7. Применение метода имитационного моделирования для определения концентрации рецепторов и их аффинности

А мудрость для них заключается в том,
Что два — это меньше, чем три.

А. Галич

Взаимодействие одного лиганда с N местами связывания

В простейшем случае процесс комплексообразования лиганда с N рецепторами можно представить как



где LR_i — комплекс лиганда с i -м рецептором. В условиях равновесия:

$$[LR_i] = \frac{[R_{0i}][L]}{Kd_i + [L]}. \quad (3.46)$$

Заметим, что формула (3.46) выводится аналогично тому, как это было показано в § 3.3 для случая взаимодействия одного лиганда с двумя типами мест связывания. Тогда суммарная концентрация связанного лиганда

$$[LR]_S = \sum_{i=1}^N [LR_i] = \sum_{i=1}^N \frac{[R_{0i}][L]}{Kd_i + [L]}, \quad (3.47)$$

где N — общее число типов мест связывания.

На первом этапе исследования перед экспериментатором встают следующие задачи:

1. Доказательство того, что в условиях равновесия комплексообразование протекает в соответствии с формулой (3.47) или аналогичной ей формулой.

2. Определение числа мест связывания N.

3. Определение кинетических и равновесных параметров этих мест связывания.

4. Определение наличия или отсутствия кооперативных свойств системы.

Для решения этих задач традиционно используются графические представления (см. § 3.3). Однако, несмотря на относительную простоту и доступность графических методов, их использование во многих случаях затруднено. Это связано с тем, что гипотетическая ошибка распределения параметров максимальна в областях, наиболее существенных для дискриминации моделей рецепторного связывания (рис. 3.92). Поэтому в настоящее время для объективного и более надежного определения параметров все чаще обращаются к методам математической статистики.

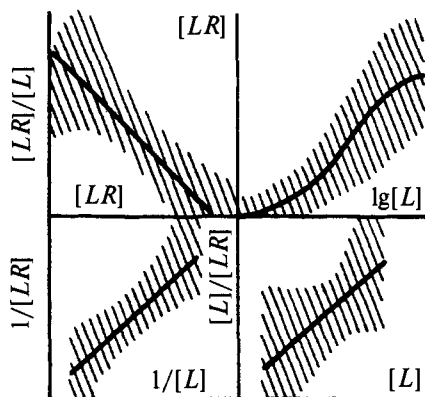


Рис. 3.92. Распределение ошибок в различных координатах.

Метод имитационного моделирования

Одним из современных методов численного определения концентрации рецепторов и их аффинности является *метод имитационного моделирования*. Существенной характеристикой данного метода является установление характера распределения ошибки измерения или вычисления параметра (см. рис. 3.92).

Метод имитационного моделирования сводится к следующим этапам анализа экспериментальных данных:

1. Рассматриваются кривые типа (3.47) для оценки параметров модели с помощью метода наименьших квадратов. При этом предполагается, что экспериментальные ошибки статистически независимы, имеют нормальный закон распределения параметров и независимы от измерения к измерению.

2. Полученные оценки параметров модели используются в имитационном эксперименте как истинные. Имитационный эксперимент представляет собой моделирование на электронно-вычислительной машине экспериментальных точек с учетом реальной экспериментальной ошибки измерения данных. Моделируется тот же объем точек, что и в эксперименте. Число таких



Курочкин И.Н.

Физикохимик, биохимик. Работает в области биоанализа. Совместно с С.Д. Варфоломеевым и С.В. Зайцевым разработал метод имитационного моделирования для изучения процессов молекулярной рецепции.

численных экспериментов определяется по формуле $(p+1)l$, где p — число параметров модели, l — число экспериментальных точек.

3. По алгоритму (1) в каждом численном эксперименте вычисляются оценки параметров выбранной модели и сумма квадратов отклонения теоретических значений от экспериментальных. Полученная совокупность используется для анализа их разброса, построения эмпирических функций распределения и дискриминации моделей рецепторного связывания.

Заметим, что процедура оценки параметров может быть существенно упрощена за счет применения методов идентификации [9]. Данные методы позволяют существенно образом сократить число операций, необходимых для поиска параметров модели рецепторного связывания за счет того,

что данный поиск является целенаправленным. При этом, наилучшим методом идентификации параметров рецепторного связывания является метод сопряженных градиентов.

Рассмотрим результаты применения метода имитационного моделирования для анализа лиганд-рецепторного взаимодействия. На рис. 3.93 представлено облако разброса параметров для модели комплексообразования одного лиганда с одним рецептором. Наблюдается сильная степень корреляции между числом мест связывания и их аффинностью.

Поэтому параллельное увеличение (уменьшение) концентрации рецепторов и их константы диссоциации может быть связано с недостаточной точностью определения этих параметров с помощью квадратичных оценок, а не с истинным изменением значений этих параметров.

Аналогичный вывод можно сделать исходя из облака разброса параметров для модели взаимодействия одного лиганда с двумя типами рецепторов (рис. 3.94).

Данный анализ позволяет предположить, что в случае не-

адекватности модели или ее параметров экспериментальным данным нарушается степень корреляции между параметрами R_0 и Kd (рис. 3.95).

Таким образом, при выборе неадекватной модели рецепторного связывания или при неправильной оценке ее параметров наблюдается изменение степени корреляции между концентрацией рецепторов и их аффинностью.

Использование метода имитационного моделирования позволило получить три важных вывода:

1. Эмпирическое распределение параметров модели является несимметричным.

2. При переходе от модели взаимодействия одного лиганда с одним центром связывания к модели взаимодействия с двумя

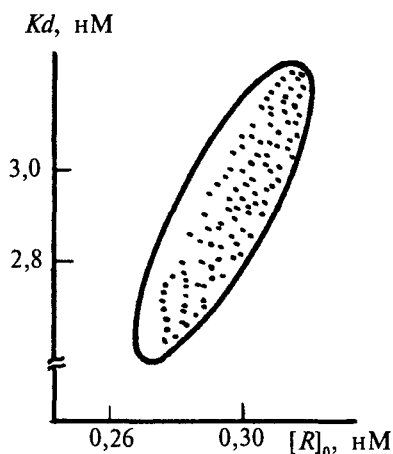


Рис. 3.93. Облако разброса параметров модели комплексообразования одного лиганда с одним типом рецепторов.

$Kd = 3$ нМ, $[R_0] = 0,3$ нМ.

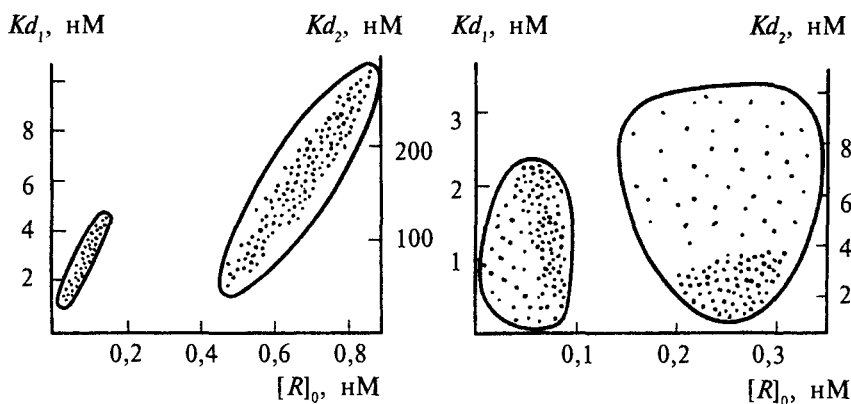


Рис. 3.94. Облако разброса параметров модели комплексообразования одного лиганда с двумя типами рецепторов.

$Kd_1 = 3$ нМ, $Kd_2 = 120$ нМ, $[R_0]_1 = 0,08$ нМ, $[R_0]_2 = 0,6$ нМ.

Рис. 3.95. Облако разброса параметров модели комплексообразования одного лиганда с двумя типами рецепторов в случае неправильной подборки параметров модели.

Значения констант — те же, что и на предыдущем рисунке.

центрами связывания возрастает ошибка определения параметров модели. Так, для модели взаимодействия одного лиганда с одним рецептором параметры модели по 20–30 экспериментальным точкам могут быть получены с ошибкой 2–7%, тогда как для более сложной модели ошибка может составить 200–300%.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Почему возникает необходимость в применении компьютерных методов определения концентрации рецепторов и их аффинности? 2. Каковы основные принципы метода имитационного моделирования? Каковы преимущества и недостатки данного метода?

3.8. Краткое содержание главы

Сократить — значит понять. Именно поэтому когда вместо многотомной монографии мне предлагают тоненькую брошюрку, я охотно верю, что в ней заключена вся мудрость мира.

П. Лут

Лиганд-рецепторное взаимодействие является основным процессом, определяющим гормональные, нейрогормональные и лекарственные ответы, а также лекарственную толерантность и гиперчувствительность. Изменение свойств рецепторных белков может быть существенным звеном патогенеза при развитии различных патологических состояний.

Поэтому изучение рецепторов и их свойств необходимо как в эксперименте, так и в клинике. При этом следует учитывать, что свойства рецепторов не являются постоянными. С течением времени за счет различных процессов может происходить изменение как концентрации рецепторов, так и их аффинности. Принято считать, что изменение аффинности рецепторов более характерно для наследственных (генетических) дефектов рецепторного белка, а изменение концентрации рецепторов более характерно для функциональных (прижизненных) изменений рецепторного аппарата.

Все рецепторы сопряжены с внутриклеточными системами передачи и усиления сигнала, которые обладают большим консерватизмом, чем собственно рецепторные белки. Поэтому при изучении многих патологических состояний достаточно изучать свойства рецепторного аппарата.

Основным методом, позволяющим изучать рецепторное связывание, является радиорецепторный метод. Он основан на определении количества связанного с рецепторами меченого радиоактивной меткой лиганда по числу распадов.

Следует заметить, что появившиеся в последние годы методы молекулярно-биологических исследований рецепторных белков не исключают радиорецепторный метод анализа и являются дополнениями к нему.

Для интерпретации результатов радиорецепторных исследований разработано достаточно большое количество методов. Графические методы рассмотрены в § 3.1 и 3.3, численные — в § 3.7.

Заметим, что при количественном изучении взаимодействия лигандов с центрами связывания ключевыми проблемами являются:

1. Дискриминация моделей комплексообразования.

2. Определение значений параметров модели, адекватно описывающей процесс.

При этом интерпретация экспериментальных данных начинается с дискриминации модели рецепторного связывания (см. § 3.3). Только после выбора адекватной модели возможно правильное определение ее параметров.

Важно запомнить, что *ни один математический метод не способен выявить то, что не было измерено в эксперименте.*

Критерии выбора модели лиганд-рецепторного взаимодействия

Рассмотрим некоторые критерии выбора той или иной модели рецепторного связывания (в дополнение к § 3.3):

1. *Связывание с N типами мест связывания.* Максимальное число типов мест связывания не превышает числа экспонент, достоверно наблюдающихся в кинетике связывания, и числа перегибов изотермы насыщения, представленной в координатах Бьерума.

2. *Кооперативное связывание.* Подтверждается наличием более сложной стехиометрии комплексообразования, чем «один лиганд—один рецептор». Дополнительную информацию могут дать методы определения порядка реакции (см. § 1.2).

- а) *Положительная кооперативность.* Подтверждается наличием возрастающего участка изотермы насыщения, представленной в координатах Скэтчарда, и наличием угла наклона этой изотермы в координатах Хилла более чем в 45° .

- б) *Отрицательная кооперативность.* Данный случай трудно дискриминировать со случаем взаимодействия одного лиганда с

Таблица 3.27

Критерии дискриминации случая взаимодействия лиганда с рецептором, обладающим отрицательной кооперативностью, и с N некооперативными местами связывания

Критерий	Отрицательная кооперативность	N типов мест связывания
Достоверно определяемое число экспонент в кинетике связывания	1–2	N
Число перегибов изотермы насыщения, представленной в координатах Бьеррума	1	$\leq N$
Характер зависимости доза–эффект	Однонаправленный со стадией индукции	Сложный колоколообразный
Тангенс угла наклона изотермы насыщения, представленной в координатах Хилла	менее 45°	45° или менее

несколькими некооперативными местами связывания. Критерии дискриминации приведены в табл. 3.27.

Следует заметить, что дискриминация этих двух моделей рецепторного связывания является сложной и не решенной полностью до настоящего времени задачей.

3. *Изменение суммарной концентрации рецепторов или лиганда.* Устанавливается дополнительными методами, которые описаны в разделе 3.3.

4. *Оценка параметров связывания нескольких лигандов с одним рецептором.* Производят в двойных обратных координатах в соответствии с методами, описанными в § 3.4.

Основные методы преобразования координат

Важнейшими координатами, используемыми для определения параметров рецепторного связывания являются следующие:

1. *Полулогарифмические* ($\ln[LR]$, t). Используются для анализа кинетических процессов комплексообразования. Тангенс угла наклона кривой связывания в этих координатах равен показателю экспоненты, стоящей в уравнении кинетики процесса комплексообразования.

2. *Координаты Скэтчарда* ($[LR]/[L]$, $[LR]$). Используются для дискриминации моделей рецепторного связывания, так как лю-

бое отклонение от прямой линии в этих координатах означает, что лиганд-рецепторное взаимодействие идет по более сложной схеме, чем схеме «один лиганд—один некооперативный рецептор». В случае некооперативного связывания одного лиганда одним рецептором тангенс угла наклона в координатах Скэтчарда равен аффинности рецепторов. Независимо от модели рецепторного связывания абсцисса точки пересечения с осью X изотермы насыщения, представленной в координатах Скэтчарда, равна суммарной концентрации мест связывания.

3. *Координаты Хилла* ($\log\{[LR]/([R_0]-[LR])\}$, $\log[L]$). Тангенс угла наклона в этих координатах равен кажущейся степени кооперативности рецепторов. Абсцисса точки пересечения с осью X изотермы насыщения, представленной в координатах Хилла, является оценкой для логарифма равновесной константы диссоциации комплекса «лиганд—рецептор».

4. *Координаты Бьеррума* ($[LR]/[R_0]$, $[L]$) или логарифмы этих величин). Число перегибов в этих координатах не превышает числа мест связывания. Абсциссы точек перегиба изотермы насыщения в этих координатах равны константам диссоциации.

5. *Двойные обратные координаты* ($1/[LR]$, $1/[L]$). Используются для оценки конкуренции нескольких лигандов за мест связывания по тангенсу угла наклона и точкам пересечения графика с осями X и Y (см. § 3.4).

Список основной литературы

1. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Архем А.А. Введение в теорию рецепторов. Минск, 1986.
2. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М., 1982.
3. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., 1984.
4. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. М., 1987.
5. Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д. Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. М., 1993.

Дополнительная литература

6. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М., 1994.
7. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Мевх А.Т. Итоги науки и техн. ВИНИТИ. Сер. Биорг. химия, 1985. Т. 3. С 5-160.
8. Вржещ П.В., Татаринцев А.В., Еришов Д.Э. и др. ДАН СССР, 1989. Т. 307. С. 447-480.
9. Гилл Ф., Мюррей У., Райт М. Практическая оптимизация. М., 1985.
10. Гуревич К.Г. Биохимия, 1997. Т. 62. С. 1121-1125.
11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М., 1991.
12. Зайцев С.В., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д., Березин И.В. ДАН СССР, 1985. Т. 281. С. 727-732.
13. Зайцев С.В., Сергеева М.Г., Варфоломеев С.В. Биорг. Химия, 1985. С. 370-379.
14. Зозуля А.А., Пацакова Э., Кост Н.В. Вестн. АМН СССР, 1982. С. 28-32.
15. Курочкин И.Н., Зайцев С.В., Белоусов А.С., Скланкина О.А., Варфоломеев С.Д. Биохимия, 1988. Т. 53. С. 41-53.
16. Сергеев П.В. В кн.: Физиологически активные вещества — медицине. Ереван, 1982. С. 258-262.
17. Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л. Очерки биохимической фармакологии. М., 1996.
18. Скланкина О.А., Курочкин И.Н., Варфоломеева А.Д., Крехнов Б.В., Зайцев С.В., Варфоломеев С.Д. Биохимия, 1990. Т. 55. С. 1032-1042.
19. Современные проблемы биокинетики (ред. С.Д. Варфоломеев), М., 1987.
20. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. М., 1983.
21. Чард Т. Радиоиммунологические методы. М., 1981.
22. Чекалина Н.Д., Ключник Т.П., Брусов О.С., Даниловская Е.В., Дейнеко Н.Л. Бюлл. 23. Эксп. Биол. и Мед., 1996. Т. 121. С. 295-297.
24. Ariëns E.J. J. Cardiol. Pharmacol., 1983. V. 5. P. 8-15.
25. Ariëns E.J. Bull. et Memories, 1981. V. 136. P. 94-105.
26. Ariëns E.J. Pharm. Weekbl., 1983. V. 5. P. 121-128.

27. *Ariëns E.J., Beld A.J., Rodrogies de Mirande J.F., Simonis A.M.* In: The receptors: a comprehensive treatise, N.Y., 1979. V. 1. P. 33–91.
28. *Beck J.S., Goren H.J.* J. of Recept. Res., 1983. V. 3. P. 561–577.
29. *Bunce K.T., Spraggs C.F.* Br. J. Pharmacol., 1982. V. 77. P. 469–765.
30. *Clark A.J.* J. Physiol., 1926. V. 61. P. 530–546.
31. *Clark A.J.* J. Physiol., 1926. V. 61. P. 547–556.
32. *Cuatrecasas P.* In: Am. soc. for neurochem. monograph, neurochem. of cholinergic receptors. N.Y.: Raven Press, 1974. P. 37–48.
33. *Davis M.E., Akera T., Brody T.M., Watson L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977. V. 74. P. 5764–5766.
34. *Enkins R.P.* e.a., 1968 in: Radioligands in Medicine, in vivo studies. P. 59–101.
35. *Feldman H., Robard D., Levine D.* Anal. Biochem., 1972., V. 42. P. 530–556.
36. *Gillan M.G.C., Kosterlitz H.W.* Br. J. Pharmacol., 1982. V. 77. P. 461–469.
37. *Haldane I.B.* Nature, 1957. V. 179. P. 832.
38. *Hill A.V.* J. Physiol. 1910. V. 40. P. 4–7.
39. *Hofstee B.H.* J. Sci. 1952. V. 116. P. 329–331.
40. *Lanmuir I.* J. Am. Chem. Soc., 1918. V. 40. P. 1361–1403.
41. *Leslie F.M.* Pharmacol. Rev., 1987. V. 34. N. 3. P. 197–249.
42. *Lutz R.A., Phister H.P.* J. of Receptor Res., 1992. V. 12. N. 3. P. 267–286.
43. *McCann D., Toll L., Adapa I., Craymer K., Kennedy J., Polgar W., Schwartz R.* Study Report, 1995, Jan. 6. P. 1–14.
44. *Mannervik B.* Meth. in Enzymol., 1982. V. 87. P. 370–390.
45. *Mutsumi M., Hiroaki S., Kyoko A., Hiroshi H.* Brain Res., 1987. V. 491. P. 14–22.
46. *Monod J., Wyman J., Changeux J.-P.* J. Mol. Biol., 1965. V. 12. P. 88–118.
47. *Paton W.D.W.* Proc. Roy. Soc. , Ser. B. 1961. V. 154. P. 21–69.
48. *Scatchard G.* Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949. V. 51. P. 660–670.
49. *Shoup D., Szabo A.* Biophys. J., 1980. V. 40. P. 33–39.
50. *Stepherson R.P.* Brit. J. Pharmacol. Chemiother., 1956. V. 11. P. 379–393.333
51. *Tallarida R.J.* Pharmacol., 1979. V. 207. P. 1–207.
52. *Tao P.-L., Chang L.-R., Law P.Y., Loh H.H.* Brain Res., 1988. V. 462. P. 313–320.
53. *Taylor W.* Biochem J., 1990. V. 272. P. 1–13.

3.9. Вероятностное описание системы «лиганд—рецептор»*

Все великие открытия делаются по ошибке

Закон Янга

Кинетическое уравнение, описывающее взаимодействие лиганда с рецептором, принято выводить исходя из закона действующих масс [1]. Часто такой подход не позволяет выявить возможные причины отклонений в кинетике взаимодействия лигандов с рецепторами от известного кинетического уравнения (3.1) даже если лиганд-рецепторное взаимодействие описывается схемой «один лиганд—один рецептор». Это связано с отсутствием каких-либо предположений о статистической зависимости или же статистической независимости лиганд-рецепторного взаимодействия при записи уравнения закона действующих масс в этом случае.

Поэтому описание лиганд-рецепторного взаимодействия должно строиться на основании более общих закономерностей, чем закон действующих масс. Такое описание может быть получено на основании вероятностного описания процесса взаимодействия лигандов с рецепторами. При этом в простейшем случае разумно предположить, что процесс взаимодействия одной молекулы лиганда с рецептором статистически независим от взаимодействия лиганда с другой молекулой рецептора и происходит при условии избытка начальной концентрации лиганда по отношению к начальной концентрации рецепторов.

Предположим, что процесс взаимодействия лиганда с рецептором является простым Марковским процессом без последействия. Это означает, что всю информацию о протекании процесса в будущем можно получить исходя из настоящего состояния процесса, не учитывая прошлого. С нашей точки зрения, данное предположение не накладывает серьезных ограничений на возможности описания системы «лиганд—рецептор».

Вероятностное описание кинетики диссоциации лиганд-рецепторных комплексов

Чтобы получить вероятностное описание поведения системы «лиганд—рецептор», рассмотрим сначала процесс распада лиганд-рецепторных комплексов:

* § 3.9—3.10 посвящены специальным вопросам.

$$RL \xrightarrow{\alpha} R + L, \quad (3.48)$$

где α — среднестатистическая вероятность распада лиганд-рецепторных комплексов.

С математической точки зрения, данный процесс аналогичен процессу радиоактивного распада. Поэтому рассмотрим его аналогично тому, как это описано в [2] для радиоактивного распада. Пусть w — вероятность того, что лиганд-рецепторный комплекс, существовавший в момент времени t , будет существовать в момент времени $t + dt$. Тогда $1-w$ — вероятность распада одного лиганд-рецепторного комплекса за период времени от t до $t + dt$. Очевидно, что

$$\frac{dw}{dt} = -\alpha w, t = 0 : w = 1. \quad (3.49)$$

Тогда

$$w = \exp[-\alpha t]. \quad (3.50)$$

Очевидно, что $2w(1-w)$ — вероятность распада одной из двух молекул лиганд-рецепторных комплексов за период времени от t до $t + dt$. Тогда вероятность распада n из N лиганд-рецепторных комплексов за это же время определяется как

$$\begin{aligned} w_n &= \frac{N!}{n!(N-n)!} w^{N-n} (1-w)^n = \\ &= \frac{N!}{n!(N-n)!} \exp[-(N-n)\alpha t] (1 - \exp[-\alpha t])^n. \end{aligned} \quad (3.51)$$

Представим (3.51) в следующем виде:

$$w_n = C_N^n p^n q^{N-n}, \quad (3.52)$$

где $p = 1 - \exp[-\alpha t]$; $q = 1 - p = \exp[-\alpha t]$.

Таким образом, случайная величина w_n описывается биномиальным законом распределения. Тогда в соответствии с [3] ее математическое ожидание и дисперсия равны:

$$m([RL]) = N_p = N(1 - \exp[-\alpha t]); \quad (3.53)$$

$$\sigma^2([RL]) = N_{pq} = N \exp[-\alpha t] (1 - \exp[-\alpha t]) \quad (3.54)$$

Заметим, что математическое ожидание числа оставшихся лиганд-рецепторных комплексов с точностью до обозначений совпадает с рассчитанным в § 3.1 исходя из закона действующих масс.

Кинетика ассоциации

Заметим, что выражения (3.53), (3.54) проще всего получить методом производящей функции [4]. Данный метод полностью идентичен методу дифференциальных уравнений для цепи Маркова и применяется в тех случаях, когда нет необходимости определять характер распределения случайной величины и требуется лишь найти моменты ее распределения. Обозначим

$P(n, t) = \sum_i p(i, t) n^i$ производящую функцию вероятностей, где $p(i, t)$ — вероятность существования в момент времени t ровно i лиганд-рецепторных комплексов. Тогда для производящей функции семиинвариантов $K(\varphi, t) = \ln P[\exp \varphi, t]$ верно следующее дифференциальное уравнение:

$$\frac{\partial K}{\partial t} = \alpha [\exp[-\varphi] - 1] \frac{\partial K}{\partial \varphi}.$$

Раскладывая производящую функцию семиинвариантов в ряд Тейлора, можно получить

$$\begin{aligned} \frac{dk_1}{dt} &= -\alpha k_1; \\ \frac{dk_2}{dt} &= \alpha k_1 - 2\alpha k_2, \end{aligned}$$

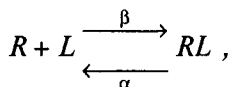
где k_1 и k_2 — первый и второй семиинвариант (математическое ожидание и дисперсия числа лиганд-рецепторных комплексов).

Тогда

$$\begin{aligned} k_1 &= N \exp[-\alpha t] \\ k_2 &= N \exp[-\alpha t] (1 - \alpha t) (1 - \exp[-\alpha t]) \end{aligned} \quad (3.55)$$

Видно, что выражение (3.55) совпадает с уравнениями (3.53), (3.54).

В случае образования лиганд-рецепторных комплексов данный процесс описывается схемой



где β — вероятность образования лиганд-рецепторных комплексов вследствие взаимодействия лиганда с рецептором.

При этом уравнение для производящей функции семиинвариантов выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial K}{\partial t} = \beta l [\exp \varphi - 1] \left(r - \frac{\partial}{\partial \varphi} \right) K + \alpha (\exp[-\varphi] - 1) \frac{\partial K}{\partial \varphi},$$

где l — числа молекул лиганда, r — суммарная концентрация свободного и связанного лиганда. Тогда

$$k_1 = \frac{lr}{\alpha/\beta + l} \{1 - \exp[-t(\alpha + \beta l)]\};$$

$$k_2 = \frac{\alpha\beta lr}{(\beta l + \alpha)^2} \{1 - \exp[-t(\alpha + \beta l)]\} + \frac{(\beta l)^2 r}{(\beta l + \alpha)^2} \exp[-t(\alpha + \beta l)] \times$$

$$\times \{1 - \exp[-t(\alpha + \beta l)]\}. \quad (3.56)$$

Таким образом, математическое ожидание числа лиганд-рецепторных комплексов по формуле (3.56) с точностью до обозначений идентично вычисляемому по формуле (3.1), предполагающей детерминистический характер лиганд-рецепторного взаимодействия.

Предполагая избыток начальной концентрации лиганда к начальной концентрации рецепторов, легко получить: $k_1 = k_2 \approx r$. Тогда ошибка, связанная с вероятностным характером лиганд-рецепторного взаимодействия, пропорциональна среднеквадратичному отклонению, или, $Err \equiv \sqrt{r}$. Исходя из этой оценки легко показать, что вероятностный характер лиганд-рецепторного взаимодействия в первую очередь следует учитывать при малых концентрациях рецепторов и (или) лиганда (при $l \gg r$).

Также отметим, что вероятностное описание процесса взаимодействия лигандов с рецепторами позволяет понять возможные механизмы отклонения кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия от уравнений (3.1) или (3.56), даже если оно протекает по схеме «один лиганд—один рецептор». Эти отклонения будут наблюдаться в тех случаях, когда хотя бы одно из предположений вероятностной модели взаимодействия лигандов с рецепторами не выполняется. При этом наиболее возможным является предположение о нарушении статистической независимости лиганд-рецепторного взаимодействия. Статистическая независимость может нарушаться при взаимодействии соизмеримых концентраций лиганда и рецептора, при наличии нескольких типов мест связывания лиганда и (или) при кооперативном связывании, при наличии конформационных изменений рецепторов и (или) лиганда, при наличии процесса диффузии лиганда и т.д.

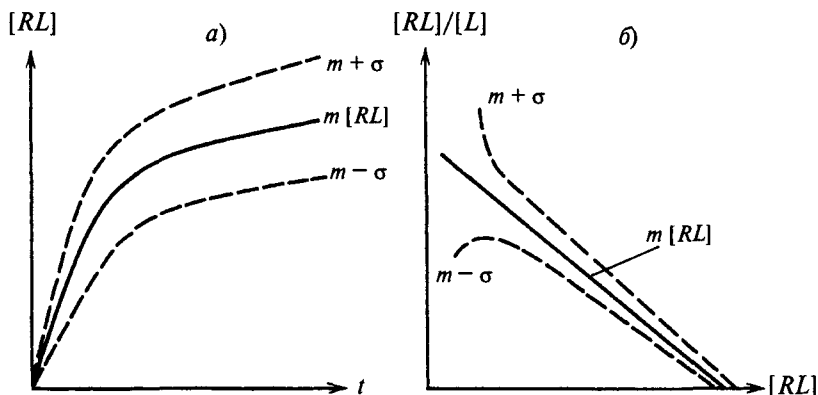


Рис. 3.96. Распределение ошибок в кинетике ассоциации лиганда с рецептором (а) и в координатах Скэтчарда (б).

Для того чтобы проиллюстрировать необходимость применения вероятностного подхода при описании лиганд-рецепторного взаимодействия, были рассчитаны распределения ошибок в различных координатах (рис. 3.96). Как видно из рис. 3.96а, с течением времени лиганд-рецепторного взаимодействия возрастает абсолютная и относительная ошибка, связанная с вероятностным характером лиганд-рецепторного взаимодействия, в прямых координатах. Как следует из рис. 3.96б, распределение ошибок в координатах Скэтчарда ограничивает применение этих координат. Это связано с тем, что ошибка максимальна в области, наиболее существенной для дискриминации моделей рецепторного связывания.

Литература

1. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Мевх А.Т. Итоги науки и техн. Сер. биоорг. химия, Т. 3. ВИНТИ, 1985.
2. Широков Ю.П., Юдин Н.П. Ядерная физика. М., 1980.
3. Феллер В. Введение в теорию вероятностей и ее приложения. М., 1967.
4. Bailey, N.T.J. The elements of Stochastic processes. London, 1964.

3.10. Феномен колебаний рецепторного связывания

Цени слово. Каждое может быть твоим последним.

С.Лец

Феномен колебаний рецепторного связывания — принципиально новое явление, описанное в 1991 г. Т. Сухомлин [1–3]. Данный феномен заключается в том, что концентрация связанного с NG-105 клетками лигандов с течением времени не выходит на плато, а подвергается незатухающим или слабо затухающим колебаниям (рис. 3.97).

Описаны: *периодические колебания* (период порядка 10 мин), *апериодические колебания* (не имеющие точного периода) и *экспоненциальные кривые*, соответствующие обычной кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия, описанной в § 3.1 и 3.3.

Для классификации колебаний было предположено, что связывание лиганда с рецептором описывается уравнением (экспоненциальный тренд):

$$[RL] = [RL]_{\max} \exp[-k_f t] - [RL]_f \exp[-k_f t - kt],$$

где $[RL]_{\max}$ — максимальная величина связывания; $[RL]_f$ — фо-

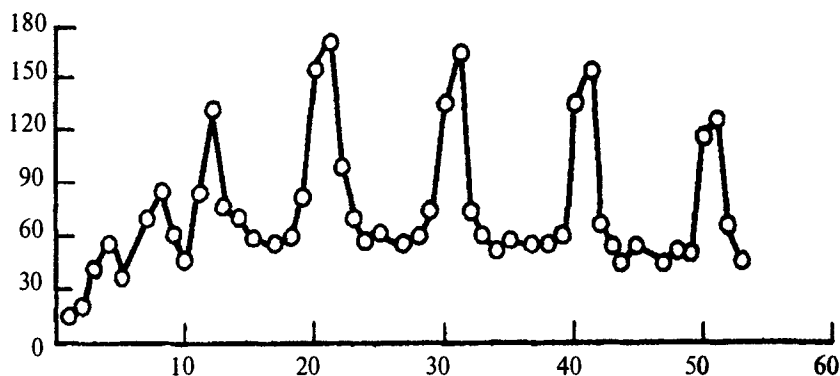


Рис. 3.97. Колебания рецепторного связывания. Взаимодействие [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с NG-105 клетками.

По оси абсцисс — время лиганд-рецепторного взаимодействия (мин), по оси ординат — количество связанного лиганда (фмоль на 10⁶ клеток) [3].

новое связывание; k_i — константа инактивации рецепторов; k — константа общей скорости взаимодействия лиганда с рецептором.

После выделения экспоненциального тренда определяли частоты колебаний. Если ни одна из амплитуд соответствующих частот не имела явного максимума, то полагали отсутствие колебаний. Эти кривые составили 35% общего числа кинетических кривых. Если одна из амплитуд соответствующей частоты имела явный максимум по сравнению с остальными амплитудами, то колебания относили к периодическими.

Интересно, что во всех случаях (независимо от модификации условий проведения эксперимента) период составил порядка 10 мин. При этом периодические колебания наблюдались в 23% случаев. Если несколько амплитуд соответствующих частот имели максимальные значения, то такие колебания относились к аperiodическим (не имеющим явного периода). Аperiodические колебания составили 21% наблюдаемых случаев. Остальные кинетические кривые невозможно было отнести к какому-либо определенному случаю.

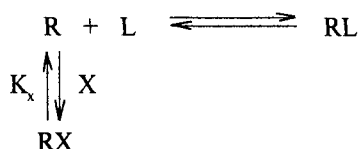
Причина переключения колебательного режима в экспоненциальный, как и природа аperiodических колебаний, пока не установлена. Принципиально важно, что связывание δ -опиатного антагониста дипренорфина всегда описывалось экспоненциальными кинетическими зависимостями. На основании этого наблюдения был сделан вывод, что активация сигнал-проводящей системы — необходимое условие возникновения колебаний рецепторного связывания.

Соответствующие расчеты показывают, что феномен колебаний рецепторного связывания не может быть связан со статистическим характером регистрации количества связанного лиганда. Предположение о вероятностном характере лиганд-рецепторного взаимодействия приводит к вариации экспериментальных данных порядка 3%, тогда как в эксперименте наблюдаемая вариация данных составляла порядка 50%.

Модель вынужденных колебаний рецепторного связывания

Т. Сухомлин и соавторы предложили описывать колебания рецепторного связывания моделью вынужденных колебаний. Механизм вынужденных колебаний рецепторного связывания может быть проиллюстрирован простой кинетической моделью.

Модель предполагает, что кратковременные периодические колебания рецепторного связывания являются следствием взаимодействия рецепторной системы с некоторым внутриклеточным регулятором X , концентрация которого изменяется в соответствии со слабовыраженными синусоидальными колебаниями:



где R — рецепторный комплекс; L — лиганд, RL — лиганд-рецепторный комплекс, k_1 — константа скорости ассоциации лиганда с рецептором, k_{-1} — константа скорости диссоциации лиганд-рецепторного комплекса, X — модулятор лиганд-рецепторного взаимодействия, динамика изменения концентрации которого описывается синусоидальной функцией, K_x — равновесная константа связывания модулятора (X) с рецепторным комплексом R в свободном состоянии.

Данная схема может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[RX]}{dt} &= k_x[R][X] - k_{-x}[RX]; \\
 \frac{d[RL]}{dt} &= k_{+1}[R][L] - k_{-1}[RL].
 \end{aligned}$$

Предположение, что взаимодействие с модулятором колебаний является быстрым по сравнению с лиганд-рецепторным взаимодействием, позволяет использовать равновесное описание данной стадии, что позволяет сократить число уравнений системы за счет использования следующего соотношения:

$$[R] = \frac{K_x[RX]}{[X]}.$$

Изменение концентрации модулятора можно представить так:

$$[X] = B + X_0 \sin wt,$$

где B и X_0 — константы, w — частота колебаний.

Тогда концентрация несвязанных с модулятором рецепторов представляется как

$$[R]_{ce} = [R_0] - [R] = [R_0] - \frac{K_X[RX]}{[X]} \equiv [R_0] - A \sin \omega t,$$

где A — константа.

Тогда

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[L][R]_{ce} - k_{-1}[LR];$$

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{+1}[L][R_0] - k_{+1}[L][LR] - k_{+1}[L]A \sin \omega t - k_{-1}[LR].$$

Применим преобразования Лапласа [4] к левой и правой части этого равенства:

$$s[LR] = \frac{[R_0][L]k_{+1}}{s} - [L][LR]k_{+1} - \frac{wA[L]k_{+1}}{s^2 + w^2} - k_{-1}[LR];$$

$$[LR] = \frac{[R_0][L]k_{+1}}{s(s + k_{+1} + k_{-1})} - \frac{1}{s(s + k_{+1} + k_{-1})} \frac{wA[L]k_{+1}}{s^2 + w^2}.$$

Возвращаясь к плоскости оригиналов получим

$$[LR] = \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd} \{1 - \exp[-(k_{+1}[L] + k_{-1})t]\} - \frac{wA[L]k_{+1}}{(k_{+1}[L] + k_{-1})^2 + w^2} \times \\ \times \left(\exp[-(k_{+1}[L] + k_{-1})t] + \frac{k_{+1}[L] + k_{-1}}{w} \sin \omega t - \cos \omega t \right).$$

Полученное равенство можно переписать в следующем виде:

$$[LR] = C(1 - \exp[\lambda t]) + D(\exp[\lambda t] + b \sin \omega t + a \cos \omega t),$$

где

$$C = \frac{[R_0][L]}{[L] + Kd}; \quad D = -\frac{wA[L]k_{+1}}{(k_{+1}[L] + k_{-1})^2 + w^2};$$

$$\lambda = -k_{+1}[L] + k_{-1};$$

$$a = -1; \quad b = \frac{k_{+1}[L] + k_{-1}}{w}.$$

Первый член уравнения описывает «обычную» кинетику лиганд-рецепторного взаимодействия, рассмотренную в § 3.1, вто-

рой член характеризует феномен колебаний рецепторного связывания.

Заметим, что

$$a \cos wt + b \sin wt = \sqrt{a^2 + b^2} \left(\frac{a}{\sqrt{a^2 + b^2}} \cos wt + \frac{b}{\sqrt{a^2 + b^2}} \sin wt \right) = \\ = \sqrt{a^2 + b^2} (\cos \varphi \cos wt + \sin \varphi \sin wt) = \sqrt{a^2 + b^2} [\cos (wt - \varphi)],$$

где

$$\varphi = \operatorname{arctg} a/b.$$

Таким образом, полученная модель позволяет описывать феномен колебаний рецепторного связывания. При этом наблюдаемая частота колебаний рецепторного связывания совпадает с вынуждающей частотой колебаний модулятора; кроме того, как следует из полученного уравнения, наблюдается сдвиг по фазе между колебаниями модулятора и колебаниями концентраций связанного с рецептором лиганда. Примечательно, что предложенная модель позволяет описать различные виды кинетических зависимостей, относящихся к типу кратковременных колебаний, в том числе и наложение колебаний на экспоненциальную кинетику.

Как оказалось, в рамках предложенной модели может быть решена и обратная задача: методом нелинейной регрессии с использованием полученного уравнения были оценены параметры кратковременных колебаний рецепторной активности — частота, сдвиг по фазе, концентрация рецепторов, отношение концентрации модулятора X к равновесной константе его взаимодействия с рецептором и кинетические константы лиганд-рецепторного взаимодействия. Соответствие оцененных параметров реальной системе и условиям проведения эксперимента служит подтверждением непротиворечивости модели.

В рамках модели вынужденных колебаний рецепторного связывания открытым остается вопрос о природе модулятора. Определенных данных на этот счет нет. Согласно мнению Т. Сухомлин, одним из возможных источников периодических колебаний может быть соотношение ГТФ/ГДФ, возникающее при гликолитических колебаниях [5].

Литература

1. Сухомлин Т.К., Мелихова Е.М., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д. Биохимия, 1992. Т. 52. № 11. С. 1648–1657.
2. Сухомлин Т.К., Мелихова Е.М., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д. ДАН СССР, 1991. Т. 320. № 2. С. 481–484.
3. Sukhomlin T.K., Melikhova E.M., Kurochkin I.N., Varfolomeev S.D. Biochimica et Biophysica Acta, 1992. V. 1135. P. 226–228.
4. Бронштейн И.Н., Семендяев К.А. Справочник по математике. М., 1986.
5. Corkey B.E., Tornheim K., Deenney J.T., Glennon M.C., Parker J.C., Matschinsky F.M., Ruderman N.B., Prentki M.//J .Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 4254–4258.

ВВЕДЕНИЕ В ФАРМАКОКИНЕТИКУ

Лекарственное вещество — любое химическое соединение, которое, будучи скормлено подопытному животному, дает научную статью.

А. Сент-Дьердьи

4.1. Математические модели фармакокинетики

Если Вы модель решили
В фарм. кинетике составить —
Не стесняйтесь и берите
Сразу камер сорок пять.
Рецензенты ведь, наверно,
Ничего понять не смогут,
Только скажут: «Это ново»,
Что позволит без проблемы
Вам модель публиковать.

По Г. Остеру

Фармакокинетика

Структурная специфичность лекарственных веществ к эффекторным системам (рецепторам) — необходимое, но недостаточное условие проявления их действия на организм. Если предположить, что концентрация рецепторов и их аффинность постоянны, то биологический эффект будет определяться концентрацией лекарственного вещества, его форм и метаболитов, в тканях и жидкостях организма. Изучением закономерностей изменения концентраций лекарственных веществ занимается фармакокинетика. Основы фармакокинетики рассмотрены в настоящей главе.

Фармакокинетика изучает закономерности изменения концентрации лекарственных веществ и их метаболитов в средах организма с течением времени.

Основная цель фармакокинетики — оптимизация дозирования лекарственного вещества с целью улучшения терапевтического эффекта и уменьшения токсического. *Прикладная задача фармакокинетики* заключается в выявлении связей между концентрация-

ми лекарственного вещества и его метаболитов в различных средах организма и фармакологическим эффектом.

История фармакокинетики

Чем крупнее достижения ученого, тем короче и точнее можно их описать

П.Л. Капица

Историю фармакокинетики невозможно представить без имени Л.С. Штерн, предложившей в 1918 г. учение о гистогематических барьерах. Благодаря развитию этого учения сложилось представление о существовании в организме жидкостей, относительно изолированных друг от друга. В современной фармакокинетике наиболее часто выделяют: кровь, лимфу, жидкости анатомических полостей (ликвор, плевральную, перикардитическую и т.д.) и межтканевую (интерстициальную) жидкость. Лекарственное вещество, попадая в одну из этих жидкостей, имеет весьма ограниченную возможность проникновения в другую.

Первая фармакокинетическая модель была предложена в 1919 г. Видмарком. В 1937 г. Т. Теорелл разработал более сложные фармакокинетические модели, чем были известны ранее. В 50-х годах Е. Крюгер-Тимер систематизировал линейные фармакокинетические модели и предложил ряд нелинейных моделей.

Термин «фармакокинетика» введен Ф. Достом в 1953 г.

Основные понятия фармакокинетики

Неизменно помни, что природа — не Бог, человек — не машина, гипотеза — не факт.

Дидро

Фармакокинетика использует ряд понятий и терминов, определение которых необходимо для понимания излагаемого материала.

Доза — количество лекарственного вещества, введенного в организм. Выделяют *разовую*, *суточную* и *курсовые* дозы. В разовых дозах обычно назначают препараты для экстренного вмешательства в жизнедеятельность организма, действие таких лекарственных веществ, как правило, развивается достаточно быстро. В суточных дозах обычно назначают препараты, которые обладают *кумулятивным* (накопительным) эффектом. При этом суточная доза может быть разделена на несколько приемов. В курсовых дозах чаще назначают препараты с отсроченным терапевтическим эффектом. Для некоторых препаратов такого типа эмпирически подобраны *схемы введения*, определяющие то количество

лекарственного вещества, которое необходимо ввести в тот или иной день проводимой терапии.

Для определения доз лекарственных веществ, которые необходимо ввести в организм, обычно используют экспериментальный метод, определяя на подопытных животных эффекты, вызванные введением широкого диапазона доз. Определяют эффективную, токсическую и летальную дозы.

Под *эффективной* понимают дозу, вызывающую желаемый эффект. Под *токсической* понимают дозу, приводящую к развитию токсических осложнений. Под *летальной* понимают дозу, приводящую к гибели подопытных животных. Эти дозы принято обозначать как ED (effective dose), TD (toxic dose) и LD (lethal dose). Чаще всего определяют ED₁, ED₅₀, ED₉₉, TD₁, TD₅₀, TD₉₉, LD₁, LD₅₀ и LD₉₉, т.е. дозы, вызвавшие эффект (гибель) у 1% исследуемых животных, 50 и 99%. ED₁ характеризует минимальную дозу, способную оказывать терапевтический эффект. ED₅₀ характеризует дозу, вызывающую эффект у половины исследованных животных. ED₉₉ характеризует дозу, вызывающую эффект практически у всех животных.

Следует заметить, что для одного и того же препарата эффективная доза может отличаться в зависимости от того, какой эффект является желаемым. Так, эффективная доза ацетилсалициловой кислоты в качестве антикоагулянта составляет 0,5–1 г в день (для взрослого человека). Эффективная доза этого же препарата как противоревматического средства составляет 5 г в день.

Кроме того, отметим, что ED определяется только на животных. В случае человека для ряда препаратов известны лишь значения TD.

Чем больше интервал между ED₅₀ и LD₅₀, тем более безопасным является применение данного препарата. Если ED₉₉ < LD₁, то в терапевтических дозах препарат токсических эффектов не вызывает. Если ED₁ ≥ LD₁, то даже в минимальной дозе применение данного препарата сопряжено с развитием токсических осложнений.

Относительно безопасным является применение нестероидных противовоспалительных препаратов, диуретиков, сердечных гликозидов и ряда других. Применение противоопухолевых препаратов, нейролептиков и др. практически всегда сопряжено с риском развития токсических осложнений.

Эксперименты на животных не позволяют выявить все возможные терапевтические и побочные эффекты. Особенно это касается куммулятивных (накопительных) эффектов и эффектов пролонгированного применения препаратов. Также на животных трудно

определить тератогенное (вызывающее аномалии развития плода) и мутагенное действие. Поэтому после испытания новых лекарственных препаратов на животных их испытывают на людях — и лишь затем разрешают для повсеместного применения.

К примеру, антипирин и бутадиион выводятся из организма животных в 10–100 раз быстрее, чем из организма человека. Поэтому их анальгетический эффект на животных достигается лишь в токсических дозах. Следовательно, данные препараты не могли бы успешно пройти доклинические испытания на животных [9].

Также хочется отметить, что, по данным проф. В.А. Горькова, из всех препаратов, успешно прошедших доклинические испытания на животных, лишь 2% обнаруживают клиническую эффективность на людях.

При изучении действия лекарственных препаратов на людей определяют минимальную терапевтическую и минимальную токсическую дозы. *Минимальная терапевтическая доза* (аналог ED₁) определяется минимальным количеством лекарственного препарата, которое необходимо ввести для получения терапевтического эффекта. *Минимальная токсическая доза* (аналог TD₁) определяется минимальным количеством лекарственного вещества, при котором начинается развитие нежелательных, побочных или токсических явлений. Разница между минимальной токсической и минимальной терапевтической дозой называется *терапевтическим диапазоном (широтой терапевтического действия лекарственного вещества)*. Чем шире терапевтический диапазон, тем меньше вероятность возникновения осложнений при применении данного лекарственного вещества.

Минимальная терапевтическая и минимальная токсическая дозы лекарственного вещества во многом определяются путем введения лекарственного вещества в организм. Основные пути введения представлены на рис. 4.1. Путь введения лекарственного вещества во многом определяет его биотрансформацию и биодоступность.

Биотрансформация — совокупность процессов превращения лекарственного вещества и образования его метаболитов. *Степень биодоступности* определяется той частью введенного лекарственного вещества, которая достигла эффекторных органов и тканей.

При пероральном введении лекарственного вещества скорость его всасывания обычно небольшая, биодоступность лекарственного вещества, как правило, невелика, так как всасывается только часть введенного препарата; кроме того, многие препараты разрушаются в желудочно-кишечном тракте, а всосавшиеся



Рис. 4.1. Основные пути введения лекарственных средств [2].

вещества проходят через печень, где многие из них подвергаются биологической трансформации, что приводит к уменьшению биодоступности. Поэтому перорально обычно назначают вещества в суточных и курсовых дозах. Следует заметить, что при пероральном введении доза лекарственного вещества выше соответствующих доз для инъекционного введения, так как при пероральном введении биодоступность препаратов ниже.

При инъекционном внутривенном введении лекарственные вещества быстро поступают в кровоток. Их биодоступность велика. При инъекционном подкожном введении скорость поступления лекарственных веществ уменьшается. Однако из-за отсутствия процессов разрушения лекарственных веществ в месте введения их биодоступность также велика, как и при внутривенных инъекциях.

Так, инсулин при инсулинзависимой форме сахарного диабета вводят подкожно для постепенного, медленного и достаточно равномерного поступления препарата. При этом энтеральное введение данного препарата невозможно из-за того, что в желудочно-кишечном тракте инсулин подвергается практически 100%-ному разрушению.

Однокамерные фармакокинетические модели

Основным понятием фармакокинетики является камера (compartment). *Камера* представляет собой ограниченный в пространстве объем жидкости (ткани), при этом концентрация лекарственного вещества во всех пространственных точках данной камеры предполагается одинаковой. Объем камеры также предполагается практически постоянным и не меняющимся с течением времени.

Камерное представление организма является модельным, упрощенным. Оно основано на учении о гистогематических барьерах Л.С. Штерн. В качестве камер могут выступать кровь, лимфа, межтканевая жидкость и жидкость естественных анатомических областей.

В простейшем случае предполагают наличие только одной камеры. Такие фармакокинетические модели называются *однокамерными*. Схема простейшей однокамерной модели приведена на рис. 4.2. При этом предполагается, что лекарственное вещество введено в камеру одномоментно, а скорость его выведения пропорциональна количеству вещества, находящегося в данный момент в камере. Тогда согласно закону действующих масс

$$\frac{dm}{dt} = -k_{el}m, \quad (4.1)$$

где m — масса лекарственного вещества; k_{el} — константа элиминации (выведения) лекарственного вещества.

Чем больше константа скорости элиминации, тем быстрее ле-

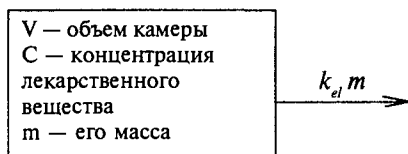


Рис. 4.2. Схема простейшей однокамерной фармакокинетической модели.

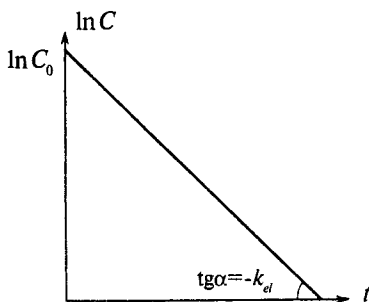


Рис. 4.3. Определение параметров простейшей однокамерной фармакокинетической модели.

карственное вещество выводится из организма, тем меньше время его действия. Очевидно, что

$$m = m_0 \exp[-k_{el} t], \quad (4.2)$$

где m_0 — начальная масса лекарственного вещества.

Следует заметить, что в реальных фармакокинетических исследованиях часто измеряют не массу лекарственного вещества, а его концентрацию. Предполагая условный (кажущийся) объем камеры V постоянным, связь между массой и концентрацией вещества C запишется следующим образом:

$$m = VC.$$

Тогда (4.1) переписывается как

$$\frac{dVC}{dt} = V \frac{dC}{dt} = -k_{el}VC; \quad \frac{dC}{dt} = -k_{el}C,$$

а (4.2) как

$$C = C_0 \exp[-k_{el} t], \quad (4.3)$$

где C_0 — начальная концентрация лекарственного вещества.

Прологарифмировав уравнение (4.3), получаем

$$\ln C = \ln C_0 - k_{el} t. \quad (4.4)$$

Таким образом, в случае простейшей однокамерной модели зависимость концентрации лекарственного вещества от времени в полупологарифмических координатах является линейной. При этом тангенс угла наклона равен константе скорости элиминации, а ордината точки пересечения прямой с осью абсцисс — начальной концентрации лекарственного вещества (см. рис. 4.3).

Определив C_0 и m_0 , рассчитывают кажущийся объем V распределения лекарственного вещества. Кажущийся объем является важнейшим параметром фармакокинетической модели. Если при введении в кровь V составляет менее 5% всего объема организма, то лекарственное вещество находится только в крови. Если V со-

Таблица 4.1

Фармакокинетика внутривенного введения диазоксида

Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)
1	2,2
5	1,9
10	1,5
20	1,0

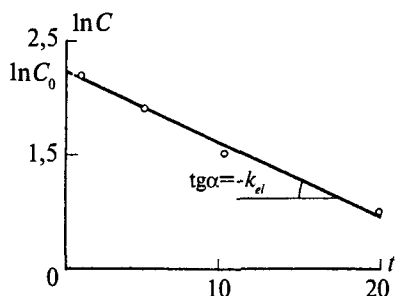


Рис. 4.4. Фармакокинетика внутривенного введения диазоксид.

ставляет от 5 до 100% объема организма, то лекарственное вещество распределяется по органам и тканям. Если V превышает 100% от объема организма, то происходит накопление и концентрирование лекарственного вещества в тканях.

Исходя из кажущегося объема распределения лекарственного вещества рассчитывают величину *клиренса*:

$$Cl = k_{el} V.$$

Размерность клиренса: объем/время. Например: мл/мин, л/ч.

Клиренс характеризует суммарную эффективность систем выведения (элиминации) лекарственного вещества из организма легкими, кожей, печенью, почками и т.д. Уменьшение величины клиренса свидетельствует о серьезных изменениях в функционировании систем организма и о накоплении в организме токсичных продуктов метаболизма.

Пример 4.1. В работе [21] изучали фармакокинетику диазоксид, вводимого внутривенно детям в дозе 12 мг. Определить параметры фармакокинетической модели. Результаты представлены в табл. 4.1.

Графически эти экспериментальные данные приведены на рис. 4.4. По точке пересечения с осью Y определяем $\ln C_0 = 2,3$, $C_0 = \exp[2,3] = 10$ мкг/мл. По тангенсу угла наклона находим $k_{el} = 1,6 \text{ ч}^{-1}$, $V = C_0/m = 2000 \text{ мкг}/10 \text{ мкг/мл} = 200$ мл. Кажущийся объем камеры составляет менее 5% объема тела. Следовательно, диазоксид находится только в крови.

Время полувыведения лекарственного вещества

Важное свойство однокамерных моделей можно вывести непосредственно из уравнения (4.4). Обозначим $C_0/2$ концентрацию, вдвое меньшую начальной, а $\tau_{1/2}$ — время достижения этой концентрации (*время полувыведения лекарственного вещества*). Тогда

$$\ln (C_0/2) = \ln C_0 - k_{el} \tau_{1/2}.$$

Или

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}. \quad (4.5)$$

Таким образом, для однокамерных моделей время полувыведения лекарственного вещества не зависит от его начальной концентрации.

Однокамерные фармакокинетические модели с всасыванием

Более сложный случай, чем был рассмотрен выше, представляют собой *однокамерные модели с всасыванием* (рис. 4.5). При этом предполагается, что введенный лекарственный препарат может всасываться в камеру пропорционально своей массе. Тогда дифференциальные уравнения закона действующих масс для данной модели запишутся следующим образом:

$$\begin{aligned}\frac{dm_1}{dt} &= -k_1 m_1 ; \\ \frac{dm}{dt} &= k_1 m_1 - k_{el} m ,\end{aligned}\tag{4.6}$$

где m_1 — масса вещества в месте введения; k_1 — константа скорости поступления препарата в камеру (константа скорости всасывания).

Предполагается, что начальная масса введенного лекарственного вещества равна M , при этом в начальный момент времени в самой камере лекарственного вещества нет. Тогда достаточно очевидно, что

$$m = \frac{Mk_1}{k_1 - k_{el}} (\exp[-k_1 t] - \exp[-k_{el} t]) .$$

Или, переходя к концентрациям,

$$C = \frac{Mk_1}{V(k_1 - k_{el})} (\exp[-k_{el} t] - \exp[-k_1 t])\tag{4.7}$$

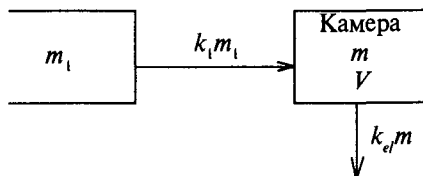


Рис. 4.5. Схема однокамерной фармакокинетической модели с всасыванием.

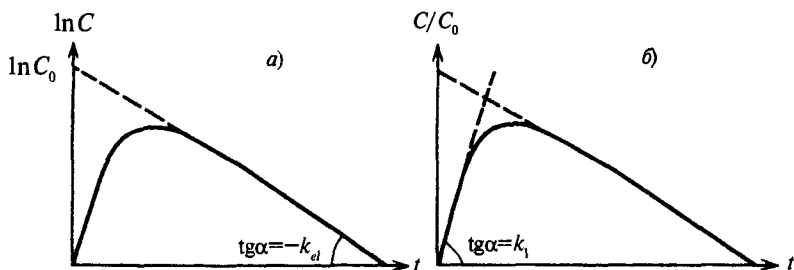


Рис. 4.6. Определение параметров однокамерной фармакокинетической модели с всасыванием.

a — определение параметра C_0 , *б* — определение константы всасывания и константы элиминации.

или

$$C = C_0 (\exp[-k_{el}t] - \exp[-k_1t]), \quad (4.8)$$

где $C_0 = \frac{Mk_1}{V(k_1 - k_{el})}$.

Как правило, константа скорости всасывания много больше константы скорости элиминации лекарственного вещества. Поэтому при малых временах протекания фармакокинетического процесса наиболее существенным является поступление лекарственного вещества в камеру, тогда как элиминацией можно пренебречь. Наоборот, при больших временах протекания процесса поступление лекарственного вещества в камеру отсутствует и концентрация лекарственного вещества в камере изменяется за счет элиминации. Таким образом, при малых временах протекания процесса уравнение (4.8) запишется следующим образом:

$$C(t)_{t \rightarrow 0} = C_0(1 - \exp[-k_1t]),$$

а при больших временах

$$C(t)_{t \rightarrow \infty} = C_0 \exp[-k_{el}t].$$

При малых временах наблюдения за процессом можно разложить экспоненту в ряд Тейлора:

$$\exp[-k_1t] \approx 1 - k_1t.$$

Тогда

$$C(t)_{t \rightarrow 0} = C_0(1 - [1 - k_1t]) = C_0k_1t.$$

Тогда константы поступления лекарственного вещества в камеру и элиминации можно найти по тангенсам углов наклона асимптот, проведенных к начальным и конечным участкам графика в координатах $[C/C_0, t]$, при этом параметр C_0 находится как пересечение оси Y с асимптотой к конечному участку графика в координатах $[\ln C_0, t]$ (рис. 4.6)*.

Следует заметить, что для правильного определения показателей экспонент на каждую из них должно приходиться не менее 4–5 точек.

Пример 4.2. В [3] приведены данные по фармакокинетике цефалексина в крови мышей, получивших этот препарат перорально в дозе 40 мг/кг. На основании данных табл. 4.2 определить параметры фармакокинетической модели.

Графически эти экспериментальные данные представлены на рис. 4.7. В полулогарифмических координатах определяем $\ln C_0 = 1,8$, $C_0 = 6,05$ мкг/мл (рис. 4.7а). По тангенсу угла наклона конечных участков кривой $k_{el} = 0,2 \text{ ч}^{-1}$. В координатах $[C/C_0, t]$ (рис. 4.7б) по тангенсу угла наклона начальных участков кривой определяем $k_1 = 0,9 \text{ ч}^{-1}$. Кажущийся объем камеры $V = Mk_1 / (C_0 (k_1 - k_{el})) = 80$ мл/кг. Таким образом, кажущийся объем камеры составляет менее 5% массы тела. Следовательно, цефалексин распределяется только в одной камере (крови).

Двухкамерные фармакокинетические модели

Анализ фармакокинетики многих препаратов показал, что в ряде случаев экспериментальные данные не удается спрямить в полулогарифмических координатах даже при условии непосред-

Таблица 4.2

Фармакокинетика перорального введения цефалексина

Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)	Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)	Время, ч	ln (концентрация, мкг/мл)
0,03	0,45	0,7	1,2	2,5	0,99
0,1	0,2	0,8	1,3	3	0,96
0,2	0,35	1	1,39	3,5	0,69
0,4	0,67	1,2	1,38	4	0,6
0,5	1	1,5	1,29	4,5	0,48
0,6	1,1	2	1,21	5	0,31

* См. также гл. 6.

ственного введения препарата в исследуемую ткань. Это означает, что предположение о нахождении лекарственного вещества только в одной камере является неправильным. Следовательно, для описания экспериментальных данных необходимо использовать более сложные многокамерные модели.

Следует заметить, что применение чрезмерно большого числа камер для описания фармакокинетики лекарственного вещества зачастую не является оправданным, так как при этом не удастся определить изменение концентрации вещества в каждой из камер. Поэтому на практике редко используют более чем двухкамерные модели.

Схема простейшей двухкамерной модели приведена на рис. 4.8. Предполагается, что лекарственное вещество массой M одновременно вводится в камеру 1. Из камеры 1 в камеру 2 лекарственное вещество поступает вследствие массопереноса, скорость которого пропорциональна количеству вещества в первой камере. Кроме того, лекарственное вещество элиминировано из первой камеры. Скорость элиминации меньше, чем скорость массопереноса. Из второй камеры лекарственное вещество поступает в первую таким же образом.

Заметим, что лекарственное вещество может оказывать терапевтическое воздействие как в камере 1, так в камере 2. В случае, если лекарственное вещество оказывает физиологическое воздействие в камере 1, камера 2 является «резервуаром» («депо») для лекарственного вещества. В качестве такого депо могут выступать печень, альбумины крови и т.д.

Такое перераспределение также может быть связано с диссоциацией лекарственного вещества. При этом терапевтическим действием может обладать только одна (протонизированная или деп-

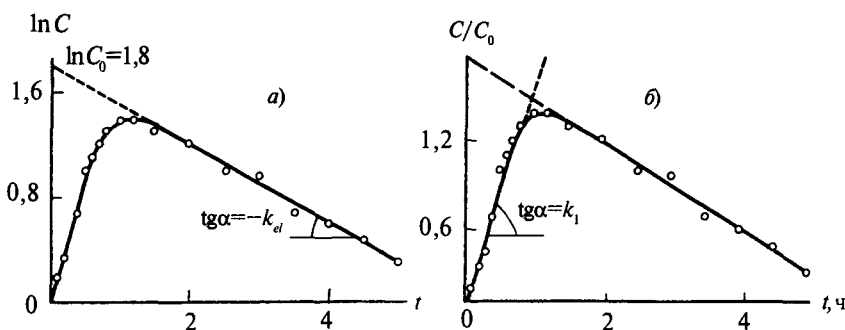


Рис. 4.7. Фармакокинетика перорального введения цефалексина.

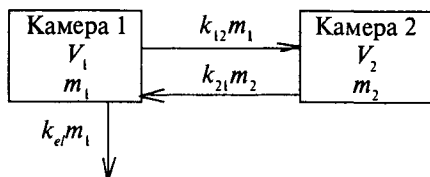


Рис. 4.8. Схема простейшей двухкамерной фармакокинетической модели.

ротенизированной) форма лекарственного вещества, а элиминации подвергаться другая форма лекарственного вещества. В этом случае для описания фармакокинетической модели удобно использовать уравнение Хендерсона-Хассельблаха (см. § 1.4):

$$\ln y = pH - pK,$$

где y — доля диссоциированных молекул, pK — логарифм равновесной константы диссоциации.

Однако наиболее часто лекарственное вещество вводится в камеру 1, а действует в камере 2. В этом случае в качестве первой камеры может выступать кровь, в качестве второй — интратестикулярная жидкость.

Запишем закон действующих масс для двухкамерной модели, представленной рис. 4.8:

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{dt} &= -(k_{el} + k_{12})m_1 + k_{21}m_2; \\ \frac{dm_2}{dt} &= k_{12}m_1 - k_{21}m_2; \\ m_1(0) &= M, m_2(0) = 0. \end{aligned} \quad (4.9)$$

Решить систему (4.9) можно с помощью метода неопределенных коэффициентов и с помощью преобразований Лапласа (см. гл. 6). Данное преобразование позволяет перейти от системы дифференциальных уравнений (4.9) к системе алгебраических уравнений:

$$\begin{aligned} sm_1 - M &= -(k_{el} + k_{12})m_1 + k_{21}m_2; \\ sm_2 - 0 &= k_{12}m_1 - k_{21}m_2. \end{aligned} \quad (4.10)$$

где s — комплексная переменная (аналог времени на комплексной плоскости).

Таким образом, преобразование Лапласа аналогично замене

дифференциала dx/dt на многочлен $sx - x_0$, где x_0 — начальные условия задачи Коши (4.9).

Из второго уравнения системы (4.10) получаем

$$m_2 = \frac{k_{12}m_1}{s + k_{21}}.$$

Тогда первое уравнение системы преобразуется как

$$sm_1 + (k_{el} + k_{12})m_1 - k_{12} \frac{k_{12}m_1}{s + k_{21}} = M;$$

$$[s^2 + s(k_{12} + k_{el} + k_{21}) + k_{el}k_{21}]m_1 = M(s + k_{21}).$$

Решение данной системы определяется корнями характеристического уравнения

$$s^2 + s(k_{12} + k_{el} + k_{21}) - k_{12}^2 + k_{12}k_{21} + k_{el}k_{21} = 0.$$

Показано, что при любых значениях констант k_{el} , k_{12} и k_{21} корни данного уравнения действительны. Обозначим:

$$\alpha = \frac{k_{12} + k_{el} + k_{21} + \sqrt{(k_{12} + k_{el} + k_{21})^2 - 4k_{el}k_{21}}}{2};$$

$$\beta = \frac{k_{12} + k_{el} + k_{21} - \sqrt{(k_{12} + k_{el} + k_{21})^2 - 4k_{el}k_{21}}}{2}.$$

Или ($\alpha > \beta$)

$$\alpha + \beta = k_{el} + k_{12} + k_{21};$$

$$\alpha\beta = k_{el}k_{21}.$$

Тогда решения системы (4.9) записываются следующим образом:

$$\begin{aligned} C_1(t) &= \frac{m_1}{V_1} = A_1 \exp[-\alpha t] + A_2 \exp[-\beta t]; \\ C_2(t) &= \frac{m_2}{V_2} = B(\exp[-\beta t] - \exp[-\alpha t]). \end{aligned} \quad (4.11)$$

Константы A_1 , A_2 и B :

$$A_1 = \frac{\alpha - k_{21}}{V_1(\alpha - \beta)} M; \quad A_2 = \frac{k_{21} - \beta}{V_1(\alpha - \beta)} M; \quad B = \frac{k_{21}}{V_1(\alpha - \beta)} M.$$

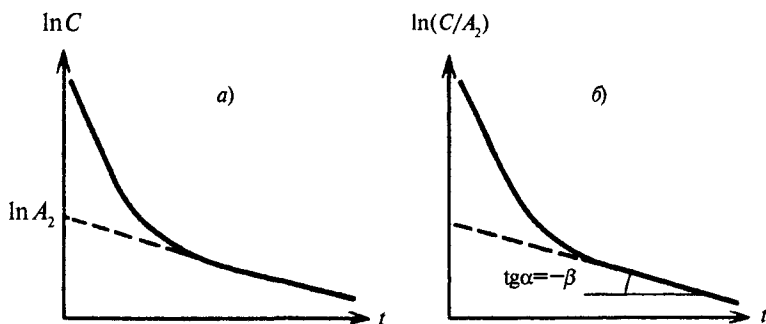


Рис. 4.9. Определение параметров медленной экспоненты для двухкамерной фармакокинетической модели.

Как следует из (4.11), концентрация вещества во второй камере изменяется аналогично случаю однокамерной модели с всасыванием лекарственного вещества. Поэтому если в эксперименте измеряют концентрацию лекарственного вещества во второй камере, то параметры фармакокинетической модели определяются методами, рассмотренными выше.

В случае, если концентрация лекарственного вещества во второй камере определяется по результатам изменения концентрации вещества в первой камере, то, как следует из (4.11), вычисляемая в этом случае концентрация C_2 является «фиктивной». Она связана с истинным значением концентрации $C_{2\text{ист}}$ следующим соотношением:

$$C_2 = C_{2\text{ист}} V_2 / V_1 .$$

Поэтому величину V_2 по результатам измерения концентрации вещества в первой камере определить невозможно.

В случае, если концентрацию лекарственного вещества определяют в первой камере, она складывается из двух экспонент: «быстрой» (с показателем α) и «медленной» (с показателем β). Вначале определяют параметры «медленной» экспоненты. Для этого в полулогарифмических координатах проводят абсциссу к конечным участкам графика вплоть до точки пересечения с осью Y , равной $\ln A_2$ (рис. 4.9а). Величину β определяют по тангенсу угла наклона касательной к конечным участкам графика (рис. 4.9а). После этого из всех значений концентраций вычитают величину $A_2 \exp[-\beta t]$ для каждого значения времени, для которого производилось измерение. Вычисленные величины содержат информацию только об одной экспоненте $A_1 \exp[-\alpha t]$. Ее параметры находятся аналогично тому,

Фармакокинетика внутривенного введения гентамицина

Время, мин	$\ln$ (измеренная концентрация, мкг/мл)	$\ln$ (вычисленная концентрация, мкг/мл)
10	1,7	1,2
20	1,4	0,7
30	1,1	0,1
40	0,7	-1,7
50	0,5	—
60	0,45	—
80	0,35	—
100	0,25	—
120	0,15	—
150	0,05	—

Примечание: — значения не вычислялись.

как это было описано для простейших однокамерных фармакокинетических моделей без всасывания*.

Следует заметить, что для правильного определения параметров экспонент необходимо не менее 4–5 экспериментальных точек на каждую экспоненту.

Пример 4.3. В работе [19] изучали фармакокинетику гентамицина в сыворотке крови кошки после внутривенного введения препарата. Результаты эксперимента приведены в табл. 4.3. Определить параметры фармакокинетической модели.

Вначале определим параметры «медленной» экспоненты. Для этого в полулогарифмических координатах проведем асимптоту к конечным участкам графика. Точка пересечения этой асимптоты с осью Y даст значение $\ln A_2 = 0,8$ (рис. 4.10а). Следовательно, $A_2 = 2,2$. По тангенсу угла наклона асимптоты, полученной при больших t , в координатах $[\ln C/A_2, t]$ определяем значение $\beta = 0,0046 \text{ мин}^{-1}$. Вычитаем из измеренной концентрации величины (см. табл. 4.3, «вычисленная концентрация»). Невычисленные значения соответствуют «медленной» экспоненте. Для вычисленной концентрации C_p строим график в полулогарифмических координатах (рис. 4.10б). По точке пересечения

* См. также гл. 6.

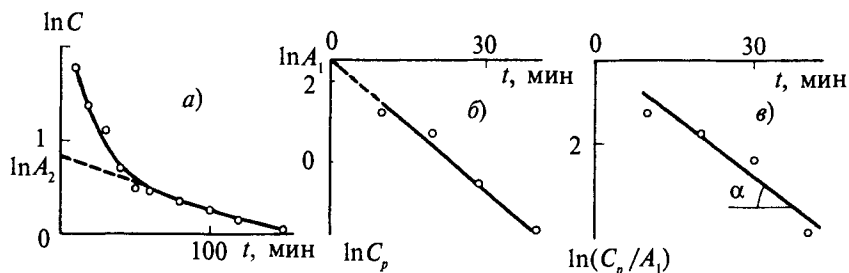


Рис. 4.10. Определение параметров двухкамерной фармакокинетической модели без всасывания.

асимптоты с осью Y находим $A_2 = 12,2$. В координатах $[\ln (C_p/A_1), t]$ находим $\alpha = 0,094 \text{ мин}^{-1}$ по тангенсу угла наклона касательной к графику (рис. 4.10в).

Двухкамерные фармакокинетические модели с всасыванием

Наиболее сложным представляется случай *двухкамерной модели с всасыванием* (рис. 4.11). Закон действующих масс для этой модели запишется следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= -k_1 m, m(0) = M ; \\ \frac{dm_1}{dt} &= k_1 m - (k_{el} + k_{12})m_1 + k_{21}m_2, m_1(0) = 0 ; \\ \frac{dm_2}{dt} &= k_{12}m_1 - k_{21}m_2, m_2(0) = 0 . \end{aligned} \quad (4.12)$$

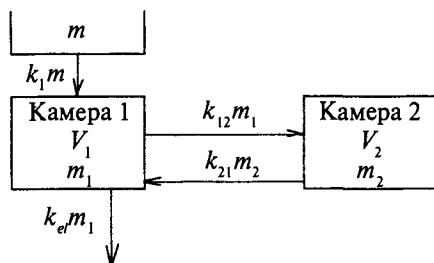


Рис. 4.11. Схема двухкамерной фармакокинетической модели с всасыванием.

Решение данной системы записывается следующим образом:

$$C_1 = A_1 \exp(-\alpha t) + A_2 \exp(-\beta t) - (A_1 + A_2) \exp(-k_1 t) ;$$

$$C_2 = (B_1 + B_2) \exp(-k_1 t) + B_1 \exp(-\alpha t) + B_2 \exp(-\beta t). \quad (4.13)$$

Параметры α и β связаны с константами скоростей следующими соотношениями:

$$\alpha + \beta = k_{el} + k_{12} + k_{21};$$

$$\alpha\beta = k_{el}k_{21} ,$$

при этом потребуем, чтобы $\alpha > \beta$.

Коэффициенты уравнения (4.13) определяются по формулам:

$$A_1 = \frac{k_1(\alpha - k_{21})}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M ;$$

$$A_2 = \frac{k_1(k_{21} - \beta)}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M ;$$

$$B_1 = \frac{k_1 k_{12}}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M ;$$

$$B_2 = \frac{k_1 k_{12}}{V_1(k_1 - \alpha)(\alpha - \beta)} M .$$

Параметры зависимости (4.13) определяют графическим методом, начиная с «медленной» экспоненты, описывающей процесс элиминации лекарственного вещества. Затем находят

$\ln(C, \text{мкг/мл})$

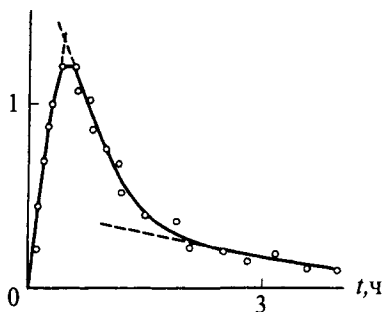


Рис. 4.12. Фармакокинетика подкожного введения метилатропина новорожденным (двухкамерная модель со всасыванием) [24].

параметры «быстрой» экспоненты, характеризующей элиминацию, а также параметры экспоненты, описывающей поступление лекарственного вещества. При этом для определения параметров каждой экспоненты используют не менее 4–5 точек. Типичный вид зависимости концентрации лекарственного вещества от времени для двухкамерной модели с всасыванием приведен на рис. 4.12.

Нелинейные фармакокинетические модели

В тех случаях, когда экспериментальные данные не описываются линейной многокамерной моделью, обычно используют *нелинейные фармакокинетические модели*. Типичная фармакокинетическая кривая для нелинейной модели представлена на рис. 4.13а (см. данные табл. 4.4).

Детально методы анализа нелинейных фармакокинетических моделей рассмотрены в [1, 3, 5]. Не останавливаясь подробно на них, упомянем наиболее типичный способ перехода к нелинейным моделям. Данный метод основан на предположении, что элиминация лекарственного вещества осуществляется ферментом. Тогда скорость элиминации будет определяться уравнением Михаэлиса–Ментен:

$$V_{el} = k_{el} \frac{E_0 C}{Km + C}, \quad (4.14)$$

где E_0 — концентрация фермента, осуществляющего элиминацию лекарственного вещества, концентрация которого равна C ; Km — константа Михаэлиса для этого фермента.

Тогда в случае простейшей однокамерной модели уравнение (4.1) можно представить так

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} &= -k_{el} \frac{E_0 C}{Km + C}; \\ \frac{Km + C}{E_0 C} dC &= -k_{el} dt; \\ \frac{Km}{E_0} \ln C + \frac{1}{E_0} C &= -k_{el} t + \frac{Km}{E_0} \ln C_0 + \frac{C_0}{E_0}. \end{aligned}$$

Таблица 4.4

Фармакокинетика алкоголя после его внутривенного введения

Время, ч	Концентрация, мкг/мл
0,1	4,1
0,2	3,9
0,4	3,8
0,6	3,6
0,8	3,0
0,9	2,6
1,0	1,9
1,2	1,3
1,3	1,1

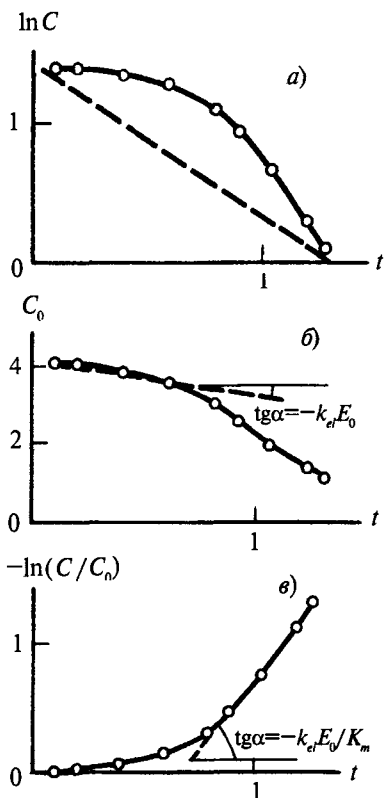


Рис. 4.13. Фармакокинетика алкоголя после внутривенного введения (нелинейная фармакокинетическая модель) [1].

Данная модель имеет два принципиально разных режима функционирования:

1. $C \gg Km$ — избыток концентрации субстрата по отношению к константе Михаэлиса.

2. $C \ll Km$ — избыток ферментативных систем превращения по отношению к константе Михаэлиса.

В первом режиме имеем

$$\begin{aligned}\frac{dC}{dt} &= -k_{el}E_0; \\ dC &= -k_{el}E_0 dt; \\ C &= C_0 - k_{el}E_0 t.\end{aligned}$$

Таким образом, в режиме $C \gg Km$ начальный участок зависимости (C, t) линеен, при этом тангенс угла наклона равен $-k_{el}E_0$. Из рис. 4.13б определяем $k_{el}E_0 = 1,0$ мкг/(мл·ч).

Во втором режиме закон действующих масс записывается так:

$$\begin{aligned}\frac{dC}{dt} &= -k_{el} \frac{E_0 C}{Km}; \\ \frac{dC}{C} &= -\frac{k_{el} E_0}{Km} dt; \\ \ln \frac{C}{C_0} &= -\frac{k_{el} E_0}{Km} t.\end{aligned}$$

Таким образом, в условиях $C \gg Km$ при больших временах наблюдения за системой график зависимости $(\ln C/C_0, t)$ линеен, при этом тангенс угла наклона равен $-\frac{k_{el} E_0}{Km}$ (рис. 4.13в). Из тангенса угла наклона находим $Km = 2,0$ мкг/мл.

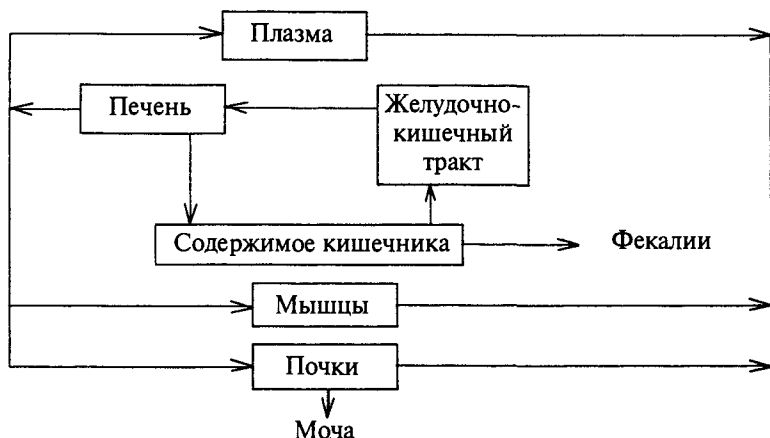


Рис. 4.14. Схема линейной перфузионной модели.

Перфузионные фармакокинетические модели

Рассмотренные выше так называемые классические фармакокинетические модели отличались между собой степенью сложности, но имели одну общую черту, а именно выбор фармакокинетической модели определялся апостериорно, после анализа изменения концентрации лекарственного вещества в ткани. При этом камеры и константы скоростей могли не иметь определенного анатомо-физиологического содержания.

Иные предположения закладываются при построении так называемых *перфузионных моделей*. При их построении учитывается скорость и объем кровотока в каждой из тканей. Данный подход позволяет оценить распределение лекарственного препарата в органах и тканях до его введения в организм. Если экспериментальные данные фармакокинетики не соответствуют модельным, то возможно уточнение модели за счет введения дополнительных камер.

Как правило, перфузионные модели относятся к нелинейным фармакокинетическим моделям. Лишь изредка такие модели могут быть линейны. На рис. 4.14 приведена схема линейной перфузионной модели [20].

Перфузионные модели содержат обычно большое число уравнений. Поэтому чаще всего они решаются численно с использованием ЭВМ. При перфузионном моделировании удается обычно достичь более адекватного описания фармакокинетики лекарственного препарата, чем с использованием классических камерных моделей. Однако при перфузионном моделировании не-

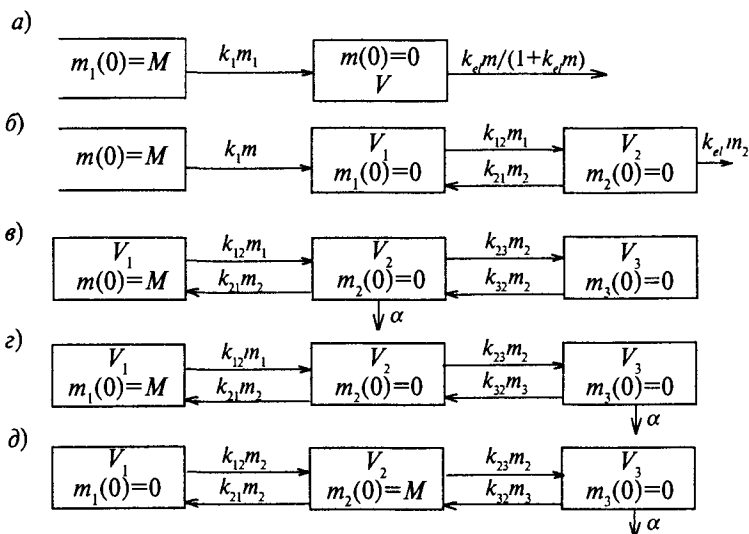


Рис. 4.15. Схемы различных фармакокинетических моделей (к контрольному вопросу 6 § 4.1).

обходимо использовать целый ряд физиологических характеристик лекарственного препарата, которые обычно являются неизвестными. Поэтому использование перфузионных моделей в настоящее время ограничено.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные факты из истории фармакокинетики.
2. Дайте определение основных понятий фармакокинетики.
3. Выведите уравнения, описывающие изменения концентрации лекарственных веществ для одно- и двухкамерных моделей. Как определять параметры этих моделей?
4. Дайте определение нелинейных фармакокинетических моделей.
5. Определите перфузионные модели. В чем их достоинства и недостатки?
6. Выведите фармакокинетические уравнения для моделей, представленных на рис. 4.15.

4.2. Фармакокинетическая оптимизация лечения

После оптимизации лечения больные стали выздоравливать как мухи.

По Н.В. Гоголю

Основные задачи фармакокинетической оптимизации лечения

Оптимизация лечения проводится в следующих основных целях [17]:

1. Выбор наиболее эффективного лечения
2. Минимизация или исключение побочных эффектов фармакотерапии
3. Минимизация количества вводимого лекарственного препарата.

Следует заметить, что минимизация количества вводимого лекарственного препарата позволяет уменьшить побочные эффекты от применяемой фармакотерапии, а также снизить стоимость лечения.

Фармакокинетическая оптимизация лечения может использовать следующие параметры [9]:

1. *Концентрацию лекарственного вещества в камере в любой момент времени.* Такого рода фармакокинетическую оптимизацию проводят, например, для мышечных релаксантов, наркотических средств.

2. *Максимальную концентрацию лекарственного вещества, достигаемую в камере после введения,* используемую, например, при назначении актиномицина, блеомицина.

3. *Скорость достижения максимальной концентрации лекарственного вещества в камере.* Применяется, например, для бензодиазепинов.

4. *Время, в течение которого концентрация лекарственного вещества в камере превышает определенное значение.* Так фармакокинетически оптимизируют назначение многих антибиотиков и цитостатиков.

5. *Площадь под кинетической кривой,* используется для алкилирующих агентов (винкристин).

Рассмотрим наиболее простую задачу оптимизации лечения — поддержание в условной камере больного концентрации лекарственного препарата в пределах терапевтического диапазона в течение всего цикла лечения. При этом основным ограничивающим условием является требование, согласно которому концентрация лекарственного вещества в крови ни

при каких условиях не должна превышать минимальную токсическую концентрацию.

Следует отметить, что осуществление задачи фармакокинетической оптимизации возможно только для тех препаратов, для которых уже известны границы терапевтического диапазона.

В настоящее время терапевтический диапазон определяется в основном в экспериментах на животных. Однако ранее терапевтический диапазон определялся непосредственно на больных. Так, общеизвестен тот факт, что в начале XX в. земские врачи для лечения ревматизма прописывали аспирин. Дозу препарата увеличивали до тех пор, пока у больных не появлялись нарушения слуха. После этого суточная дозировка снижалась на полтаблетки и сохранялась на этом уровне длительное время. Тем самым земские врачи для каждого больного определяли свою минимальную токсическую дозировку аспирина, а снизив ее, назначали препарат в максимально возможной терапевтической дозе.

Как показали дальнейшие исследования, минимальная терапевтическая и минимальная токсическая дозы подвержены меньшим индивидуальным вариациям, чем фармакокинетические параметры: объем камеры, скорость поступления препарата, скорость перераспределения препарата между камерами и скорость элиминации. Поэтому фармакокинетическую оптимизацию лечения проводят, используя стандартные (справочные) величины для терапевтических и токсических концентраций лекарственных средств и определяя экспериментально индивидуальные фармакокинетические параметры.

Наиболее целесообразно проведение фармакокинетической оптимизации лечения в следующих случаях:

1. Применение лекарственных препаратов у больных в тяжелом состоянии, когда терапевтический эффект может быть достигнут только за счет применения максимальных дозировок препаратов. Это в значительной мере сужает терапевтический диапазон и увеличивает вероятность проявления побочного действия лекарственных препаратов. К таким препаратам в первую очередь относятся цитостатики и антибиотики [12, 22, 23].

2. Купирование острых состояний. При этом вначале препараты вводятся в ударных дозах, а затем длительно — в поддерживающих дозах. К таким препаратам относятся сердечные гликозиды, бронхолитики, гормоны, противосудорожные препараты [11, 16].

3. Использование препаратов с выраженным фармакологическим эффектом (средства для наркоза) [17].

4. Длительное использование лекарственных препаратов, особенно у больных с тяжелыми органическими заболеваниями. К таким препаратам относятся противосудорожные средства, стимуляторы, диуретики [7, 8, 13, 15].

Определение индивидуальных фармакокинетических параметров

Определение индивидуальных фармакокинетических параметров проводят при первом приеме лекарственного препарата.

Если лекарственный препарат применяется длительно, то для определения индивидуальных фармакокинетических параметров препарат отменяется на несколько дней. Длительность отмены препарата определяется средним временем его полувыведения (справочная величина); если бы индивидуальное время полувыведения соответствовало среднему, то за время отмены должно было быть выведено количество препарата, вдвое превышающее его последнюю дозу. Также возможно экспериментальное определение времени отмены; препарат отменяется до тех пор, пока он не перестает обнаруживаться в исследуемой ткани.

При первом (псевдопервом — после отмены) введении препарата могут решаться следующие вопросы:

1. Выбор фармакокинетической модели.
2. Определение индивидуальных фармакокинетических параметров.

Следует заметить, что выбор фармакокинетической модели требует большего числа экспериментальных данных, чем задача определения индивидуальных фармакокинетических параметров по заданной фармакокинетической модели.

Выбор фармакокинетической модели и определение ее параметров осуществляется в соответствии с методами, рассмотренными в § 4.1. Если лекарственное вещество поступает в камеру постепенно, то на фармакокинетической кривой наблюдается возрастающий участок. Число камер в фармакокинетической модели определяется числом экспонент в убывающей части фармакокинетической кривой. При этом для определения параметров каждой экспоненты должно быть использовано не менее 4–5 экспериментальных точек.

Основными определяемыми фармакокинетическими параметрами являются:

1. Кажущийся объем камеры.
2. Время полупоступления и полувыведения лекарственного препарата, которые для линейных фармакокинетических моделей связаны с показателем экспоненты уравнениями, аналогичными (4.5).

Иногда для практических целей бывает достаточным не определять тип фармакокинетической модели, а подобрать параметры нескольких экспонент для адекватного описания экспериментальных данных. Подобные фармакокинетические модели принято называть *эмпирическими*.

Показано, что для многих лекарственных препаратов достаточно однократного определения основных фармакокинетических параметров, которые могут быть в дальнейшем успешно использованы для длительной фармакокинетической коррекции лечения. Это связано с тем, что в течение длительного времени (не менее 1 года) эти параметры практически не изменяются [18].

Фармакокинетическая оптимизация лечения

Рассмотрим некоторые практические вопросы фармакокинетической оптимизации лечения.

На рис. 4.16 представлены фармакокинетические зависимости концентрации лекарственного вещества от введенной дозы для однокамерной модели с всасыванием. Видно, что при увеличении дозы введенного лекарственного вещества возрастает его концентрация в камере. При этом важным свойством линейных фармакокинетических моделей является линейная связь между дозой лекарственного вещества и его максимальной концентрацией в камере. Следовательно, увеличивая или уменьшая дозу введенного лекарственного препарата, можно увеличить или уменьшить его концентрацию в камере. Подобным образом подбирают первую дозу вводимого препарата.

Второе введение препарата назначается так, чтобы концентрация препарата в камере никогда не была меньше минимальной



Рис. 4.16. Зависимость концентрации лекарственного вещества в камере от введенной дозы (однокамерная модель с всасыванием).

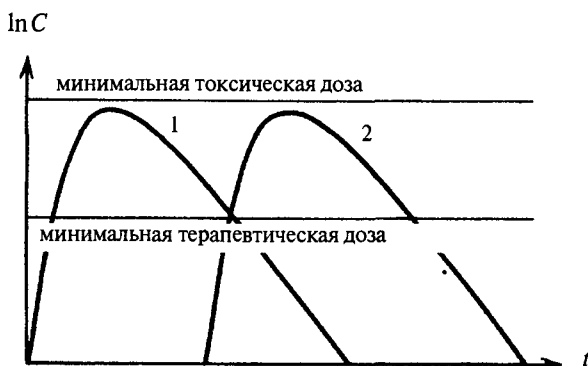


Рис. 4.17. Схема назначения повторного введения лекарственного препарата (однокамерная модель с всасыванием).

1, 2 — номер введения.

терапевтической (рис. 4.17). При этом легче всего подобрать режимы введения фармакологического препарата численно.

Следует заметить, что увеличение числа введений препарата позволяет более плавно изменять его концентрацию в камере (рис. 4.18). Как правило, более плавное изменение концентрации лекарственного вещества в камере позволяет уменьшить вероятность возникновения осложнений и приводит к более быстрому получению терапевтического эффекта.



Рис. 4.18. Изменение концентрации лекарственного вещества в камере при различных режимах введения (однокамерная модель с всасыванием).

1 — двукратное введение; 2 — четырехкратное введение

Заметим, что стремление поддержать концентрацию лекарственного вещества на постоянном уровне в пределах терапевтического диапазона основано на результатах опытов *in vitro*. В клеточной культуре антибиотика тормозят рост микроорганизмов и не препятствуют росту культуры в узком диапазоне концентраций. Уменьшение концентрации ниже определенного уровня приводит к росту микроорганизмов, увеличение концентрации — к гибели клеток. При этом в узком диапазоне доз увеличение концентрации антибиотиков приводит к более эффективному торможению роста микроорганизмов.

Аналогичные результаты наблюдаются для многих, но не для всех препаратов. В частности, биодоступность фуросемида при пероральном применении составляет порядка 40% (остальное или не всасывается, или разрушается в желудочно-кишечном тракте). Однако эффективность перорального применения фуросемида много больше внутривенного применения этого препарата в той же дозе, при этом биодоступность внутривенного введения составляет 100%.

Поддержание на постоянном уровне концентрации лекарственных веществ, действие которых связано с рецепторным механизмом, может привести к развитию нежелательных эффектов. Это может быть вызвано изменением рецепторного аппарата (десинтетизацией рецепторов, их интернализацией, разобщением рецепторов с внутриклеточными мессенджерами и т.д.).

Таким образом, при использовании фармакокинетической оптимизации лечения необходимо соблюдать осторожность. Во-первых, надо установить, нуждается ли данный препарат в оптимизации и какова цель этой оптимизации (поддержание постоянной концентрации, достижение наиболее большой концентрации и т.д.). Во-вторых, так как концентрация лекарственного вещества измеряется в крови, возникают следующие вопросы. Какова при этом концентрация лекарственного вещества в эффекторной ткани? Какова чувствительность эффекторной ткани к лекарственному веществу?

Именно поэтому в клинике фармакокинетические модели используются для оптимизации лечения ограниченного числа лекарственных средств. Применение фармакокинетических моделей для многих других лекарств не оправдало себя. Однако фармакокинетические модели широко используются для описания нормального и нарушенного обмена биологически активных веществ в организме.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие основные принципы фармакокинетической оптимизации?
2. Как определяются индивидуальные фармакокинетические параметры?
3. Как с помощью фармакокинетических моделей оптимизируется назначение фармакотерапии?

4.3. Краткое содержание главы

Лучше скажи мало, но скажи хорошо.

К. Прутков

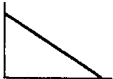
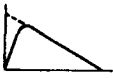
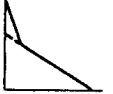
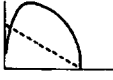
Фармакокинетика занимается изучением закономерностей изменения концентрации лекарственного вещества и его метаболитов в организме человека с течением времени.

С формальной точки зрения, данные процессы описываются при помощи камерных моделей. Критерии дискриминации основных моделей рассматриваются в § 4.1, а также в табл. 4.5. В полупологарифмических координатах ($\ln C$, t) определяют основные фармакокинетические параметры этих моделей (см. рис. 4.3, 4.6, 4.9, 4.12).

Подобранные индивидуальные фармакокинетические параметры используются для оптимизации лечения (см. § 4.2). Оптимизация лечения позволяет уменьшить вероятность развития осложнений от фармакотерапии, повысить ее эффективность, а также снизить стоимость курсового применения лекарственного препарата.

Таблица 4.5

Аналитический вид основных фармакокинетических моделей

№ п/п	Модель	График в координатах $[\ln C, t]$
1	Однокамерная	
2	Однокамерная с всасыванием	
3	Двухкамерная	
4	Двухкамерная с всасыванием	
5	Нелинейная	

Список основной литературы

1. *Лакин К.М., Крылов Ю.Ф.* Биотрансформация лекарственных веществ. М., 1981.
2. *Сергеев П.В., Галенко-Ярошевский П.А., Шимановский Н.Л.* Очерки биохимической фармакологии. М., 1996.
3. *Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А.* Фармакокинетика. М., 1981.
4. *Харкевич Д.А.* Фармакология. М., 1993.
5. *Pharmacokinetics: regulatory, industrial, academic perspectives* (ed. P.G. Welling). N.Y., 1988.

Дополнительная литература

6. *Алтухова Л.Б., Харитоновна С.И., Уласевич А.С.* и др. Хим. фарм. журн., 1984. № 8. С. 1010—1013.
7. *Буклина С.Б.* Дис. канд. мед. наук, 1987.
8. *Горбарец М.А.* Атлас фармакодинамики, фармакокинетики и токсикологии лекарственных веществ. Киев, 1979.
9. *Горьков В.А.* Дис. д-ра биол. наук, 1987.
10. *Давыдов В.Ф.* Основные параметры количественной фармакокинетики. Горький, 1987.
11. *Жаркова Л.П., Страчунский Л.С., Судиловский С.Д.* Клин. фармакол. и терап., 1993. № 1. С. 39.
12. *Кобиков С.Х.* Здравоохранение Казахстана. 1989. № 11. С. 34—36.
13. *Лачнекиани А.И., Окуджава И.В., Рухадзе М.Д.* Журн. невропатол. и психиатр., 1993. № 1. С. 32—33.
14. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. М., 1997.
15. *Машковский М.Д., Рощина Л.Ф., Полежаева А.М.* Новые препараты. М., 1982. С. 110—120.
16. *Неймарк М.И., Райкин И.Д., Меркулов Л.В.* и др. Заболевания поджелудочной железы. Новосибирск, 1992. С. 41—42.
17. *Смирнов И.Е., Шакирина Л.Д.* Основные направления оптимизации фармакотерапии у детей. Деп. в ВИНТИ.
18. *Страчунский Л.С.* Дис. д-ра. мед. наук, 1993.
19. *Фирсов А.А.* Лабораторное дело, 1976. № 9. С. 538.
20. *Bischoff K.B., Dedrick R.L., Zanarko D.S., Longstreth J.A.* J. Phar. Sci., 1971. N. 8. P. 1128.
21. *Breckenridge A.M.* (ed.) Pharmacokinetics. Theory and methodology. Oxford, N.Y., 22. Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, 1985.
22. *Pruitt A.W., Dayton P.G., Patterson I.H.* Clin. Pharm. And Ther., 1973. N. 1. P. 73.
23. *Ritschel W.A.* Handbook of basic pharmacokinetics. Hamilton, Illinois, 1980.
24. *Stephens R.L., Williamson S.K., Jackson W.L.* Am. J. Med., 1986. V. 81. N. 4. P. 718—720.
25. *Thyss A., Milano G., Deville A.* Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1987, V. 23. P. 843—847.
26. *Windladh B.* Acta Pharmacol. et Toxicol., 1973. N. 4. P. 241.

4.4. Фармакокинетика морфина и нейропептидов энкефалинового ряда в организме животных и человека*

Мы должны благодарить Бога, что Он создал мир так, что все простое — правда, а все сложное — неправда..

Г. Сенека

Ответ организма на действие опиатов и опиоидных пептидов определяется концентрацией комплексов этих соединений с рецепторами. Концентрация лиганд-рецепторных комплексов, в свою очередь, зависит как от концентрации рецепторов и сродства лигандов к ним, так и от концентрации лиганда вблизи рецепторов [2]. Следовательно, это ставит задачу изучения распределения концентраций данных соединений в различных тканях организма, их изменения во времени, т.е. проведения фармакокинетических исследований.

Вопросы изучения распределения и выведения опиатов, в частности морфина, из организма животных уже давно находятся в центре внимания различных исследователей [3, 5–7]. Установлен факт метаболизма морфина в печени, выведение опиата почками. Показано, что только 2% опиата проникает через гематоэнцефалический барьер. При изучении фармакокинетики морфина, как и многих других физиологически активных веществ, основное внимание исследователей было обращено прежде всего на анализ изменения концентрации опиата в крови в зависимости от времени, прошедшего после введения препарата [3]. Это обусловлено как исключительной важностью системы крови как ткани, омывающей все остальные органы и ткани организма и транспортирующей вещества и метаболиты к ним, так и удобством крови как тест-ткани, что, в свою очередь, связано с относительной легкостью отбора проб крови для анализа в процессе исследования без нарушения целостности организма и его функционирования.

Фармакокинетика морфина в плазме крови собак

При изучении фармакокинетики опиатных лигандов ключевую роль играет выбор метода анализа концентраций данных соединений. Основные требования, предъявляемые к методу, —

* § 4.4, 4.5 посвящены специальным вопросам. Поэтому они могут быть опущены при первом чтении.

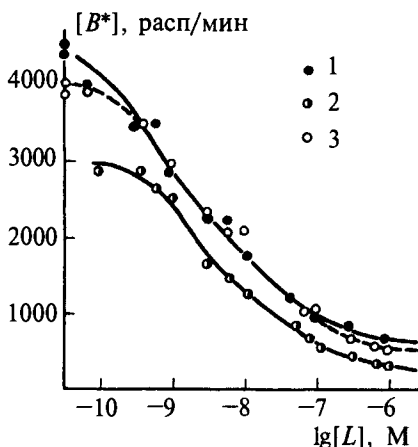
высокая чувствительность и специфичность. К сожалению, обычно применяемый при фармакокинетических исследованиях радиоиммунологический метод анализа не специфичен к «физиологически активному» морфину, поскольку измеряет также концентрации некоторых метаболитов, в частности морфин-3-глюкуронида, не взаимодействующих с рецепторами [8]. В то же время получение сывороток, не чувствительных к основному метаболиту морфина — морфин-3-глюкурониду, представляется достаточно сложной задачей.

Для изучения фармакокинетики опиатных лигандов авторами [2,4] предложен радиорецепторный метод анализа на основе препаратов лиофилизированных мембран. Преимущество этого метода заключается в том, что с помощью него измеряются только те формы лиганда, которые обладают «рецепторной активностью». К морфин-3-глюкурониду данный метод, например, не чувствителен. При этом если в системе находится несколько опиатных лигандов, то метод дает их эффективную суммарную концентрацию, выражаемую в эквивалентах (единицах) концентрации соединения, по которому производится калибровка (см. § 3.6) [2].

При постановке конкретных методик в полной мере были использованы результаты проведенного в гл. 3 теоретического рассмотрения радиорецепторного метода. В процессе постановки радиорецепторного метода были получены калибровочные кривые с использованием сыворотки крови и плазмы (рис. 4.19). Сравнение полученных кривых с калибровочной кривой в буфере показывает, что и плазма, и сыворотка обладают ингибирующим эффектом на связывание опиатов, однако у плазмы он выражен слабее. В этой связи для дальнейшего анализа использована плазма крови.

Рис. 4.19. Калибровочные кривые для определения концентрации морфина в буфере (1), сыворотке (2), плазме крови (3).

[B*] — количество связанного меченого лиганда.



рольным животным вводили физиологический раствор и производили отбор проб через те же самые временные интервалы, что и при снятии фармакокинетических кривых. Проведенное исследование не позволило установить какие-либо изменения опиатной активности. Чтобы исключить влияние на определение экзогенно добавленных соединений постоянного уровня эндогенных опиатных лигандов, построение калибровочных кривых производили по плазме крови, взятой у животного непосредственно перед введением опиатного лиганда.

При исследовании фармакокинетики морфина опиатную активность определяли с использованием калибровочной кривой вытеснения низких концентраций ^3H -налоксона морфином. Параллельно пробы проверялись на изменение концентраций эндогенных опиоидных пептидов, определяемых по вытеснению 0,3–0,4 нМ ^3H -[D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина (связывание таких низких концентраций [D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина характеризует комплексообразование лиганда, в первую очередь с δ -рецепторами, к которым большинство эндогенных пептидов имеют высокое сродство).

Введение морфина не приводило к существенному изменению активности проб крови по отношению к процессу связывания ^3H -[D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина с рецепторами. Этот факт указывает на малую вероятность выброса значимых концентраций эндогенных опиоидных пептидов при введении морфина, либо, если выброс и происходит, то речь идет об эндогенных лигандах, не обладающих сродством к δ -рецепторам.

Результаты экспериментального изучения фармакокинетики

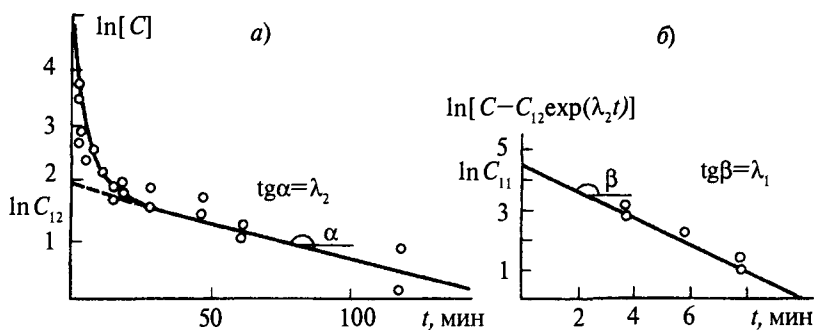


Рис. 4.20. Кинетические кривые изменения опиатной активности в плазме крови собаки при внутривенном введении морфина 100 мкг/кг: а) определение C_{12} , б) определение C_{11} .

Таблица 4.6

**Фармакокинетические параметры выведения морфина
из организма собаки при внутривенном введении**

Доза, мкг/кг	Масса собаки, кг	$(-\lambda_1)^{-1}$, мин	C_{11} , нМ	$(-\lambda_2)^{-1}$, мин	C_{12} , нМ
100	12	2,28	120	68	8,7
100	13	4,9	5,1	25	2,2
50	10	3,5	30,6	303	0,7
50	13	3,9	62	63	1,6

морфина у собак, представленные на рис. 4.20, позволяют сделать следующие выводы:

1. Вид кинетической зависимости (непрерывное с первых минут падение активности по отношению к вытеснению ^3H -налоксона, отсутствие максимумов на кривой), как и вышеописанные результаты по вытеснению ^3H -[D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина, говорят в пользу отсутствия выброса в кровь ощутимых концентраций эндогенных опиоидных пептидов. Это дает основание с большой степенью уверенности утверждать, что наблюдаемая кривая отражает фармакокинетику именно морфина в организме собаки.

2. Представленная на рис. 4.20 фармакокинетическая кривая морфина хорошо описывается двумя экспоненциальными членами (двухкамерная фармакокинетическая модель):

$$[C] = C_{11} \exp[\lambda_1 t] + C_{12} \exp[\lambda_2 t]. \quad (4.15)$$

Анализ экспериментальных данных в соответствии с уравнением (4.15) позволяет определить параметры λ_1 , λ_2 , C_{11} , C_{12} , которые приведены в табл. 4.6.

**Фармакокинетика Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg
в плазме крови собаки и человека**

С целью изучения фармакокинетики опиоидных пептидов был выбран даларгин гексапептид на основе Leu-энкефалина-Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg. Это соединение было синтезировано в лаборатории профессора М.И. Титова и успешно прошло клинические испытания в качестве противоязвенного препарата. Было исследовано изменение опиатной активности препарата в плазме крови после внутривенного введения даларгина собакам и людям. В работе

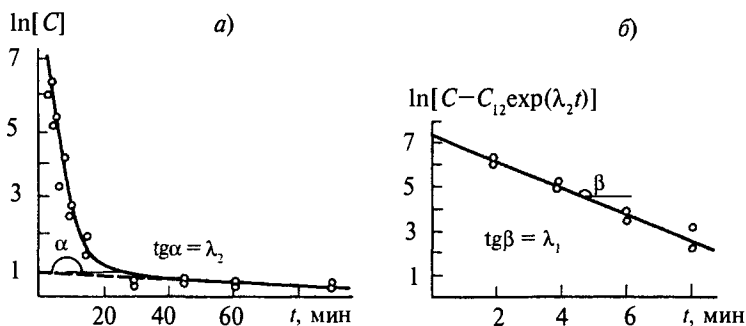


Рис. 4.21. Кинетическая кривая изменения опиатной активности в плазме собаки при внутривенном введении даларгина в дозе 50 мкг/кг (а) и определение кинетических параметров (б)

использовали радиорецепторный метод на основе препарата лиофилизированных мембран. Опиатная активность определялась по предварительно снятым калибровочным кривым даларгина, полученным при добавлении пептида к плазме крови, взятой у испытуемых непосредственно перед введением даларгина, и выражалась в эквивалентах этого соединения.

Типичная экспериментальная кривая, наблюдаемая при изучении фармакокинетики даларгина у собак, приведена на рис. 4.21. Анализ полученной кривой, как и остальных данных, показывает, что изменение опиатной активности даларгина описывается суммой двух экспоненциальных членов, что позволяет с использованием выражения (4.15) определить их параметры (табл. 4.7).

В связи с тем что даларгин предназначался для лечения людей, данные, полученные на собаках, сопоставлялись с результатами, полученными при однократном введении 1 мг двум здоровым добровольцам. Анализ изменения опиатной активности у людей проводили по той же схеме, что и в эксперименте с собаками. Введение испытуемым даларгина сопровождалось кратковременным ощущением жара в области лица, тяжести в затылке, чувством комка в горле. Указанные ощущения не носили явно выраженного характера и полностью исчезали через 1–2 мин после введения препарата. Фармакокинетические кривые даларгина у людей, полученные с использованием радиорецепторного метода, как и в эксперименте на собаках, хорошо описываются двумя экспоненциальными членами (рис. 4.22). Соответствующие кривым фармакокинетические параметры представлены в табл. 4.8.

Проведенное сравнительное изучение фармакокинетики даларгина у людей и собак позволяет сделать следующие выводы: характеристическое время и параметры у человека и собаки удов-

летворительно совпадают (табл. 4.7, 4.8). Основное изменение радиорецепторной активности ($> 85\%$) в обоих случаях протекает быстро, с характеристическим временем порядка 1–6 мин. Менее 15% общей исходной радиорецепторной активности «выводится» относительно медленно, в течение 1–2 ч. Полученные данные говорят о том, что либо вводимое вещество действует на организм при высоких концентрациях, но очень быстро, включая какие-то триггерные механизмы ответа, либо основное воздействие даларгина обусловлено его продолжительным (до нескольких часов) действием при низких концентрациях, либо, наконец, основное влияние на организм связано с метаболитами этого вещества.

Кинетические кривые (рис. 4.21, 4.22) отражают изменение радиорецепторной активности. Опиатной активностью, помимо самого гексапептида даларгина, обладают также пентапептид $\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu}$ и тетрапептид Tyr-D-Ala-Gly-Phe , образующиеся при отщеплении C-концевых Arg и Leu-Arg (другие воз-

Таблица 4.7

Параметры двухэкспоненциальной кривой, описывающей изменения опиатной активности в плазме крови собак от времени при внутривенном введении даларгина

Доза, мкг/кг	Количество экспериментов	$(-\lambda_1)^{-1}$, мин	C_{11} , нМ	$(-\lambda_2)^{-1}$, мин	C_{12} , нМ
20	2	2,6	500	—	—
50	3	$1,54 \pm 0,36$	960 ± 810	104 ± 50	$0,92 \pm 0,37$
60	1	5,9	6300	80	234
80	1	3,0	1585	54	5,0
100	3	$5,0 \pm 1,1$	2605 ± 1895	85 ± 5	$19,6 \pm 10,5$

Примечание: при дозе 10 мкг/кг изменений опиатной активности не наблюдалось.

Таблица 4.8

Кинетические параметры изменения опиатной активности в плазме крови человека при внутривенном введении даларгина

Доза, мкг/кг	Количество испытуемых	$(-\lambda_1)^{-1}$, мин	C_{11} , нМ	$(-\lambda_2)^{-1}$, мин	C_{12} , нМ
1	2	4,1	235	88	40

IC_{50} вытеснения опиатных лигандов даларгином и его N-концевыми фрагментами, нМ

Исследуемый пептид	Морфин	[D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалин	Налоксон -Na ⁺	Налоксон +Na ⁺
Tyr-D-Ala-Gly-Phe	98	18	56	100
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	56	32	45	100
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg	15	28	24	65

можные продукты гидролиза даларгина опиатной активностью не обладают, так как для связывания с рецепторами необходимо одновременное наличие N-концевого Tyr и в четвертом положении Phe. Проведенное исследование с целью выявления возможности раздельного специфического вклада даларгина и его отдельных метаболитов с использованием лигандов, специфичных к тем или иным рецепторам (табл. 4.9), показало, что указанные три пептида не обладают выраженной специфичностью к какому-либо одному типу рецепторов и по опиатной активности сравнительно мало отличаются друг от друга. Последнее не позволяет в рамках разработанного метода прямого определения опиатной активности в плазме крови животных проводить раздельное измерение концентрации даларгина, а также пента- и тетрапептида.

С целью выяснения, в какой степени фармакокинетические кривые отражают изменение концентрации даларгина или же его метаболитов, параллельно с изучением фармакокинетики да-

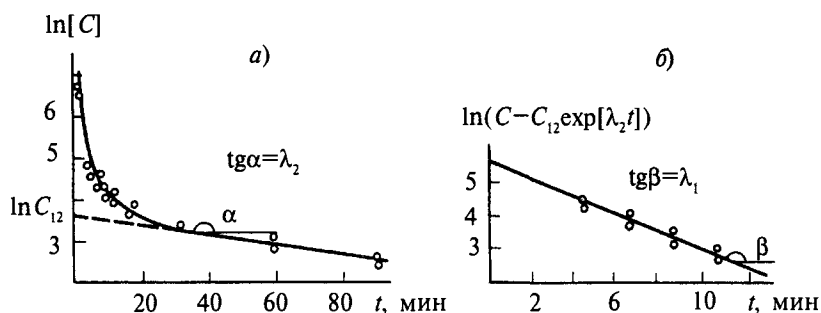


Рис. 4.22. Кинетические кривые изменения опиатной активности в плазме крови человека при внутривенном введении 1 мг даларгина: а) определение C_{12} , б) определение C_{11} .

ларгина у людей радиорецепторным методом было проведено измерение концентрации вводимого вещества радиоиммунологическим методом с использованием сывороток, специфичных только к самому даларгину. Использование радиоиммуноанализа не позволило зафиксировать значимые количества даларгина уже через 2 мин после введения пептида в дозах 1 и 5 мг. После инъекции 10 мг препарата на 2 мин концентрация даларгина составила 50 нг/мл, на 4 мин — 2 нг/мл, на 6 мин и в последующие промежутки времени даларгин в крови не определялся.

Следовательно, после внутривенного введения даларгина его уровень в крови снижается к 2–6 мин до концентраций ниже 0,5 нг/мл, что составляет предел чувствительности радиоиммунологического метода анализа данного соединения. Интересно, что с полученными результатами хорошо коррелирует исчезновение субъективных ощущений у испытуемых лиц в течение такого же короткого промежутка времени. В связи с тем, что чувствительность используемых в настоящей работе радиоиммунологического и радиорецепторного методов анализа совпадает, полученные данные говорят о том, что наблюдаемые фармакокинетические кривые отражают изменение концентраций не самого даларгина, а его метаболитов. Эти результаты подтверждаются полученными в последнее время данными по изучению кинетики гидролиза даларгина в крови в условиях *in vitro*.

Таким образом, исследование кинетики изменения концентрации опиатных лигандов в организме дало возможность определить конкретные фармакокинетические параметры опиатных лигандов морфина и даларгина. Это, в свою очередь, имеет важнейшее значение для понимания закономерностей изменения во времени концентраций связанного с рецепторами и свободной формы лиганда и, следовательно, для оценки фармакологического действия указанных соединений.

Литература

1. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В., Мевх А.Т. ВИНИТИ. Сер. Биорг. Хим., 1985.
2. Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д. Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. М., 1993.
3. Сергеев П.В., Сейфула Р.Д., Осняк В.С. Фармакол. и токсик., 1974. С. 279.
4. Сергеева М.Г. и др. Бюлл. ВКНЦ АМН СССР, 1986. С. 81.
5. Catlin D.H. J.Pharmacol. Exp. Ther., 1977. P.220.
6. Fink A.D. e.a. Anaesthesiology, 1977. P.407.
7. Hug C.C. Pharmacokinetics of anaesthesia. Oxford, 1984.
8. Spector S.J.Pharmacol. Exp. Ther., 1971. P. 253.

4.5. Кинетический анализ анальгетического эффекта опиатов

Явление анальгезии было открыто не случайно: мы шли к нему более двадцати лет. И не наша вина, что первые данные опубликовала другая группа исследователей.

Шарль О Тан

Проведенные в работе [1] исследования системы опиоидных рецепторов *in vitro*, изучение фармакокинетики опиатов и опиоидных пептидов позволили вплотную подойти к анализу механизма действия указанных соединений на организм животных. Поскольку одним из важнейших физиологических эффектов опиатов является увеличение ими порога болевой чувствительности, было исследовано влияние морфина именно на эту физиологическую реакцию организма. При этом основное внимание уделено роли того или иного типа опиоидных рецепторов при формировании физиологической реакции, а также регуляторного влияния ионов на анальгетический эффект, вызываемый морфином.

Закономерности формирования анальгетического эффекта при введении опиатов

К настоящему времени известно значительное количество работ, в которых изучалась зависимость биологического эффекта физиологически активных веществ от дозы вводимого соединения (см гл. 3). Большинство этих работ предполагает, что биологический ответ определяется степенью заселенности рецепторов данным физиологически активным веществом:

$$A = \alpha \frac{[LR]}{[R_0]}, \quad (4.16)$$

где $\alpha = \text{const}$, или гиперболическая функция от $[LR]$, которая сводится, как правило, к получению эмпирических выражений гиперболического вида:

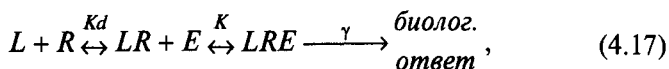
$$A = \frac{A_{\max}[C]}{K_{0,5} + [C]}, \quad (4.16')$$

где A — измеряемый биологический ответ с максимальным значением $A_{\max}$, $[C]$ — концентрация вещества, $K_{0,5}$ — константа, характеризующая величину концентрации вещества, отвечающую полумаксимальному эффекту.

Следует отметить, что во многих, если не в большинстве, случаев наблюдаемая константа K значительно меньше значений констант диссоциации лиганд-рецепторных комплексов и максимальный биологический ответ проявляется в условиях, когда занята лишь небольшая доля имеющихся рецепторов (так как остальные рецепторы находятся как бы в «избытке»). Существование «избыточных» рецепторов показано и для опиоидных рецепторов [2,4].

С учетом сказанного изученные физико-химические закономерности взаимодействия опиатных лигандов с рецепторами, а также их выведения из организма позволяют перейти к непосредственному рассмотрению кинетики формирования анальгетического эффекта опиатов (рис. 4.23).

Предположим, что анальгетическая реакция на действие опиатных агонистов с концентрацией $[L]$ в микроокружении рецептора развивается в соответствии со схемой



которая предполагает, что биологический ответ на действие соединений прямо пропорционален (с коэффициентом пропорциональности γ) концентрации комплекса лиганд-рецептор-эффектор (LRE), где E — эффектор, через который формируется анальгетический ответ, и гиперболическим образом зависит от $[LR]$:

$$A = \gamma \frac{[E]_0[LR]}{K + [LR]},$$

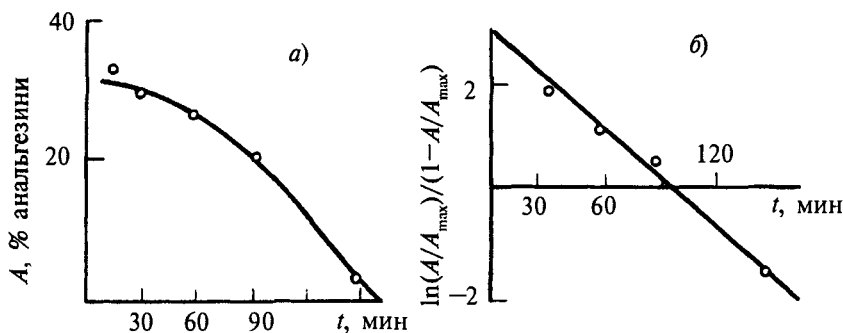


Рис. 4.23. Зависимость анальгетического эффекта морфина в тесте «горячей пластины» от времени (а) и определение кинетических параметров (б).

С учетом факта существования у опиоидных рецепторов феномена их «избыточности», можно показать, что

$$A = \gamma \frac{[E]_0}{\frac{K}{[L]} \frac{Kd}{[R_0]} + 1}.$$

При рассмотрении кинетики анальгетического эффекта необходимо учитывать временную зависимость $[L]$. Было показано (§ 4.4), что при мгновенном вводе соединения фармакокинетика морфина у животных описывается биекспоненциальной зависимостью с характерным временем порядка минут и часов. Это позволяет предположить, что через 10 мин после введения морфина его фармакокинетика в организме будет определяться одной «медленной» экспонентой и, таким образом, зависимость фармакологического ответа на действие морфина может быть представлена в виде

$$A = \frac{A_{\max} \exp[\lambda_2 t]}{\beta + \exp[\lambda_2 t]};$$

$$A_{\max} = \gamma[E]_0; \quad \beta = \frac{K}{[L]} \frac{Kd}{[R_0]}.$$

Преобразуя полученное соотношение, имеем

$$\ln \frac{A / A_{\max}}{1 - A / A_{\max}} = \lambda_2 t + \ln \beta, \quad (4.18)$$

и, следовательно, тангенс угла наклона зависимости $\ln \frac{A / A_{\max}}{1 - A / A_{\max}}$ от t соответствует λ_2 , а отрезок на оси ординат — $\ln (1/\beta)$ (рис. 4.23).

Влияние ионов металлов на анальгетический эффект морфина

Как выше было показано, биологический ответ на введение опиатов определяется, в частности, отношением $[R_0]/Kd$. Можно полагать, что увеличение этого отношения будет приводить к увеличению длительности биологической реакции. Одним из возможных регуляторов отношения $[R_0]/Kd$ могут служить ионы двух- и трехвалентных металлов. Действительно, как установлено в гл. 3, ряд ионов, например ионы Mn^{2+} , Ni^{2+} , Gd^{3+} , La^{3+} и др., оказывали сильное активирующее действие на сродство морфина к опиоидным рецепторам, не влияя на концентрацию этих рецепторов. В связи с этим большой интерес представляли исследования влияния указанных солей на анальгетический эффект, вызываемый морфином.

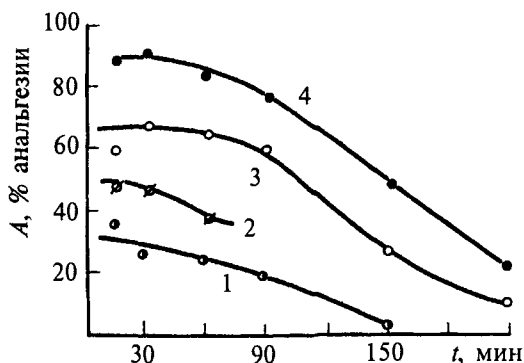


Рис. 4.24. Анальгетический эффект морфина (2 мкг/мышь) в процентах на фоне предварительного введения физиологического раствора (1) или хлорида марганца: 2 — 10 мкг, 3 — 20 мкг, 4 — 30 мкг (интерстициальное введение препаратов). Метод «горячей пластины», $T = 52^{\circ}\text{C}$.

Исследование влияния ионов Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} и др. на морфин, мет-энкефалин и β -эндорфинвызванную анальгезию, проведенное в лаборатории Уэя, показало наличие антагонистического эффекта этих ионов. Введение солей лантана приводило к усилению морфинвызванной анальгезии при относительно низких концентрациях солей и ослаблению эффекта морфина при их высоких концентрациях.

Проведенное изучение влияния ионов металлов на морфинвызванную анальгетическую реакцию у мышей, оцениваемую по тесту «горячей пластины» (рис. 4.24, табл. 4.10), позволило сделать следующие выводы [1]:

1. Исследованные ионы в дозах до 30 мкг не влияют на порог болевой чувствительности.

2. Соли магния, никеля и кадмия усиливают анальгетический эффект морфина. Поскольку максимальный стимулирующий эффект одинаков в случае действия солей магния и никеля, можно думать об идентичности механизмов влияния этих солей. Были рассчитаны значения ED_{50} солей, соответствующие дозе, оказывающие половину максимального эффекта. Из изученных солей металлов наиболее активной оказалась NiCl_2 , ED_{50} которой равна 2,2 мкг/мышь. Полученный результат говорит о том, что наблюдаемый эффект ионов не связан с их ингибирующим действием на транспорт ионов Ca^{2+} через каналы, так как ионы Ni^{2+} являются одними из самых слабых ингибиторов ионов Ca^{2+} и, в частности, существенно уступают по силе ингибирования ионам Mn^{2+} . Стимулирующее действие солей металлов на морфинвызванную анальгезию связано с их влиянием на A_{max} и скорее всего обусловлено увеличением в присутствии указанных ионов коэффициента γ [уравнение 4.18)], характеризующего эффективность формирования биологического ответа.

Введение мышам солей приводит к увеличению длительности

**Влияние солей на анальгетический эффект морфина
при интракостеральном введении препаратов**

Соль металла	Доза, мкг/мышь		$A_{\max}^*$	$(-\lambda_2),$ мин ⁻¹	β
	соли Me	морфина			
Контроль	0	2	1	0,029	0,061
	10	2	1,45	0,028	0,041
	20	2	2,05	0,025	0,017
MnCl ₂	30	2	2,75	0,030	0,018
	40	2	2,85	—	—
	2	2	1,80	0,036	0,023
NiCl ₂	5	2	2,50	—	—
	7,5	2	2,55	—	—
	20	2	3,05	0,030	0,018
GdCl ₃	5	0,50	2,46	—	—
	5	0,75	2,30	—	—
	5	1,0	2,47	—	—
	5	2,0	2,40	0,028	0,020
	10	2,0	3,15	0,027	0,022

* $A_{\max}$ — отношение максимального анальгетического эффекта морфина у опытной (морфин на фоне раствора солей металлов) и контрольной (морфин на фоне физиологического раствора) групп животных.

анальгетического эффекта морфина (см. рис. 4.24). Из экспериментальных результатов, представленных на рис. 4.24, видно, что при введении солей MnCl₂ анальгетическое действие морфина сохранялось до 4 ч и более, в то время как в контрольной группе анальгетический эффект морфина продолжался не более 2–2,5 ч.

Анализ кинетики анальгетического эффекта морфина в зависимости от присутствия солей MnCl₂, NiCl₂, GdCl₃ с использованием выражения (4.18) позволяет определить параметры и при различной концентрации вводимой соли (табл. 4.10). Из приведенных данных видно, что введение солей не влияет на характеристический параметр λ_2 , отражающий кинетику вывода морфина из организма мыши, однако гиперболическим образом оказывает влияние на параметр β (см. рис. 4.24). Показано также отсутствие эффекта солей на концентрацию морфина в мозге [3], свидетельствующее о том, что соли не влияют на фармакокинетические параметры морфина.

Поскольку концентрация рецепторов $[R_0]$ также постоянна при различных концентрациях солей (см. гл. 3), вводимая концентрация морфина одинакова и нет никаких специальных данных о влиянии солей на параметр K , описанное выше изменение

Таблица 4.11

**Эффективность различных солей металлов по усилению
анальгетического действия морфина (2 мкг/мышь)
при интерстициальном введении препаратов**

Вещество	NiCl ₂	GdCl ₃	MnCl ₂
ED ₅₀ , мкг/мышь	2,2	3,8	20,0

параметра β при введении солей металлов можно объяснить именно активирующим их влиянием на сродство морфина к рецепторам (константы K_d).

Проведенное исследование регулирующего влияния ионов металлов на сродство опиатных лигандов к рецепторам в условиях *in vitro* и их действия на анальгетический эффект морфина позволяет выяснить роль тех или иных опиоидных рецепторов в регуляции порога болевой реакции у мышей, оцениваемой по тесту «горячей пластины». Действительно, сравнительный анализ эффективности влияния солей на параметр β и констант активирующего действия соответствующих ионов на связывание лигандов с опиоидными рецепторами показывает, что эффект NiCl₂ существенно выше эффекта MnCl₂ (табл. 4.11) и находится в соответствии с активирующим влиянием ионов Ni⁺⁺ и Mn⁺⁺ на сродство μ -рецепторов, в то время как в случае δ -рецепторов корреляция не наблюдается (для этого типа рецепторов $K_{Mn} < K_{Ni}$) (см. гл. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что влияние морфина на порог болевой реакции у мышей, оцениваемой по тесту «горячей пластинки», опосредуется связыванием этого лиганда с μ -рецепторами морфина. Полученный результат подтверждается данными по введению субтоксических доз LaCl₃, которые показали отсутствие достоверного влияния соли на анальгетический эффект морфина, что полностью согласуется с относительно слабым влиянием ионов La³⁺ по сравнению с другими исследованными ионами на μ -рецепторы в отличие δ -рецепторов.

Литература

1. Зайцев С.В., Ярыгин К.В., Варфоломеев С.Д. Наркомания. Нейропепид-морфиновые рецепторы. М., 1993.
2. Chavkin C., Goldstein A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984. P. 7253.
3. Harris P.A. e.a. J.Pharmacol. Ther., 1975. P. 488.
4. Perry D.C. e.a. Mol.Pharmacol., 1982. P. 272.

Глава 5

КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ

И в самой совершенной иерархии, и самой безупречной организации мы видим вовсе не механизм, составленный из мертвых и в отдельности безраздельных частей, а живое тело, образуемое частями и живущее атомами, каждый из которых, обладая своей индивидуальностью и свободой, участвует в чуде жизни.

Г. Гессе

5.1. Кинетические особенности роста клеточной культуры

Мы часто воспринимаем полутароумных людей как полоумных, потому что нам доступна лишь треть их ума.

Г.Д. Торо

История изучения процессов роста клеточных популяций

Жизнь подобна игрищам: иные приходят на них состязаться, иные — торговать, а самые счастливые — смотреть.

Пифагор

Микроорганизмы были открыты в 1676 г. А. Левенгуком. Он описал некоторые формы микроорганизмов и установил, что они являются подвижными. В 1878 г. Л. Пастер впервые обнаружил рост и развитие микроорганизмов. Оказалось, что они в значительной мере близки к популяциям других организмов.

Изучение динамики роста популяций было начато в 1798 г. Мальтусом, который предположил, что популяции растут в геометрической прогрессии. Исходя из своей теории Мальтус сделал вывод, что при такой динамике роста, рано или поздно перенаселение Земли неизбежно. Поэтому необходимы войны, катаклизмы, революции для избежания процесса перенаселения. Позднее эти идеи в значительной мере послужили основой формирования ряда положений теории борьбы за существование Ч. Дарвина.

В 1825 г. В. Гомертц предположил, что наблюдаемый ограниченный рост популяций связан с «эффектом насыщения». В 1837 г. Кетле дал первую математическую интерпретацию роста и развития популяций.

В 1838 г. П. Ферхгюльст предложил так называемую «логистическую»

модель роста популяций. Эта модель описывала ограниченный рост популяций за счет существования двух процессов, влияющих на численность популяции: процесса рождения и процесса «квадратичной» гибели. Ферхгюльстом впервые рассмотрены процессы гибели в теории развития популяций.

В 1895 г. Вард впервые описал с математической точки зрения динамику роста микробной популяции. Он ввел понятие «время генерации». В том же году М.Мюллер, изучая динамику роста микроорганизмов, ввел понятия «лаг-фаза», «логарифмический рост», «замедляющийся рост».

В 1905 г. Ф. Блэкман дал начало микробиологической кинетике как самостоятельному научному направлению.

В 1914 г. Л.А. Егунов создал первую математическую модель роста микробных популяций. В 1918 г. Р. Бухенен предложил первое математическое описание лаг-фазы процесса роста микробных организмов. В 1932 г. О. Рахн дал математическое описание роста клеточных популяций на примере микроорганизмов.

В 1925 г. А. Лотка предложил математическую теорию борьбы за существование. Независимо от него в 1931 г. В. Вольтера (Вальтерра) развивает аналогичные идеи. В настоящее время модели Лотки и Вольтеры принято считать классическими моделями роста конкурирующих популяций.

В 1942 г. д'Арси Томсон провел сравнительный анализ различных моделей и кривых роста клеточных культур. Ж. Моно исследует зависимости скорости роста клеточных популяций от концентраций «лимитирующего» субстрата.

В 1950 г. В.О. Таусон обобщил представления о зависимости удельной скорости роста клеточных популяций от концентрации лимитирующего субстрата. В 1975 г. И.А.Терсков и Н.С.Печуркин провели детальный анализ условий, лимитирующих рост микробных популяций.

Клеточный цикл

Все дело в мгновении. Оно определяет жизнь.

Ф. Кафка

Изучение кинетических особенностей развития клеточных популяций невозможно без понимания закономерностей развития одной клетки. Эти закономерности описываются клеточным циклом, который состоит по крайней мере из четырех фаз (рис. 5.1):

1. *Митоз (М-фаза)*. В этой фазе происходит деление материнской клетки на две дочерние.

2. *G₁-фаза* — период времени между концом М-фазы и началом синтеза ДНК.

3. *S-фаза* — период синтеза ДНК.

4. *G₂-фаза* — период между концом S-фазы и началом М-фазы.

Совокупность G₁-, S- и G₂-фаз принято называть *интерфазой*.

Длительность клеточного цикла подвержена значительным вариациям и может составлять от 1–2 ч (для эмбриональных, микробных клеток) до нескольких десятков лет (гепатоциты, нейроны).

В основном различия в длительности клеточных циклов связаны с различиями в длительности G_1 -фазы. У однотипных клеток могут происходить случайные изменения длительности G_1 -фазы, приводящие к десинхронизации процессов клеточного деления, даже если изначально процессы клеточного деления были синхронизированы.

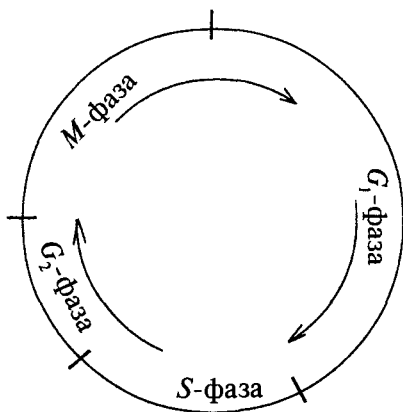


Рис. 5.1. Клеточный цикл.

Типичная кривая роста клеточной культуры

Механизмы, обеспечивающие пролиферацию клеток при прохождении клеточного цикла, слабо доступны для изучения *in vivo*. Эта проблема была изучена лишь с развитием техники длительного поддержания клеточных культур *in vitro*.

Первые попытки поддерживать клеточные культуры *in vitro* были предприняты в 1907 г. Харрионом и в 1912 г. Каррелем. Однако лишь в 1942 г. Ж. Моно предлагает современные методы культивирования клеточных культур *in vitro*.

Культура клеток представляет собой популяцию генотипически однотипных клеток, которые функционируют и делятся *in vitro*. Культуры клеток, полученные путем целенаправленных или случайных мутаций, называются *клеточными линиями*.

Рост клеточных культур *in vitro* имеет сложный характер (рис. 5.2). В целом можно выделить следующие фазы:

1. *Индукционный период (лаг-фаза)*. В течение лаг-фазы не происходит сколько-нибудь заметного увеличения числа клеток или образования продуктов. Данная фаза обычно наблюдается после посева клеточной культуры. В ней происходит адаптация микробных клеток к новой культуральной среде, перестраивается

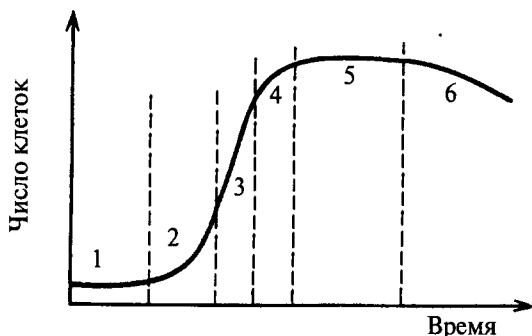


Рис. 5.2. Типичная кинетическая кривая роста клеточной культуры.

1 — индукционный период; 2 — фаза экспоненциального роста; 3 — фаза линейного роста; 4 — фаза замедления роста; 5 — стационарная фаза; 6 — фаза отмирания культуры.

метаболизм микробной клетки.

2. Фаза экспоненциального роста. Характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов жизнедеятельности клеточных культур. В данной фазе наиболее часто встречаются митозы по сравнению с остальными фазами роста клеточной культуры.

3. В замкнутой культуре фаза экспоненциального роста не может продолжаться бесконечно долго. Она

переходит в фазу *линейного роста*, характеризующуюся уменьшением числа митозов. В этой фазе наблюдается линейное увеличение числа микробных клеток в зависимости от времени культивирования.

4. Фаза замедления роста. В этой фазе уменьшается рост клеточной культуры за счет уменьшения числа митозов.

5. Стационарная фаза. Наблюдается вслед за фазой замедления роста, при этом число клеток практически не меняется. В этой фазе или происходит прекращение митотического деления клеток, или же число делящихся клеток равно числу умирающих клеток.

6. Фаза отмирания культуры, в которой преобладают процессы гибели клеток и практически не наблюдаются митотические деления.

Последовательные переходы от фазы 1 к фазе 6 наблюдаются в значительной степени за счет истощения субстратов, необходимых для роста популяции клеток, или же за счет накопления токсичных продуктов их жизнедеятельности.

Впервые на лимитирование процессов роста культур клеток субстратами ферментативных реакций обратил внимание Ж. Моно. Субстраты, ограничивающие рост микробных популяций, получили название *лимитирующих*.

Было показано, что зависимость скорости роста клеточной культуры от концентрации лимитирующего субстрата можно представить в следующем виде:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_s + S} N, \quad (5.1)$$

где $\dot{N}$ — число микробных клеток; μ_m — коэффициент пропорциональности, получивший название *предельная максимальная удельная скорость роста*; K_s — параметр, характеризующий сродство субстрата к клеткам культуры.

Достаточно часто вводят следующее обозначение:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}. \quad (5.2)$$

Тогда μ является коэффициентом пропорциональности, характеризующим клеточный рост. Его принято называть *удельной скоростью роста*. *Размерность* удельной скорости роста — обратное время: мин⁻¹, ч⁻¹ и т.д.

Уравнение (5.2) напоминает уравнение Михаэлиса-Ментен (см гл. 2) и получило название *уравнения Моно*.

Представляет интерес сравнение числовых параметров уравнения (5.2). На основании литературных данных было показано, что величины μ_m варьируют в пределах $10^{-2} - 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, а значения K_s — в диапазоне $10^{-2} - 10^{-8} \text{ М}$ (рис. 5.3). Как следует из рисунка, величины K_s практически полностью соответствуют наблюдаемым значениям констант Михаэлиса.

Среднее значение μ_m составляет порядка 10^{-4} с^{-1} . Исходя из стандартного соотношения между константой скорости первого порядка и временем удвоения численности клеточной популяции, видно, что среднее время увеличения клеточной популяции вдвое составляет около 2 ч.

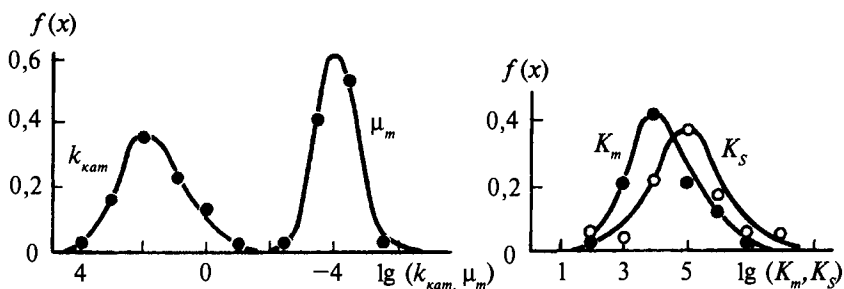


Рис. 5.3. Плотность распределения кинетических параметров ферментных реакций $k_{\text{кат}}$, K_m и кинетических параметров клеточного роста μ_m , K_s .

Размерность $k_{\text{кат}}$, μ_m — с⁻¹, K_m , K_s — М.

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{\mu_m}.$$

На практике отсутствуют клетки с μ_m выше 10^{-2} и ниже 10^{-6} с^{-1} . Верхний предел скорости роста клеточных популяций связан со скоростью процессов репликации (удвоения) ДНК в S-фазе клеточного цикла. Нижний предел скорости роста, по-видимому, связан с малой жизнеспособностью медленно растущих популяций.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные факты из истории развития изучения популяций. 2. Назовите основные фазы клеточного цикла. 3. Каковы основные фазы роста культуры клеток. 4. Напишите уравнение Моно. 5. С чем связано наличие верхних и нижних пределов роста клеточных культур?

5.2. Экспоненциальная фаза роста клеточных культур

Хвалю, мой друг, ее охоту,
Передохнув, рожать детей,
Подобных матери своей;
И счастлив, кто разделит с ней
Сию приятную заботу.

А. Пушкин

Определение параметров роста клеточной культуры

В условиях, когда концентрация субстратов и других компонентов, необходимых для роста клеток постоянна, процесс увеличения числа клеток носит автокаталитический характер. Данный процесс описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N, \quad (5.3)$$

где N — число клеток, μ — удельная скорость роста.

Дифференциальное уравнение (5.3) является уравнением с разделяющимися переменными. Оно легко может быть решено:

$$N = N_0 \exp[\mu t], \quad (5.4)$$

где N_0 — начальное число клеток.

Уравнение (5.4) описывает экспоненциальную фазу роста клеточных культур. В полулогарифмических координатах дан-

ное уравнение может быть представлено следующим образом:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t. \quad (5.5)$$

Таким образом, анализ экспериментальных данных по исследованию кинетики роста клеточных популяций следует начинать в полулогарифмических координатах. Если в этих координатах наблюдается спрямление экспериментальных данных, то они описываются уравнением (5.4). Тангенс угла наклона прямой равен удельной скорости роста клеточной культуры, а ордината точки пересечения графика с осью Y равна начальному числу клеток в культуре (рис. 5.4).

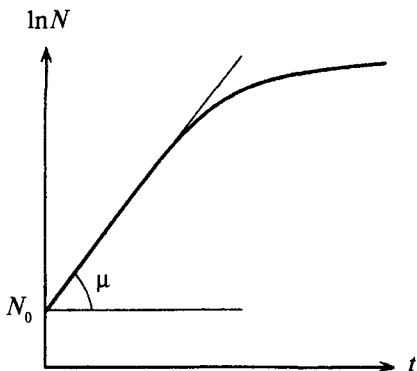


Рис. 5.4. Определение кинетических параметров роста клеточной культуры.

Пример 5.1 [1]. В табл. 5.1 приведены данные по кинетике роста культуры *Methanobacterium tindaris* на среде с метанолом при 37°C , pH 7,0. На основании экспериментальных данных определить удельную скорость роста этой культуры.

Экспериментальные данные, приведенные в табл. 5.1, представлены на рис. 5.5 в полулогарифмических координатах. Как следует из рисунка, при достаточно небольшом времени инкубации данной культуры наблюдается удовлетворительная линеаризация экспериментальных данных в полулогарифмических координатах, что свидетельствует о наличии экспоненциальной фазы роста культуры *M. tindaris*. Определяем $\mu = 0,1 \text{ ч}^{-1} = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$.

Таблица 5.1

Кинетика роста культуры *M. tindaris*

Время, ч	Число микроорганизмов
0	$2,59 \cdot 10^7$
5	$5,16 \cdot 10^7$
10	$1,08 \cdot 10^8$
20	$4,85 \cdot 10^8$
25	$8,49 \cdot 10^8$
40	$1,32 \cdot 10^9$

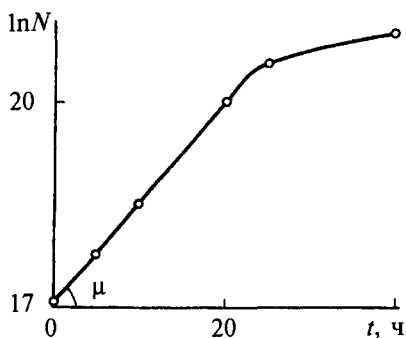


Рис. 5.5. Кинетика роста клеточной культуры *M. tindaris*.

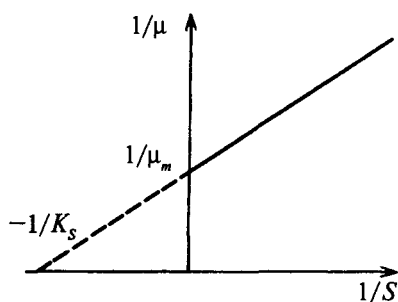


Рис. 5.6. Определение кинетических параметров роста клеточной культуры в двойных обратных координатах.

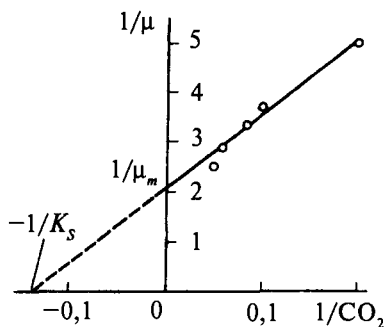


Рис. 5.7. Зависимость удельной скорости роста *M. thermoautotrophicum* от концентрации углекислого газа в газовой смеси.

Достаточно часто удельная скорость роста клеточной культуры зависит от концентрации лимитирующего субстрата и определяется уравнением

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}.$$

В этом случае наиболее удобным представляется анализ экспериментальных данных в двойных обратных координатах (см. гл. 2, 3), переход к которым описывается уравнением

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S}. \quad (5.6)$$

Параметры, определяемые с помощью двойных обратных координат, представлены на рис. 5.6.

Пример 5.2 [1]. Удельная скорость роста *Methanobacterium thermoautotrophicum* зависит от концентрации углекислого газа в газовой фазе и описывается данными табл. 5.2. На основании этих данных определить константу Михаэлиса и максимальную удельную скорость роста.

Экспериментальные данные по зависимости удельной скорости роста *M. thermoautotrophicum* от концентрации углекислого газа в газовой смеси представлены на рис. 5.7. Из графика находим: $\mu = 0,5 \text{ ч}^{-1}$, $K_s = 1/0,14 = 7\%$.

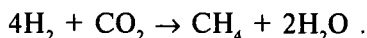
Многосубстратные процессы

По своей природе любой процесс роста клеточной популяции является многосубстратным. Так, например,

Кинетика роста *M. thermoautotrophicum* при pH 7, 65°C,
80% водорода в газовой смеси

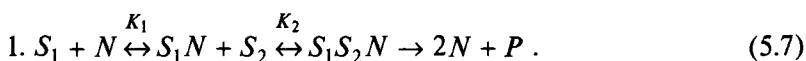
CO ₂ , %	μ, ч ⁻¹
5	0,2
10	0,27
12	0,3
17	0,35
20	0,4

M. thermoautotrophicum растет в результате следующей суммарной реакции:

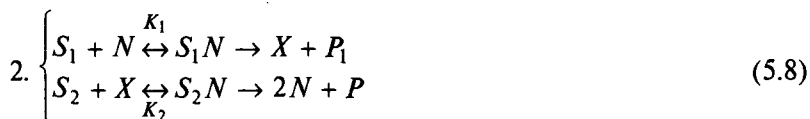


В данном случае водород и углекислый газ выступают в качестве равноправных субстратов. Ниже рассмотрим некоторые закономерности роста клеточных культур в экспоненциальной фазе с учетом многосубстратности роста.

Из ферментативного катализа (гл. 2) известны две принципиально различные простейшие схемы, приводящие к дискриминируемым зависимостям скорости процесса от концентрации двух субстратов. С учетом автокаталитического процесса микробного роста эти схемы могут быть представлены в следующем виде:



Механизм включает две обратимые стадии присоединения субстратов (*механизм тройного комплекса*):



Данный механизм предполагает наличие хотя бы одной стадии необратимого превращения субстрата. В ферментной кинетике данный механизм принято называть *пинг-понг механизмом*.

Исходя из ферментативной кинетики удельная скорость роста клеток описывается уравнениями:

для механизма тройного комплекса

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_2 / S_2 + K_1K_2 / S_1S_2} ; \quad (5.9)$$

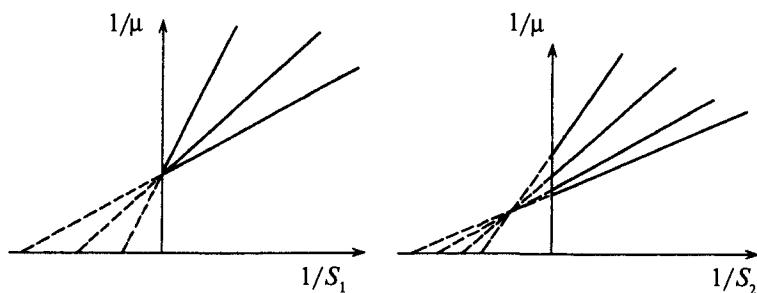


Рис. 5.8. Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации субстратов в двойных обратных координатах для механизма тройного комплекса.

для пинг-понг механизма

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_1 / S_1 + K_2 / S_2} \quad (5.10)$$

Из уравнений (5.9) и (5.10) видно, что они отличаются друг от друга членом $S_1 S_2$. Следовательно, схемы (5.7) и (5.8) могут быть дискриминированы на основании уравнений (5.9) и (5.10).

Дискриминацию механизмов (5.7) и (5.8) проводят в двойных обратных координатах (рис. 5.8, 5.9). При механизме тройного комплекса в этих координатах наблюдается семейство пересекающихся прямых (рис. 5.8). При пинг-понг-механизме все прямые в двойных обратных координатах не пересекаются (рис. 5.9).

Заметим, что специфика роста клеточных культур с точки зрения многосубстратности заключается в том, что субстраты акцептируются и конвертируются различными ферментными системами. При этом весьма вероятно наличие хотя бы одной существенно необратимой стадии между точками ввода субстратов в каталитический цикл. Это делает случай с несвязанными формами ферментов (пинг-понг-механизм) более вероятным в кинетике развития клеточной популяции.

Пример 5.3. Определить механизм многосубстратности роста культуры *M. thermoautotrophicum*.

Для *M. thermoautotrophicum* лимитирующими субстратами являются как водород, так и углекислый газ. Кинетические зависимости скорости роста данной бактерии от концентрации одного из субстратов при фиксированной концентрации другого представлены на рис. 5.10 и 5.11 (см. также пример 5.2).

Образование метана бактериями, в том числе *M. thermoautotrophicum*, можно представить следующим образом:

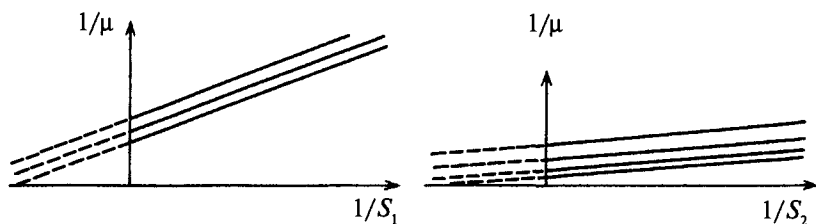
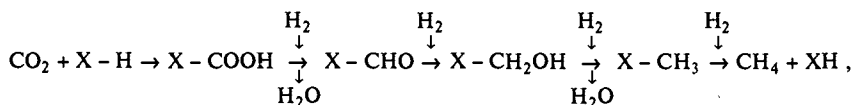


Рис. 5.9. Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации субстратов в двойных обратных координатах для пинг-понг-механизма.



где X — ряд ферментов метаногенеза.

Как следует из схемы, водород четыре раза используется как субстрат для восстановления углекислого газа до метана. В двойных обратных координатах экспериментальная зависимость скорости роста *Methanobacterium thermoautotrophicum* от водорода представляет собой прямую линию (см. рис. 5.10). Это свидетельствует о том, что все четыре стадии активации водорода производятся «несвязанными» формами ферментов или, что то же самое, стадии ввода водорода в ферментный цикл разделены необратимыми реакциями.

Если бы в механизме присоединения водорода была стадия

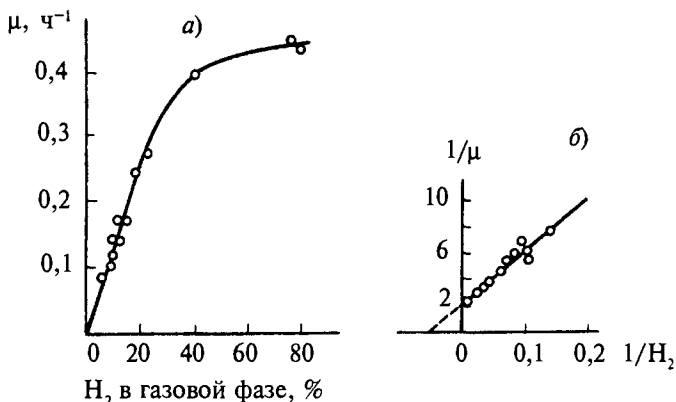
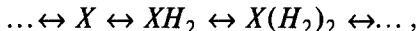


Рис. 5.10. Зависимость удельной скорости роста *M. thermoautotrophicum* от концентрации водорода в газовой смеси (а) (рН 7,0; 65°C, 20% CO₂). Те же данные в двойных обратных координатах (б).

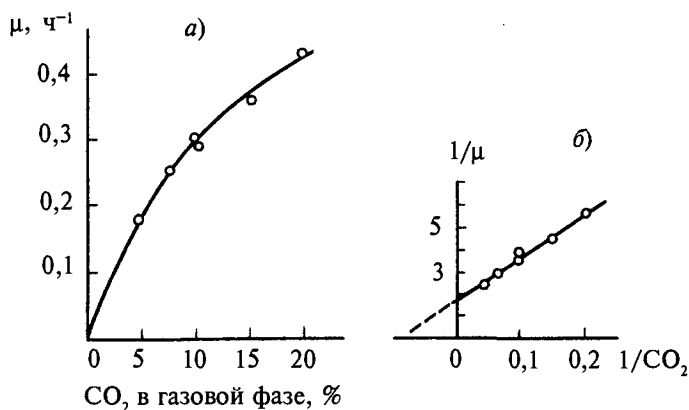


Рис. 5.11. Зависимость удельной скорости роста *M. thermoauto-trophicum* от концентрации CO_2 в газовой смеси (а) (рН 7,0; 65°C , 80% H_2). Те же данные в двойных обратных координатах (б).

то уравнение скорости роста *M. thermoautotrophicum* должно было бы содержать член $(\text{H}_2)^2$. Тогда линеаризация экспериментальных данных в двойных обратных координатах не наблюдалась.

Ингибирование и активация клеточного роста

Практически для всех клеточных популяций характерно изменение скорости роста под действием *ингибиторов* и *активаторов*.

Классификация ингибиторов и активаторов:

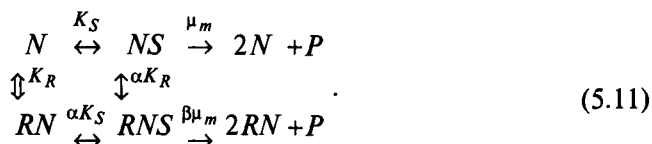
1. По «мишени», на которую действует вещество: а) ингибиторы, действующие на ДНК, например налидиксоновая кислота; б) ингибиторы, действующие на РНК, например актиномицин D; в) ингибиторы синтеза белка, например хлорамфеникол (левомицетин), эритромицин, тетрациклин; г) ингибиторы синтеза клеточной стенки, например пенициллин; д) мембраноактивные вещества, например толуол, хлороформ; е) ингибиторы энергетических процессов, например 2,4-динитрофенол; ж) ингибиторы лимитирующего фермента. Таких веществ достаточно много. Чувствительность ферментов к их действию зависит от природы функциональных групп активного центра конкретного фермента.

2. По кинетике действия: а) необратимые ингибиторы и активаторы; б) обратимые ингибиторы и активаторы.

Следует заметить, что для кинетики роста клеток также ха-

рактально наличие процессов ингибирования избытком субстрата и продуктом, которые будут проанализированы позднее.

По аналогии с ферментативной кинетикой общую схему действия эффектора R на процесс роста биомассы с лимитирующим субстратом можно записать следующим образом:



Удельная скорость роста клеточной культуры в этом случае описывается следующим уравнением:

$$\mu = \frac{\mu_m \frac{\alpha K_R + \beta R}{\alpha K_R + R} S}{\alpha K_S + \frac{K_R + R}{\alpha K_R + R} S} \quad (5.12)$$

Рассмотрим наиболее важные с точки зрения кинетики клеточного роста случаи ингибирования и активации.

1. *Полное конкурентное ингибирование* ($\alpha \rightarrow \infty, \beta = 0$). В этом случае удельная скорость роста клеток описывается уравнением

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_S(1 + R / K_S) + S}.$$

В двойных обратных координатах наблюдается пучок прямых, пересекающихся на оси ординат (рис. 5.12).

2. *Полное неконкурентное ингибирование* ($\alpha = 1, \beta = 0$). В этом случае удельная скорость роста культуры определяется выражением

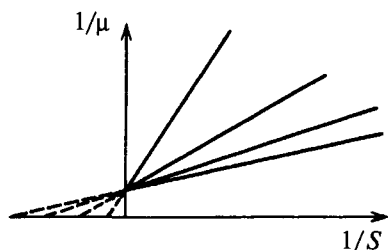


Рис. 5.12. Полное конкурентное ингибирование клеточного роста.

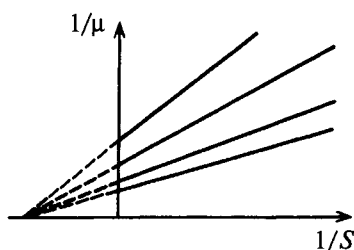


Рис. 5.13. Полное неконкурентное ингибирование клеточного роста.

Зависимость удельной скорости роста *E. coli* от концентрации ацетата

Анаэробные условия		Аэробные условия	
Ацетат, мМ	μ , ч ⁻¹	Ацетат, мМ	μ , ч ⁻¹
5	0,31	20	0,75
10	0,25	40	0,51
15	0,22	60	0,40
20	0,17	100	0,32
25	0,13	120	0,25
30	0,10	140	0,20

$$\mu = \frac{\mu_m S}{(1 + R / K_R) + (K_S + S)}.$$

При этом в двойных обратных координатах наблюдается пучок прямых, пересекающихся на оси абсцисс.

3. *Неконкурентная активация* ($\alpha = 1$, $\beta > 1$). Максимальная скорость роста в этом случае увеличивается:

$$\mu = \frac{\mu_m \frac{K_R + \beta R}{K_R + R} S}{K_S + S}.$$

В двойных обратных координатах данный случай практически неотличим от случая неконкурентного ингибирования (рис. 5.13).

4. *Смешанные типы ингибирования и активации* ($\alpha \neq 1$, $\beta \neq 1$).

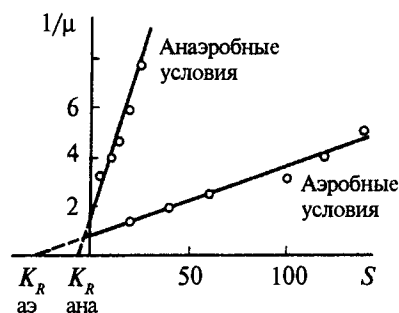


Рис. 5.14. Зависимость удельной скорости роста *E. coli* от концентрации ацетата.

Пример 5.4 [1]. Зависимость удельной скорости роста *E. coli* от концентрации ацетата в аэробных и анаэробных условиях приведена в табл. 5.3. Определить тип ингибирования или активации.

Как видно в аэробных условиях *E. coli* растет существенно быстрее, чем в анаэробных. Следовательно, кислород является активатором роста данной клеточной культуры. Для анализа подобных ситуаций Диксоном был предложен другой метод преобразования координат ($1/\mu$, S).

Экспериментальные данные по влиянию кислорода на удельную скорость роста *E. coli* представлены в координатах Диксона на рис. 5.14. Видно, что пересечение прямых, аппроксимирующих экспериментальные данные в координатах Диксона, не наблюдается ни на одной из осей. Следовательно, кислород является смешанным (частично конкурентным, частично неконкурентным) активатором роста *E. coli*. По точкам пересечения графика в координатах Диксона с осью абсцисс определяем константы ингибирования. В аэробных условиях $K_R = 24,5$ мМ, в анаэробных условиях $K_R = 11,0$ мМ.

Влияние pH на кинетику клеточного роста

Одним из важнейших факторов, определяющих кинетику клеточного роста, являются ионы водорода. Многие клеточные культуры растут в достаточно узком диапазоне pH; изменение pH приводит к замедлению их скорости роста или к полному прекращению роста. Влияние концентрации ионов водорода на скорость роста клеточных культур — достаточно сложное явление. Изменение pH может затрагивать многие стороны функционирования клетки.

Прежде всего концентрация ионов водорода может изменять состояние субстрата, если субстрат содержит ионогенную группу. Например, весьма распространенная группа субстратов — аминокислоты — содержит две ионогенные группы. Поэтому присоединение ионов водорода может существенным

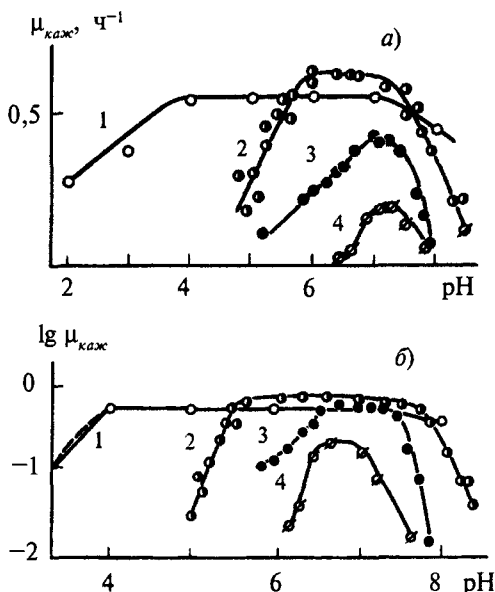


Рис. 5.15. Зависимость удельной скорости роста клеточных культур от pH (а) [1]. Те же данные в логарифмических координатах (б).

1 — *Candida utilis* на среде с глицерином; 2 — *Bacillus megatarium* на среде с глюкозой; 3 — *M.thermoautotrophicus* на газовой смеси; 4 — *Methanococcus maripaludis* на газовой смеси.

образом менять заряд аминокислоты, ее проницаемость через клеточную мембрану.

Следовательно, при анализе рН-зависимости роста клеток следует в первую очередь анализировать рН-зависимость лимитирующего субстрата.

Другим фактором, определяющим рН-зависимость скорости роста клеток, является чувствительность ферментов к концентрации ионов водорода. Процессы изменения активности ферментов при изменении рН были проанализированы в гл. 2.

На рис. 5.15 приведены типичные рН-зависимости роста культуры клеток. Это — сложные, колоколообразные кривые. Методы анализа подобных кривых были подробно рассмотрены в гл. 1 и 2.

Характерной особенностью живых клеток является различие концентраций ионов водорода вне клетки и в клетке.

Простейшую модель, описывающую этот факт, можно представить следующим образом. Пусть мембрана микробной клетки частично проницаема для ионов водорода. Тогда кинетика переноса ионов водорода через мембрану может быть представлена следующим образом:

$$\frac{dH_{\text{внутр}}^{+}}{dt} = \alpha H_{\text{внеш}}^{+} - \beta H_{\text{внутр}}^{+},$$

где $H_{\text{внутр}}^{+}$ и $H_{\text{внеш}}^{+}$ — концентрация ионов водорода в клетке и вне нее; α и β — коэффициенты пропорциональности.

В условиях равновесия

$$H_{\text{внеш}}^{+} = \frac{\alpha}{\beta} H_{\text{внутр}}^{+}.$$

Если $\alpha/\beta > 1$, то в клетке поддерживается более кислая среда, чем вне ее, иначе — в клетке среда более щелочная.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как определяются кинетические параметры роста клеточной популяции? 2. Как определить параметры роста клеточной культуры методом двойных обратных координат? 3. Почему кинетика роста клеток может зависеть от концентрации нескольких субстратов? 4. Какие виды влияния двух субстратов на кинетику роста клеток вы знаете? Как их дискриминировать? 5. Какие виды ингибиторов и активаторов вы знаете? Как их дискриминировать? 6. Перечислите факторы, определяющие рН-зависимость скорости клеточного роста. 7. Напишите уравнение простейшей модели, объясняющей различия в концентрации ионов водорода в клетке и окружающей среде.

5.3. Интегральная форма уравнения роста клеточной популяции

Наши математические затруднения Бога не беспокоят, он интегрирует эмпирически.

А.Эйнштейн

В предыдущем параграфе были рассмотрены закономерности роста клеток в самой интенсивной фазе развития — в экспоненциальной фазе. Каковы закономерности развития клеточных популяций при более длительном времени наблюдения за ними? Как было показано в § 5.1, при периодическом культивировании рост популяции клеток не бесконечен и останавливается на некотором предельном уровне, который может быть охарактеризован предельной максимальной концентрацией клеток N_m . Кинетический анализ, проводимый в настоящем параграфе, позволяет получить уравнения, описывающие поведение клеточной популяции во всем диапазоне времени развития клеточной культуры.

Замедление скорости роста клеточной культуры при большой плотности популяции

Одна из первых попыток описать феномен ограничения роста популяций была предпринята П. Ферхгюльстом в 1838 г. Он предположил, что помимо процесса размножения организмов, описываемого уравнением $(dN/dt)_p = \mu N$, есть процесс гибели организмов, наблюдаемый из-за «тесноты», т.е. данный процесс происходит при встрече двух индивидов. Поэтому процесс гибели описывается членом $(dN/dt)_g = \mu' N^2$. Тогда суммарное дифференциальное уравнение роста популяции можно переписать в виде

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \mu' N^2, \quad \frac{dN}{dt} = \mu N - \mu \frac{N^2}{N_m}. \quad (5.13)$$

Уравнения (5.13) принято называть *логистическими*. Интегрирование логистического уравнения с начальными условиями ($t = 0$, $N = N_0$) приводит к следующему соотношению:

$$\ln \frac{(N / N_0)(N_m - N_0)}{(N_m / N_0 - N / N_0)} = \mu t.$$

Из данного уравнения следует

$$\ln[N/(N_m - N)] = \mu t + C, \quad (5.14)$$

где $C = \ln(N_0/N_m)$.

Таким образом, критерием соответствия экспериментальных данных логистическому уравнению является спрямление экспериментальных данных в координатах уравнения (5.14) $\{\ln [(N/(N_m - N))], t\}$.

Достаточно часто логистические уравнения хорошо описывают наблюдаемую кинетику роста клеточных популяций. Однако следует заметить, что логистическое уравнение лишь с формальной точки зрения описывает поведение культуры клеток, не раскрывая молекулярно-биологических закономерностей их роста.

Интегральная форма уравнения роста клеточной культуры в условиях лимитирования по субстрату

Если процесс лимитирования субстратом — единственный фактор, ограничивающий рост клеточной популяции, то его легко можно учесть. Так как некий субстрат S является лимитирующим для процесса роста биомассы и расходуется в процессе роста культуры клеток, то между концентрацией данного субстрата и количеством клеток существует линейная связь

$$-Y_S \frac{dS}{dt} = \mu N, \quad (5.15)$$

где Y_S — коэффициент пропорциональности, называемый *экономическим коэффициентом*.

Предполагается, что экономический коэффициент постоянен во всем временном интервале развития клеточной культуры. Тогда

$$\begin{aligned} Y_S dS &= -dN; \\ Y_S (S_0 - S) &= N - N_0. \end{aligned}$$

Или

$$S = S_0 - \frac{N - N_0}{Y_S}. \quad (5.16)$$

Уравнения (5.15) и (5.16) справедливы для любых механизмов роста культуры клеток, если отсутствуют такие факторы, как ингибирование субстратом или продуктом, и ряд других.

Подстановка уравнения (5.16) в (5.15) с учетом соотношения (5.2)

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

приводит к следующему выражению:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_m N}{1 + \frac{K_S}{S_0 - \frac{N - N_0}{Y_S}}}.$$

Это дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными. Следовательно, его решение можно получить аналитическим интегрированием:

$$\left(1 + \frac{Y_S K_S}{Y_S S_0 + N_0}\right) \ln \frac{N}{N_0} - \frac{Y_S K_S}{Y_S S_0 + N_0} \ln \frac{Y_S S_0 + N_0 - N}{Y_S S_0} = \mu_m t. \quad (5.17)$$

Уравнение (5.17) принято называть *интегральным уравнением Моно*. Данное уравнение может быть переписано в более простом виде со следующими подстановками:

$$Q = \frac{Y_S K_S}{Y_S S_0 + N_0} \text{ — постоянная;}$$

$$a = \frac{N_0}{Y_S S_0} \text{ — постоянная;}$$

$$n = \frac{N}{N_0} \text{ — безразмерная переменная.}$$

Тогда

$$\ln n - \frac{Q}{1+Q} \ln(1+a-an) = \frac{\mu_m}{1+Q} t. \quad (5.17')$$

Принципиально важны два следующих случая функционирования системы:

1. Условия малого накопления биомассы и небольшого расхода субстрата ($an \ll 1$, $n \ll 1/a$). Тогда при $N_0 \ll Y_S S_0$ ($a \ll 1$)

$$\ln n \approx \frac{\mu_S S_0}{K_S + S_0} t,$$

что соответствует экспоненциальной фазе роста культуры клеток.

2. Режим, близкий к истощению субстрата ($an \rightarrow 1$). Тогда

$$\frac{K_S}{K_S + S_0} \ln(1-an) \approx -\frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0} t;$$

$$1-an \approx \exp\left[\frac{\mu_m S_0}{K_S} t\right].$$

При бесконечно больших временах протекания процесса размножения клеток существует предел их роста, определяемый соотношением

$$\lim_{t \rightarrow \infty} N = Y_S S_0.$$

Таким образом, концентрация лимитирующего субстрата ограничивает не только скорость размножения, но и численность клеточной популяции.

Итак, уравнение (5.17) описывает наиболее характерные особенности развития клеточной популяции. Форма кинетической кривой зависит от соотношения концентрации субстрата и константы Михаэлиса, т.е. от порядка «лимитирующей» ферментативной реакции по субстрату.

1. Если «лимитирующая» ферментативная реакция имеет первый порядок ($S_0 \ll K_S$), то уравнение (5.17') переписывается следующим образом:

$$\ln n - \ln(1 - an) = \frac{\mu_m S_0}{K_S} t.$$

Пунктиром обозначены проекции кинетических кривых, полученные методом двойного зеркального отражения.

Показано, что данное уравнение является логистическим (см выше). Спрямяющие координаты для данного уравнения определяются соотношением:

$$\ln \frac{N}{N_m - N} = \frac{\mu_m S_0}{K_S} t + C.$$

2. Если «лимитирующая» ферментативная реакция имеет нулевой порядок по субстрату, то уравнение (5.17') переписывается следующим образом:

$$\ln n - \frac{K_S}{S_0} \ln(1 + an) = \mu_m t.$$

Данная кривая не является логистической.

Сравнение кривых роста клеточных популяций для лимитирующих ферментативных реакций различных порядков приведе-

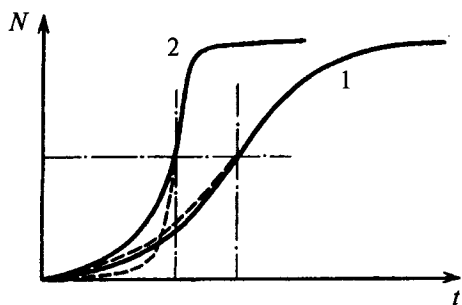


Рис. 5.16. Сравнение кинетических кривых роста клеточных популяций в режиме первого (1) и нулевого (2) порядков «лимитирующих» ферментных реакций.

но на рис. 5.16. Как следует из рисунка, логистическая кривая роста, соответствующая случаю ферментативной реакции первого порядка, является симметричной относительно точки своего перегиба. Для определения симметричности кривых на рисунке использован метод двойного зеркального отражения кинетических кривых относительно точек перегиба.

Приближенный анализ интегральной кривой роста клеточной популяции

Интегральное уравнение роста популяции клеток при $N_0 \ll N_m$ можно переписать следующим образом:

$$\ln \frac{N}{N_0} - \Phi \ln \left(1 - \frac{N}{N_m} \right) = \mu t, \quad (5.18)$$

где $\Phi = \frac{K_S}{K_S + S_0}$.

Второй логарифмический член уравнения (5.18) может быть представлен в виде разложения в ряд Тейлора; при этом приближенное описание кинетики роста клеток будет тем полнее, чем меньше степень конверсии субстрата:

$$\frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{N}{N_m} = \xi;$$

$$\ln(1 - \xi) = -\xi - \xi^2 / 2 - \xi^3 / 3 - \dots$$

В простейшем случае можно ограничиться только одним членом разложения

$$\ln \frac{N}{N_0} + \Phi \xi \approx \mu t. \quad (5.19)$$

Относительная ошибка Δ аппроксимации уравнения (5.18) уравнением (5.19) для различных ситуаций приведена на рис. 5.17. Предполагая, что данная аппроксимация не является удовлетворительной, если ошибка превышает 10–12%, очевидно, что формула (5.19) верна лишь при небольших степенях конверсии субстрата. Степень конверсии определяется из рис. 5.17 в зависимости от параметров K_S и S_0 .

Рассмотрим на нескольких примерах анализ кривых роста клеточных популяций в рамках интегральных кинетических кривых и проиллюстрируем, какую информацию о природе протекающих процессов можно получить, используя обсуждаемый подход.

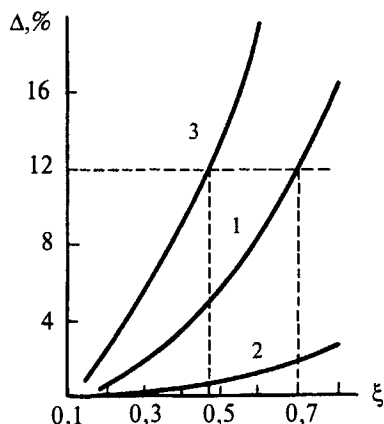


Рис. 5.17. Зависимость относительной ошибки Δ аппроксимации уравнения (5.18) уравнением (5.19) от степени конверсии субстрата.

1 — $K_s \approx S_0$, $\Phi = 1$; 2 — $S_0 \gg K_s$, $\Phi = 0,1$; 3 — $S_0 \gg K_s$, $\Phi = 5$.

кинетической кривой) можно с достаточно большой достоверностью пренебречь расходом субстрата. В этих условиях рост культуры происходит экспоненциально, и динамика процесса может быть представлена уравнением $\ln M = \ln N_0 + \mu t$.

Использование этого приближения позволяет дать оценку параметров μ и N_0 . Параметр N_0 предпочтительнее определять независимо, как начальную величину клеток в инокуляте (или как величину, линейно связанную с оптической плотностью клеток в начальный момент времени).

Пример 5.5 [1]. Рост водородокисляющей бактерии *Alcaligenes eutrophus* лимитируется азотом. Оптическая плотность культуры прямо пропорциональна числу клеток. Определить кинетические параметры роста культуры исходя из данных табл. 5.4.

На рис. 5.18 приведена кинетическая кривая роста водородокисляющей бактерии *A.eutrophus*. Рост культуры лимитирован по азоту, и через какое-то время в результате расхода азотного компонента он останавливается. Для количественного анализа экспериментальных данных удобно провести следующие операции:

1. *Оценка параметров μ и N_0 из начальных участков кинетической кривой.* На начальных этапах развития процесса развития культуры клеток до глубин накопления биомассы M в 10–20% от предельного значения M_m (первые четыре точки кинетической кривой) можно с достаточно большой достоверностью пренебречь

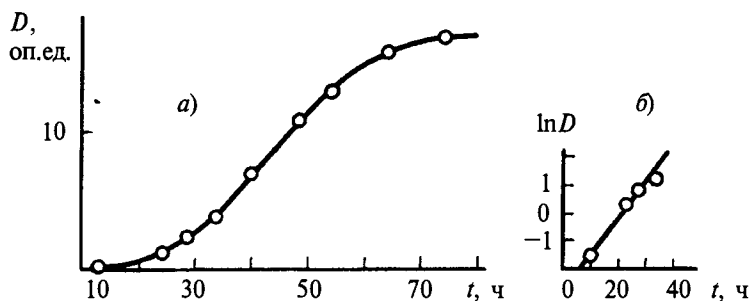


Рис. 5.18. Кинетика роста *A.eutrophus* с лимитацией по источнику азота (а) и линеаризация начального участка экспериментальных данных в полулогарифмических координатах (б).

Кинетика роста *A.eutrophus*

Время инкубации, ч	Оптическая плотность инкубационной среды, опт. ед.
11	0,5
25	1,0
29	1,7
35	3,0
40	5,0
50	8,3
55	9,5
65	11,0
75	11,5

С другой стороны, величину N_0 можно найти кинетическим методом из экстраполяции экспериментальных данных к нулевому моменту времени (в предположении, что на кинетической кривой отсутствует период индукции).

На рис. 5.18б приведены данные начального участка кинетической кривой рис. 5.18а в полулогарифмических координатах. Тангенс угла наклона этой зависимости дает оценку $\mu = 0,13 \text{ ч}^{-1}$. Экстраполяция кинетической кривой к начальному моменту времени дает оценку $N_0 = 6 \cdot 10^{-2}$ опт. ед.

2. *Линеаризация всей кинетической кривой в координатах интегрального уравнения роста с истощением субстрата.* Уравнение (5.17) можно преобразовать к следующему виду:

$$\frac{\ln(M / N_0)}{t} = \frac{\mu_m S_0}{S_0 + K_S} + \frac{K_S}{S_0 + K_S} \frac{\ln(1 - M / M_m)}{t}. \quad (5.20)$$

Из экспериментальных данных величина M_m определяется асимптотически. Для данных рис. 5.18 она равна 17,2 опт. ед.

Таким образом, определив экспериментально значения N_0 и M_m , можно вычислить функции $[\ln(M/N_0)]/t$ и $[\ln(1 - M/M_m)]/t$ и построить зависимость одной экспериментальной величины от другой. Если экспериментальные данные соответствуют интегральной кривой роста клеточной популяции, то эта зависимость должна иметь линейный характер, при этом можно определить два параметра прямой:

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0}, \quad \Phi = \frac{K_S}{S_0 + K_S}.$$

Важно обратить внимание на следующее обстоятельство. Наибольшей статистической ошибке в координатах уравнения (5.20) подвержены точки, лежащие вблизи значений $M \rightarrow 0$ и $M \rightarrow M_m$ (первая и последняя точки

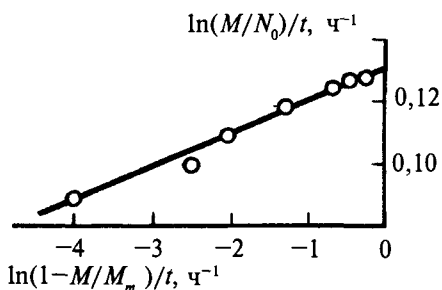


Рис. 5.19. Линеаризация данных рис. 5.18 в координатах уравнения (5.20).

кинетическая кривая роста водородоокисляющей бактерии в координатах уравнения

$$\frac{\ln(M / N_0)}{\ln(1 - M / M_m)} = \Phi + \mu \frac{t}{\ln(1 - M / M_m)}. \quad (5.21)$$

Из рисунка видно, что μ достаточно надежно определяется по тангенсу угла наклона ($0,13 \text{ ч}^{-1}$), а Φ , равное точке пересечения графика с осью ординат, определяется с большой ошибкой (1,5).

Наконец, можно воспользоваться уравнением

$$\frac{\ln(1 - M / M_m)}{\ln(M / N_0)} = \frac{1}{\Phi} - \frac{\mu}{\Phi} \frac{t}{\ln(M / N_0)}. \quad (5.22)$$

В этих координатах параметр Φ определяется с заметной ошибкой (1,1), а параметр μ — практически без ошибки ($0,13 \text{ ч}^{-1}$) (рис. 5.21).

Заметим, что все рассмотренные методы преобразования координат приводят к согласующимся значениям μ и Φ .

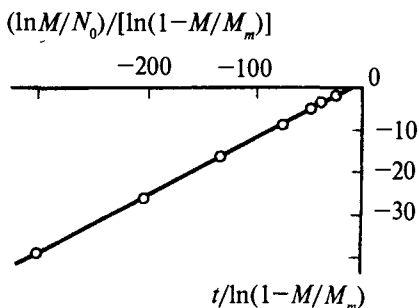


Рис. 5.20. Линеаризация данных рис. 5.18 в координатах уравнения (5.21).

кинетической кривой рис. 5.18). Поэтому при обработке экспериментальных данных рис. 5.18 в координатах уравнения (5.20) эти точки не учитывались. Из рисунка по тангенсу угла наклона определяем значение Φ , равное 1,1; по отрезку, отсекаемому на оси ординат, определяем μ , равное $0,14 \text{ ч}^{-1}$.

Для анализа экспериментальных данных можно воспользоваться и другими линейными анаморфозами уравнения (5.17). Например, на рис. 5.20 приведена

Экспериментально найденное значение Φ равно единице. Это означает, что в соответствии с уравнением (5.18) в рамках проведенного эксперимента $K_s \gg S_0$, т.е. использованная на опыте концентрация субстрата, в данном случае источника азота 1 г/л , существенно меньше наблюдаемой константы сродства исследуемой клеточной культуры к данному субстрату. Поэтому из проведенного эксперимента нельзя определить параметры μ_m и K_s , а можно только найти их отношение.

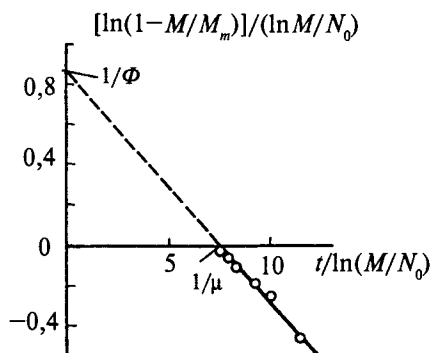


Рис. 5.21. Линеаризация данных рис. 5.18 в координатах уравнения (5.22).

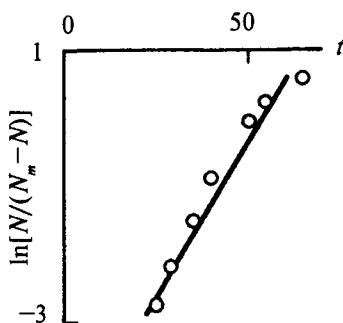


Рис. 5.22. Линеаризация данных рис. 5.18 в координатах Ферхюльста [уравнение (5.14)].

Качественно соотношение $K_s \gg S_0$ можно было бы получить исходя из аналитического вида кинетической кривой на рис. 5.18: данная кривая симметрична относительно точки перегиба. Как показал проведенный анализ, симметричность кинетической кривой относительно точки перегиба означает, что $\Phi \approx 1$. Это свидетельствует о том, что данные рис. 5.18 должны линеаризоваться в координатах уравнения Ферхюльста, что действительно наблюдается (рис. 5.22).

Разностный метод анализа полных кинетических кривых роста клеточных популяций

При анализе кривых роста клеточной культуры, как правило, возникают некоторые осложнения. Часто они связаны с тем, что экспериментально бывает трудно определить начальное число клеток или начальную концентрацию вводимого в систему продукта (если анализ кинетики роста культуры ведется по продукту реакции). Начальное число клеток или начальная концентрация продукта могут оказаться ниже чувствительности методов их регистрации. Вычисление начального числа клеток методом экстраполяции, рассмотренным выше, может приводить к существенным ошибкам, если кинетическая кривая роста клеточной культуры включает в себя период индукции, в течение которого могут происходить адаптационные процессы, не связанные с ростом биомассы. Важно отметить, что иногда вообще нельзя точно сказать, имеет ли место на кинетической кривой период индукции, поскольку он может «маскироваться» экспоненциальной фазой.

Указанных сложностей можно избежать за счет применения

разностных методов анализа. Запишем уравнение (5.18) для некоторого фиксированного времени $t_i - \tau$, где τ — период индукции, t_i — общее время развития процесса:

$$\ln M_i - \ln N_0 - \Phi \ln(M_m - M_i) + \Phi \ln M_m = \mu(t_i - \tau), \quad (5.23)$$

где M_i — количество биомассы в момент времени t_i .

Для какого-либо другого времени t_j уравнение (5.23) будет иметь вид

$$\ln M_j - \ln N_0 - \Phi \ln(M_m - M_j) + \Phi \ln M_m = \mu(t_j - \tau). \quad (5.24)$$

Вычитая из уравнения (5.24) уравнение (5.23), получим

$$\ln \frac{M_j}{M_i} - \Phi \ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i} = \mu(t_j - t_i). \quad (5.25)$$

Видно, что полученное уравнение не включает в себя неопределенные параметры N_0 и τ . Поэтому уравнение (5.25) весьма полезно при анализе полных кинетических кривых роста клеточных культур. Согласно этому уравнению из k экспериментальных точек можно получить $k(k-1)/2$ положительных разностей $t_j - t_i$. Величины Φ и μ могут быть найдены исходя из анализа пула полученных числовых значений при использовании любой линейной модификации уравнения (5.25), например

$$\frac{\ln \frac{M_j}{M_i}}{t_j - t_i} = \mu + \Phi \frac{\ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i}}{t_j - t_i}. \quad (5.26)$$

Пример 5.5 (продолжение). Проведем анализ кинетики роста *A. eutrophus* разностным методом. Как следует из рис. 5.23, экспериментальные данные хорошо спрямляются в координатах уравнения (5.26). Параметры μ и Φ соответственно равны $0,13 \text{ ч}^{-1}$ и $1,2$, что близко к ранее найденным значениям.

Пример 5.6. Определить кинетические параметры метаболизма клеточной популяции *Methanosacina vacuolata* (рис. 5.24).

Так как исследование кинетики процесса ведется по субстрату или продукту, уравнение (5.26) может быть переписано в следующем виде (при условии $N_0/M_m < 0,1$):

$$\begin{aligned} \frac{\ln \frac{S_0 - S_j}{S_0 - S_i}}{t_j - t_i} &= \mu + \Phi \frac{\ln(S_j / S_i)}{t_j - t_i}; \\ \frac{\ln \frac{P_j}{P_i}}{t_j - t_i} &= \mu + \Phi \frac{\ln \frac{P_m - P_j}{P_m - P_i}}{t_j - t_i}. \end{aligned} \quad (5.27)$$

Обработка экспериментальных данных в координатах уравнения (5.27) (рис. 5.25) приводит к следующим значениям:

по кинетике расхода метанола

$$\mu = 0,22 \text{ сут}^{-1}, \Phi = 0,65,$$

по кинетике накопления метана

$$\mu = 0,23 \text{ сут}^{-1}, \Phi = 0,67.$$

Видно, что обе экспериментальные зависимости приводят к согласующимся значениям параметров.

Используя значения μ и Φ , можно вычислить K_S и μ_m :

$$K_S = \frac{\Phi}{1 - \Phi} S_0; \quad \mu_m = \frac{M}{1 - \Phi}.$$

В данном случае $K_S = 480 \text{ мМ}$, $\mu_m = 0,65 \text{ сут}^{-1}$. Эти результаты хорошо согласуются с результатами, полученными для других штаммов метаносарцин. Кроме того, эти данные показывают, что удельная максимальная скорость роста культуры в несколько раз превышает наблюдаемую удельную скорость роста, и процесс может быть интенсифицирован увеличением начальной концентрации метана.

В качестве практической рекомендации отметим, что наибольший статистический вес и наименьшую случайную ошибку в рамках обсуждаемого подхода имеют точки, лежащие ближе к центру прямой. Крайние значения (высокие и низкие значения функции $\ln[(M_j/M_i)/(t_j-t_i)]$) подвержены отклонениям, проистекающим из-за экспериментальных и вычислительных ошибок. Такие значения лучше отбрасывать.

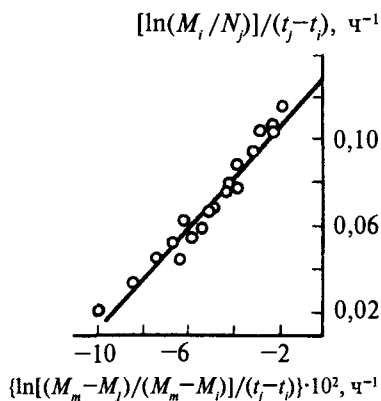


Рис. 5.23. Линеаризация данных рис. 5.18 в координатах уравнения (5.26).

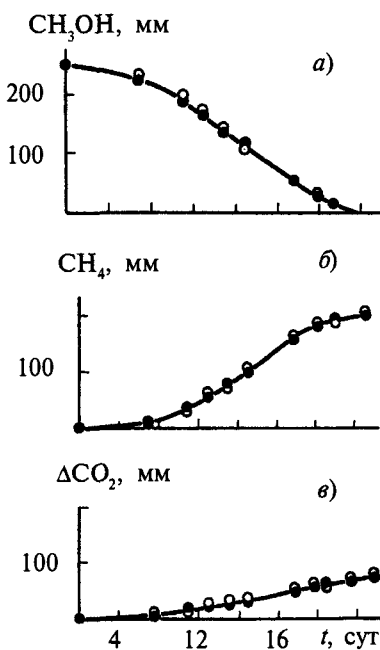


Рис. 5.24. Кинетические кривые расхода метанола (а) и накопления метана (б) и диоксида углерода (в) в процессе роста *M. vacuolata*.

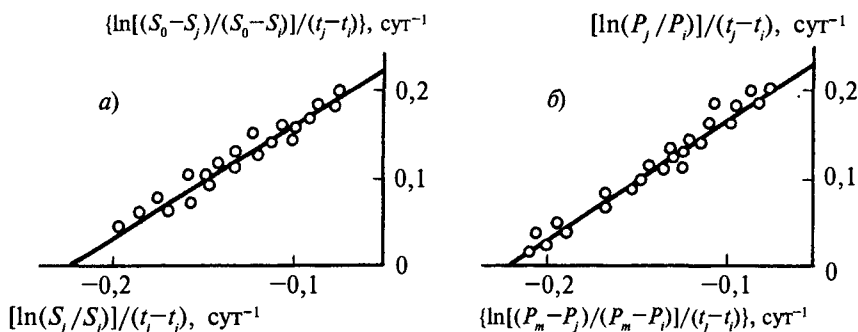


Рис. 5.25. Линеаризация экспериментальных данных рис. 5.24 в координатах уравнения (5.27) для субстрата (а) и продукта (б).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные факторы, приводящие к замедлению скорости роста клеточной культуры.
2. Напишите логистическое уравнение.
3. Выведите интегральное уравнение Моно.
4. Сравните закономерности роста клеточных культур в условиях различий порядков ферментативных реакций по лимитирующему субстрату.
5. Как приблизительно можно анализировать кинетическую кривую роста клеточной популяции? От каких факторов зависит точность приближения?
6. В каких координатах можно линеаризовать уравнение Моно?
7. Опишите процедуру получения параметров роста клеточной культуры разностным методом.

5.4. Ингибирование роста популяции избытком субстрата и продуктами ферментации

Фактов всегда достаточно — не хватает фантазии.

Д. Блохинцев

Одной из характерных особенностей роста клеточных популяций являются часто наблюдаемые эффекты ингибирования процесса роста избытком субстрата и продуктами ферментации (жизнедеятельности клеток). Поэтому в настоящем параграфе рассмотрим ряд кинетических схем, объясняющих эти феномены.

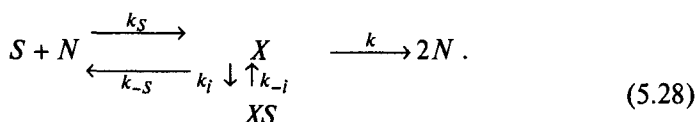
Ингибирование избытком субстрата

Часто рост клеточных культур наблюдается лишь в узком диапазоне концентраций субстрата. Удельная скорость роста на на-

чальном участке зависимости от концентрации субстрата растет, затем выходит на плато, далее, при более высоких концентрациях субстрата, начинает уменьшаться. В силу этого интенсивный рост клеточных популяций становится возможным лишь в узком диапазоне концентраций субстрата. Это явление часто применяется на практике. Например, наиболее распространенный способ консервации многих продуктов заключается в использовании больших концентраций сахарозы, избыток которой существенно замедляет рост микроорганизмов.

Кинетические модели роста с ингибированием субстратом

Простейшей кинетической схемой, объясняющей механизм ингибирования процесса роста клеточных популяций избытком субстрата, является



При этом предполагается, что субстрат взаимодействует с клеткой с образованием промежуточной формы X , которая может или обратимо делиться, или обратимо ингибироваться избытком субстрата.

Предположим, что концентрация субстрата много больше необходимого для процесса жизнедеятельности клеток и что процесс, описываемый схемой (5.28), протекает при малой степени конверсии субстрата. Следовательно, концентрацию субстрата можно считать постоянной и равной начальной концентрации S_0 . В этих условиях закон действующих масс запишется следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dN}{dt} &= 2kX + k_{-S}X - k_S S_0 X; \\ \frac{dX}{dt} &= k_S S_0 N + k_{-i}(XS) - (k + k_i + k_{-S})X; \\ \frac{d(XS)}{dt} &= k_i S_0 X - k_{-i}(XS). \end{aligned} \quad (5.29)$$

Общее количество биомассы M в системе

$$M = N + X + XS, \quad (5.30)$$

или

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(XS)}{dt}. \quad (5.31)$$

Подставив эти уравнения в (5.29), получим

$$\frac{dM}{dt} = kX. \quad (5.32)$$

Если процессы на обратимых стадиях схемы (5.28) протекают относительно быстро и эти реакции имеют равновесный характер, то можно выразить связь между переменными X , N и XS с помощью уравнений для констант равновесия

$$K_S = \frac{k_{-s}}{k_s} = \frac{N}{X} S_0; \quad K_i = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{X}{(XS)} S_0.$$

Тогда (5.30) может быть переписано следующим образом:

$$M = X \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right),$$

или

$$X = \frac{M}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}.$$

Подстановка этого соотношения в уравнение (5.32) приводит к следующему дифференциальному уравнению:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{kM}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}.$$

Решение этого дифференциального уравнения с начальным условием $M(t=0) = N_0$ имеет вид

$$M(t) = N_0 \exp \left[\frac{k}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} t \right]. \quad (5.33)$$

В этом случае удельная скорость роста клеточной популяции описывается выражением

$$\mu = \frac{k}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (5.34)$$

В общем виде уравнение (5.34) можно переписать следующим образом:

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_{S_{эфф}} + S_0 \left(1 + \frac{S_0}{K_{i_{эфф}}} \right)}, \quad (5.34')$$

где μ_m — максимальная удельная скорость роста; $K_{S_{эфф}}$ и $K_{i_{эфф}}$ — соответствующие константы сродства к субстрату и ингибирования его избытком.

Существует множество кинетических схем, описываемых уравнением (5.34) (табл. 5.5). Данная ситуация аналогична рассмотренной в гл. 2 для уравнения Михаэлиса—Ментен, когда множество различных кинетических схем приводили к одному и тому же уравнению. Схема (5.28) является простейшей, приводящей к уравнению (5.34).

Зависимости удельной скорости роста клеточных популяций от концентрации субстрата для режима ингибирования его избытком приведены на рис. 5.26. Видно, что уравнение (5.34) качественно описывает феномен роста клеточных популяций в узком диапазоне концентраций субстрата. При малых концентра-

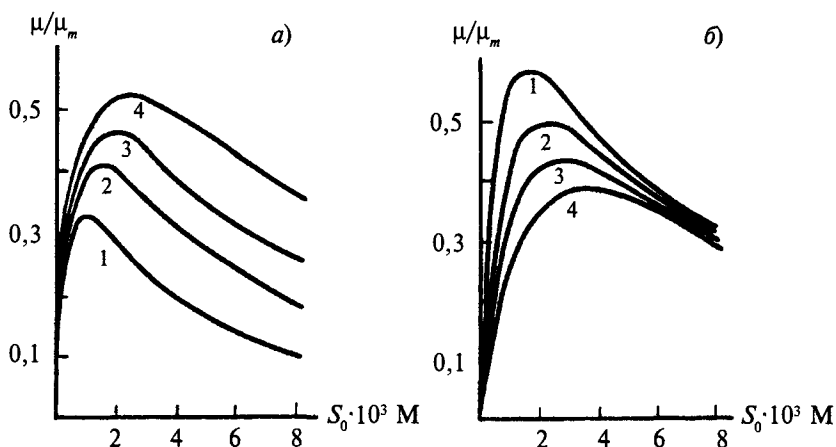


Рис. 5.26. Зависимость удельной скорости роста клеточных популяций от концентрации субстрата для режима с ингибированием избытком субстрата.

a — кривые зависимости при $K_{S_{эфф}} = 10^{-4}$ М; $K_{i_{эфф}} \cdot 10^{-4}$ М равно: 1 — 1,0; 2 — 2,0; 3 — 3,0; 4 — 5,0; *б* — кривые зависимости при $K_{i_{эфф}} = 4 \cdot 10^{-4}$ М; $K_{S_{эфф}} \cdot 10^{-4}$ М равно: 1 — 0,5; 2 — 1,0; 3 — 1,5; 4 — 2,5.

Таблица 5.5

Кинетические параметры процессов роста популяции клеток с ингибированием избытком субстрата

№ п/п	Кинетическая схема	μ_m	$K_{S_{эфф}}$	$K_{i_{эфф}}$
1.	$S + N \xrightleftharpoons[k_{-S}]{k_S} X \xrightarrow{k} 2N$ $X + S \xrightleftharpoons[k_{-i}]{k_i} XS$	k	K_S	K_i
2.	$S + N \xrightarrow{k_S} X \xrightarrow{k} 2N$ $X + S \xrightleftharpoons[k_{-i}]{k_i} XS$	k	k/k_S	K_i
3.	$S + N \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k} 2N$ $X + S \xrightleftharpoons[k_{-i}]{k_i} XS$	$\frac{k}{1 + k / k_2}$	$\frac{k}{k_1(1 + k / k_2)}$	$\frac{1}{(1 + k / k_2)K_i}$
4.	$S + N \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k} 2N$ $X + S \xrightarrow{k_i} XS$	$\frac{k}{1 + k / k_2}$	$\frac{k}{k_1(1 + k / k_2)}$	$\frac{1}{(1 + k / k_2)k_i}$

циях субстрата, в условиях $S_0^2 / K_{i_{эфф}} \ll S_0$ ($S_0 \ll K_{i_{эфф}}$) удельная скорость роста увеличивается с возрастанием концентрации субстрата:

$$\mu \approx \mu_m S_0 / K_{S_{эфф}}.$$

При больших концентрациях субстрата, когда $S_0 \gg K_{i_{эфф}}$ и $S_0 \gg K_{S_{эфф}}$,

$$\mu \approx \frac{\mu_m K_{i_{эфф}}}{S_0},$$

т.е. скорость роста должна уменьшаться при увеличении концентрации субстрата и в пределе стремиться к нулю.

Определение параметров роста клеточной популяции при субстратном ингибировании

Уравнение (5.34) — трехпараметрическое и достаточно часто используется в стационарной кинетике ферментного катализа. Помимо субстратного торможения, трехпараметрическое уравнение описывает рН-зависимости ферментных реакций, активацию и ингибирование ферментов ионами металлов и другие процессы.

Для определения числовых параметров $K_{S_{эфф}}$ и $K_{i_{эфф}}$, если они существенно различаются, например $K_{S_{эфф}} / K_{i_{эфф}} \ll 0,1$, с достаточно большой точностью можно использовать асимптотические приближения. При относительно низких концентрациях субстрата $S_0 \ll K_{i_{эфф}}$ уравнение (5.34) трансформируется к виду

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{S_0 + K_{S_{эфф}}},$$

т.е. представляет собой уравнение Моно, из которого стандартными способами могут быть найдены параметры K_S и μ_m .

При высоких концентрациях субстрата ($S_0 \gg K_{S_{эфф}}$) скорость роста клеточной популяции будет описываться уравнением

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{S_0}{K_{i_{эфф}}}},$$

параметры которого могут быть найдены с помощью анаморфозы:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{S_0}{\mu_m K_{i_{эфф}}}.$$

Если константы $K_{S_{эфф}}$ и $K_{i_{эфф}}$ соизмеримы, то использование асимптотических приближений приводит к большим ошибкам. В подобных случаях лучше использовать конечно-разностный метод, предложенный О.М. Полтораком и др. в 1976 г. Суть метода сводится к следующему.

Представим уравнение (5.34') в виде

$$\frac{S_0}{\mu} = \frac{K_{S_{эфф}}}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} S_0 + \frac{1}{\mu_m K_{i_{эфф}}} S_0^2, \quad (5.35)$$

или

$$y = c + bx + ax^2,$$

где $y = S_0/\mu$; $x = S_0$.

Если провести измерение скорости роста клеточной популяции при двух различных концентрациях субстрата x_i и x_m , то, взяв разность между полученными величинами y , будем иметь

$$\Delta y = a\Delta x(x_i + x_m) + b\Delta x; \Delta = y_i - y_m; \Delta x = x_i - x_m.$$

Следовательно,

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = a(x_i + x_m) + b. \quad (5.36)$$

Как видно из уравнения (5.36), из зависимостей $\Delta x/\Delta y$ от $(x_i + x_m)$ можно найти параметры a и b . Это позволяет определить параметры μ_m и $K_{i_{эфф}}$. Для нахождения параметра $K_{S_{эфф}}$ воспользуемся преобразованием

$$\frac{1}{\mu S_0} = \frac{K_{S_{эфф}}}{\mu_m} \frac{1}{S_0^2} + \frac{1}{\mu_m} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{K_{i_{эфф}}}.$$

Использование других переменных, т.е.

$$y = \frac{1}{\mu S_0}, \quad x = \frac{1}{S_0},$$

позволяет аналогично рассмотренному выше из зависимостей $\Delta x/\Delta y$ от $(x_i + x_m)$ найти параметры $1/\mu_m$ и $K_{S_{эфф}}/\mu_m$.

Разностные методы — удобный инструмент для анализа многопараметрических уравнений. Однако применять их следует с известной осторожностью. Например, они мало пригодны для экспериментальных данных, полученных с большой погрешностью, так как разностные методы дают значительный разброс вычисляемых точек, что приводит к большой неопределенности в искомым параметрах. Кроме того, при построении разностных функций необходимо использовать достаточно большие значения Δx и Δy так, чтобы они существенно превосходили случайную ошибку эксперимента. Целесообразно для вычисления разностей применять значения функций на различных «восходящих» и «нисходящих» участках экспериментальной зависимости.

Анализ полной кинетической кривой роста клеточной популяции при субстратном ингибировании

Рассмотрим кинетику процесса роста клеточной популяции при наличии процессов ингибирования избытком субстрата вплоть до полного истощения субстрата. Дифференциальное уравнение роста культуры в этом случае имеет вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m MS}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}, \quad (5.37)$$

где S — текущая концентрация субстрата.

Интегрирование уравнения (5.37) (уравнение с разделяющимися переменными) приводит к следующему соотношению:

$$\left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}\right) \ln \frac{M}{N_0} - \frac{K_S}{S_0} \ln \left(1 - \frac{M - N_0}{M_m}\right) - \frac{1}{K_i Y_S} (M - N_0) = \mu_m t. \quad (5.38)$$

Видно, что отличие этого уравнения от уравнения для процесса в отсутствие ингибирования субстратом заключается в наличии дополнительного члена при множителе первого логарифмического слагаемого и в дополнительном отрицательном линейном члене. Из уравнения (5.38) следует, что при $K_i \rightarrow 0$ (отсутствие или «плохое» ингибирование субстратом) уравнение (5.38) трансформируется в обычное интегральное уравнение роста клеточной культуры.

Уравнение (5.38) можно преобразовать к следующему виду:

$$\ln \frac{M}{N_0} - \frac{\frac{K_S}{S_0}}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \ln \left(1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) - \frac{M - N_0}{K_i Y_S \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} = \frac{\mu_m t}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \quad (5.39)$$

Правая часть уравнения (5.39) представляет собой удельную скорость роста клеточной популяции в экспоненциальной фазе. Действительно, когда величина M близка к N_0 , уравнение (5.39) трансформируется в форму

$$\ln(M/N_0) = \mu t, \quad (5.40)$$

где

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \quad (5.41)$$

Удельная скорость роста культуры в этом случае является экстремальной функцией концентрации субстрата: при более низких концентрациях субстрата удельная скорость роста культуры клеток падает; тот же процесс наблюдается при увеличении концентрации субстрата.

Чтобы выявить процесс ингибирования культуры избытком субстрата, необходимо исследовать динамику роста клеток в экспоненциальной фазе и показать соответствие уравнению (5.41).

Рассмотрим приближенное решение уравнения (5.41) в условиях справедливости разложения второго логарифмического члена этого уравнения в ряд с использованием первого линейного члена (это разложение справедливо до глубин конверсии субстрата 0,5–0,6 от начальной концентрации). Разложение этого логарифмического члена в ряд имеет вид

$$\ln \left(1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) = -\frac{M - N_0}{M_m} - \frac{1}{2} \left(\frac{M - N_0}{M_m} \right)^2 - \frac{1}{3} \left(\frac{M - N_0}{M_m} \right)^3 - \dots$$

Если $(M - N_0)/M_m \ll 1$, этот ряд быстроходящийся; для приближенного решения можно ограничиться первым членом разложения. При этом уравнение (5.39) трансформируется в

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{\frac{K_S}{S_0}}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \frac{M - N_0}{M_m} - \frac{M - N_0}{K_i Y_S \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} = \frac{\mu_m t}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} = \mu t \quad (5.42)$$

Если учесть, что $M_m/Y_S \approx S_0$, то отрицательный член уравнения (5.42) можно представить в виде

$$\frac{M - N_0}{K_i Y_S \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} = \frac{M - N_0}{K_i M_m \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} S_0.$$

Таким образом, уравнение (5.39) можно записать так:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \frac{M - N_0}{M_m} = \mu t, \quad (5.43)$$

где

$$\Phi = \frac{I}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \left[\frac{K_S}{S_0} - \frac{S_0}{K_i} \right]. \quad (5.44)$$

Следовательно, в этом уравнении удалось сгруппировать параметры Φ и μ таким образом, чтобы они легко могли быть получены исходя из линейной анаморфозы экспериментальных данных.

Уравнение (5.43) является общим уравнением роста клеточной культуры до глубин конверсии субстрата 0,5–0,6. Данное уравнение описывает как процессы неосложненного роста, так и процессы ингибирования продуктом ферментации (см. ниже) или избытком субстрата.

Параметры μ и Φ могут быть легко найдены из рассмотренной нами в предыдущем параграфе линеаризации в координатах уравнения

$$\frac{\ln \frac{M}{N_0}}{t} = \mu - \Phi \frac{M - N_0}{t M_m}$$

или разностного уравнения

$$\frac{\ln \frac{M_i}{M_j}}{t_i - t_j} = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{t_i - t_j} \frac{1}{M_m}.$$

Как видно из уравнения (5.44), параметр Φ весьма сложно зависит от начальной концентрации субстрата. Можно выделить три области этой зависимости:

1. Если $\frac{K_S}{S_0} \gg \frac{S_0}{K_i}$, то $\Phi = \frac{K_S}{K_S + S_0}$. Параметр Φ не включает

константы ингибирования и, следовательно, ингибирование избытком субстрата не обнаруживается.

2. Если $\frac{K_S}{S_0} \approx \frac{S_0}{K_i}$, то $\Phi \approx 0$. При этом определяется макси-

мальная независимость удельной скорости роста от концентрации субстрата вплоть до конверсии его на 50–60%.

3. Если $\frac{K_S}{S_0} \ll \frac{S_0}{K_i}$, то $\Phi = -\frac{S_0}{K_i + S_0}$. При этом скорость ро-

ста культуры возрастает по мере расходования субстрата; накопление продукта реакции и рост клеток опережают экспоненциальный рост.

Чтобы определить константу ингибирования, необходимо проводить исследования в последнем режиме, т.е. при $\frac{K_S}{S_0} \ll \frac{S_0}{K_i}$.

Тогда

$$-\frac{1}{\Phi} = 1 + \frac{K_i}{S_0}.$$

Данная линейная анаморфоза позволяет легко определить константу ингибирования.

В общем случае при анализе зависимости Φ от концентрации субстрата можно использовать преобразование

$$\Phi \left(1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right) = \frac{K_S}{S_0} - \frac{S_0}{K_i}. \quad (5.45)$$

Необходимо заметить, что

$$1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} = \frac{\mu_m}{\mu}.$$

Тогда соотношение (5.45) переписывается следующим образом:

$$\frac{\Phi \mu_m}{\mu S_0} = \frac{K_S}{S_0^2} - \frac{1}{K_i}.$$

Из этой анаморфозы определяются параметры K_S и K_i .

При анализе экспериментальных данных, если есть основания полагать наличие процесса ингибирования избытком субстрата, можно рекомендовать следующую процедуру. Необходимо исследовать процесс накопления клеток (продуктов реакции) в экспоненциальной фазе при различных концентрациях субстрата с определением μ описанными выше способами. Если данная зависимость имеет экстремальный характер, то это будет

свидетельствовать в пользу наличия процесса ингибирования избытком субстрата. Однако информацию о наличии процессов ингибирования избытком субстрата процесса роста клеточной популяции можно получить из одной-единственной кинетической кривой, если удастся линеаризовать экспериментальные данные в координатах уравнения (5.43) и определить параметры μ и Φ . В случае, если Φ отрицательно, можно с уверенностью утверждать, что имеет место процесс ингибирования роста клеточной популяции избытком субстрата.

Ингибирование роста клеточных популяций продуктами ферментации

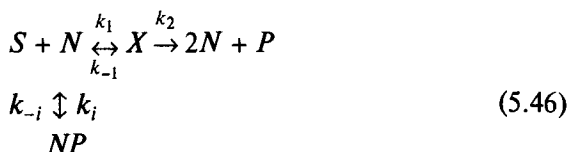
Один из наиболее часто встречающихся эффектов, приводящих к отклонению кинетики роста клеточных популяций от экспоненциальной кривой, связан с ингибированием их роста продуктами жизнедеятельности (ферментации). Накопление какого-либо продукта превращения субстрата или их совокупности способно приводить к заметному уменьшению скорости роста клеточной популяции, переходу экспоненциальной фазы роста в стадию стационарного роста и даже к полной остановке процесса.

В качестве иллюстрации можно указать, что наиболее типичным случаем ингибирования роста клеток продуктами жизнедеятельности является случай накопления в культуре органических кислот, приводящих к снижению значений рН среды культивирования. Как известно, скорость ферментативных процессов, следовательно, и скорость роста клеточных популяций чрезвычайно рН-чувствительны (см. предыдущий параграф). Если протоны, взаимодействуя с функционально значимыми компонентами клетки, блокируют клеточный рост, это означает, что они выступают в качестве ингибиторов роста.

Другим характерным примером могут быть процессы, протекающие с накоплением органических продуктов, в частности спиртов. Как правило, спиртовое брожение останавливается при накоплении определенной концентрации спиртового продукта.

Простейшая кинетическая схема ингибирования роста клеточных популяций продуктами их жизнедеятельности

Если продукт реакции P образуется на второй стадии, а процесс ингибирования заключается в обратимом взаимодействии продукта с кинетической формой N , то схему данного процесса можно представить в виде



Качественно ингибирование заключается в том, что образуется потерявший способность к делению комплекс продукта и кинетической формы NP . При развитии процесса все большая и большая доля клеток должна уводиться из реакционно-способного состояния, что должно тормозить рост культуры.

В режиме постоянства концентрации субстрата схема (5.46) описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = 2k_2X - k_1S_0N - k_iPN + k_{-i}(NP) \\ \frac{dX}{dt} = k_1S_0N - k_2X, \quad \frac{1}{k_2} \frac{dX}{dt} + X = \frac{k_1S_0N}{k_2} \\ \frac{d(NP)}{dt} = k_iPN - k_{-i}(NP) \end{cases} \quad (5.47)$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(NP)}{dt} = k_2X. \quad (5.48)$$

Если продукт P выступает в качестве быстрого обратимого ингибитора, то процесс образования комплекса активного центра фермента с продуктом может быть охарактеризован константой равновесия

$$K_i = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{PN}{(NP)}.$$

В этом режиме накопление продукта описывается уравнением

$$\frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} = k_2X; \quad (5.49)$$

где Y_p — стехиометрический коэффициент, характеризующий количество продукта на единицу биомассы.

Из этих уравнений следует важное соотношение

$$Y_p dP = dM. \quad (5.50)$$

Это означает, что продукт реакции и биомасса связаны простой линейной связью

$$Y_p (P - P_0) = M - N_0. \quad (5.51)$$

Для дальнейшего анализа воспользуемся условиями малости параметра при производной в уравнении (5.47). Если значение константы скорости k_2 достаточно велико, то членом $1/k_2 \cdot dX/dt$ можно пренебречь по сравнению с X . Тогда

$$N = \frac{k_2 X}{k_1 S_0}.$$

Следовательно,

$$M = X \left(1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} + \frac{k_2 P}{k_1 S_0 K_i} \right). \quad (5.52)$$

Если учесть, что биомасса и количество продукта связаны линейно уравнением (5.51), то

$$X = \frac{M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} \left(1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)}. \quad (5.53)$$

Подставляя выражение (5.53) в (5.48), получим следующее дифференциальное уравнение:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_2 M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} \left(1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)}.$$

Это уравнение может быть записано в виде

$$\frac{dM}{dt} = \mu_p M, \quad \mu_p = \frac{\mu_m S_0}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_i} \right) + S_0},$$

$$\text{где } \mu_m = k_2, \quad K_s = \frac{k_2}{k_1}, \quad P = \frac{M}{Y_p}. \quad (5.54)$$

Данное уравнение является дифференциальным с разделяющимися переменными. Оно легко может быть проинтегрировано:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{1}{Y_p K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_0} (M - N_0) = \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0} t. \quad (5.55)$$

Если процесс протекает достаточно глубоко, то в уравнении (5.55) можно пренебречь N_0 по сравнению с M . Тогда данное уравнение переписывается следующим образом:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{1}{Y_P K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_0} M = \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0} t . \quad (5.56)$$

Следует обратить внимание на то, что множитель, стоящий перед t в правой части этого уравнения, представляет собой удельную скорость роста клеточной популяции. Тогда

$$\begin{aligned} \ln \frac{M}{N_0} + \frac{1}{Y_P K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_0} M &= \mu t ; \\ \mu &= \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0} . \end{aligned} \quad (5.57)$$

Система может функционировать в двух принципиально разных режимах:

$$1. \ln \frac{M}{N_0} \gg \frac{\mu M}{Y_P K_i k_1 S_0} . \quad (5.58)$$

В этом случае $M(t) = \exp(\mu t)$, и процесс ингибирования продуктами жизнедеятельности клеточной культуры не сказывается на процессе ее роста. Эффекты ингибирования пренебрежимо малы.

$$2. \ln \frac{M}{N_0} \ll \frac{\mu M}{Y_P K_i k_1 S_0} . \quad (5.59)$$

Тогда $M(t) = k_1 S_0 Y_P K_i t$.

Для выявления необходимых соотношений между параметрами, регулирующими направление неравенств (5.58) и (5.59), запишем (5.58) в следующем виде:

$$\frac{M}{N_0} \gg \exp \left[\frac{\mu M}{Y_P K_i k_1 S_0} \right] . \quad (5.60)$$

Поскольку сравнивать эти функции достаточно сложно, сравним их производные в точке $M = 0$, т.к. неравенство производных в этой точке приводит к неравенству функций при произвольном значении M . Дифференцирование (5.60) и подстановка $M = 0$ приводят к соотношению

$$\frac{\mu N_0}{Y_P K_i k_1 S_0} \ll 1 . \quad (5.61)$$

Уравнение (5.61) может быть переписано как

$$\frac{k_2 N_0}{Y_P K_i (k_2 + k_1 S_0)} \ll 1 , \quad (5.62)$$

или

$$\frac{N_0}{Y_P K_i (1 + \frac{S_0}{K_S})} \ll 1. \quad (5.63)$$

Из этих неравенств следует, что экспоненциальный или линейный рост клеток определяется многими параметрами: начальным числом клеток, концентрацией субстрата, сродством клеточной культуры к субстрату. Но наибольшее значение имеет константа ингибирования. Можно утверждать, что чем меньше K_i , тем больше значение коэффициента перед линейным членом уравнения (5.57) и тем более сильно проявляются эффекты ингибирования продуктом.

Введем безразмерную переменную M/N_0 . Тогда уравнение (5.57) переписывается следующим образом:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \varphi \left(\frac{M}{N_0} - 1 \right) = \mu t; \quad \varphi = \frac{N_0 \mu}{K_i k_1 S_0 Y_P}. \quad (5.64)$$

Это уравнение может быть представлено рядом линейных модификаций:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_0} = \mu - \varphi \frac{\frac{M}{N_0} - 1}{t}; \quad (5.65)$$

$$\mu \frac{t}{\ln \frac{M}{N_0} - 1} = 1 + \varphi \frac{\frac{M}{N_0} - 1}{\ln \frac{M}{N_0}}; \quad (5.66)$$

$$\frac{\ln \frac{M}{N_0}}{\frac{M}{N_0} - 1} = \mu \frac{t}{\frac{M}{N_0} - 1} - \varphi. \quad (5.67)$$

Если наблюдается процесс ингибирования продуктом, то экспериментальные данные должны спрямляться в координатах уравнений (5.65)–(5.67).

Величина φ является безразмерным параметром, характеризующим эффекты ингибирования продуктом. Если $\varphi = 0$, то процесс ингибирования отсутствует.

Определение механизма ингибирования из вида кинетической кривой роста клеточной популяции

Желуди-то одинаковы, но когда вырастут из них молодые дубки — из одного дубка делают кафедру для ученого, другой идет на рамку для портрета любимой девушки, а из третьего дубка смастерят такую виселицу, что любо-дорого...

А. Аверченко

Как правило, кинетические исследования клеточного роста заключаются в изучении кривых роста клеточных популяций. При этом важно получить максимальную информацию из такого рода кривых. Проведенный анализ позволяя исходя из вида изменений кинетической кривой роста ответить на вопрос, имеет ли место неосложненный рост культуры или развитие клеток сопряжено с процессами ингибирования продуктами или субстратами.

Сравнение кинетических уравнений для процессов без ингибирования с уравнением для процессов с ингибированием показывает, что в рамках приближенного рассмотрения при глубинах процесса, не превышающих 0,5–0,6, кинетика роста популяции может быть формально описана одними и теми же уравнениями:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \frac{M - N_0}{M_m} = \mu t ; \quad (5.68)$$

$$\ln \frac{M}{N_0} + \phi \frac{M - N_0}{N_0} = \mu t , \quad (5.69)$$

где Φ и ϕ — параметры, отражающие механизм процесса.

Различие между данными параметрами заключается в использовании нормировочного множителя для перевода переменной $(M - N_0)$ к безразмерному виду. Если экспериментальные данные получены в условиях, когда лучше определяется максимальная плотность культуры, то использование формулы (5.68) является более правильным. Если более точно определяется начальное число клеток, то предпочтительнее формула (5.69).

В табл. 5.6. приведены параметры Φ и ϕ как функций концентрации субстрата, начального и максимального числа клеток, константы ингибирования. Как следует из таблицы, неосложненный рост, процессы ингибирования продуктом или субстратом могут быть разграничены, как только найдены Φ или ϕ . Уже на основании значения Φ можно определить условия роста популяции (рис. 5.27):

Связь параметров Φ и ϕ с кинетическими параметрами, характеризующими рост клеточной популяции

Механизм процесса	Φ	ϕ
Неосложненный рост	$\frac{K_S}{K_S + S_0}$	$\frac{N_0}{M_m} \frac{K_S}{K_S + S_0}$
Конкурентное ингибирование продуктом	$\frac{K_S}{K_S + S_0} \left(1 + \frac{Y_S S_0}{Y_P K_i} \right)$	$\frac{K_S}{K_S + S_0} \left(\frac{N_0}{M_m} + \frac{N_0}{Y_P K_i} \right)$
Неконкурентное ингибирование продуктом	$\frac{K_S}{K_S + S_0} \left[1 + \frac{Y_S S_0}{Y_P K_i} \left(1 + \frac{S_0}{K_i} \right) \right]$	$\left[1 + \frac{Y_S S_0}{Y_P K_i} \left(1 + \frac{S_0}{K_i} \right) \right] \frac{N_0}{M_m} \times \frac{K_S}{K_S + S_0}$
Ингибирование субстратом	$\frac{\frac{K_S}{S_0} - \frac{S_0}{K_i}}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}$	$\frac{\frac{K_S}{S_0} - \frac{S_0}{K_i}}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \frac{N_0}{M_m}$

1. $0 \leq \Phi \leq 1$ — неосложненный рост (нет процесса ингибирования клеточного роста продуктами жизнедеятельности).

2. $\Phi > 1$ — процесс ингибирования продуктами жизнедеятельности клеток.

3. $\Phi < 0$ — процесс ингибирования субстратом.

Таким образом, при сильном проявлении осложняющих эффектов механизм роста клеточной культуры может быть идентифицирован весьма точно.

Для определения значения Φ или ϕ необходимо воспользоваться одной из линейных анаморфоз (5.68)–(5.69). Важно отметить еще раз, что значение Φ или ϕ определяется из всех экспериментальных данных для всех условий развития процесса по одному и тому же уравнению, например из зависимости

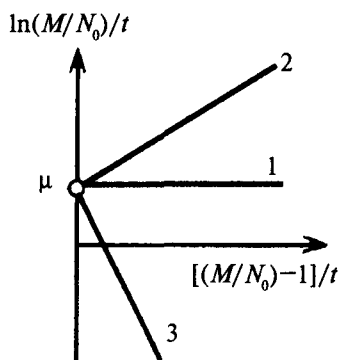


Рис. 5.27. Кривые роста клеточной популяции, построенные в координатах уравнения (5.70) для следующих случаев:

1 — неосложненный рост; 2 — ингибирование продуктом; 3 — ингибирование субстратом.

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_0} = \mu - \Phi \frac{\frac{M}{N_0} - 1}{t}. \quad (5.70)$$

Возможно также использование разностного уравнения:

$$\frac{\ln \frac{M_i}{M_j}}{t_i - t_j} = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{t_i - t_j} \frac{1}{M_m}. \quad (5.71)$$

Пример 5.7 [1]. Определить механизм ингибирования и константу ингибирования *Propionibacterium shermanii* при выращивании культуры на среде с «лимитирующим» субстратом — сульфитом натрия.

Кинетическая кривая роста этой культуры приведена на рис. 5.28. Преобразование экспериментальных данных в координатах уравнения (5.70) дает: $\mu = 0,032 \text{ ч}^{-1}$, $\Phi = -0,85$. Таким образом, присутствует процесс ингибирования роста культуры избытком субстрата.

Так как ингибирование избытком субстрата заметно, то это говорит о том, что область использованных концентраций сульфита натрия сравнима с K_i и превышает K_s . Следовательно,

$$K_i \approx S_0 \frac{1 - \Phi}{\Phi}.$$

Найденное значение $K_i = 50 \text{ мг/мл}$.

Пример 5.8 [1]. На рис. 5.29 представлены кинетические кривые роста *Methanobacterium thermoautotrophicus* и *Bacillus thuringiensis* в координатах уравнения (5.70). Дайте заключение о факторах, возможно, осложняющих рост этих популяций.

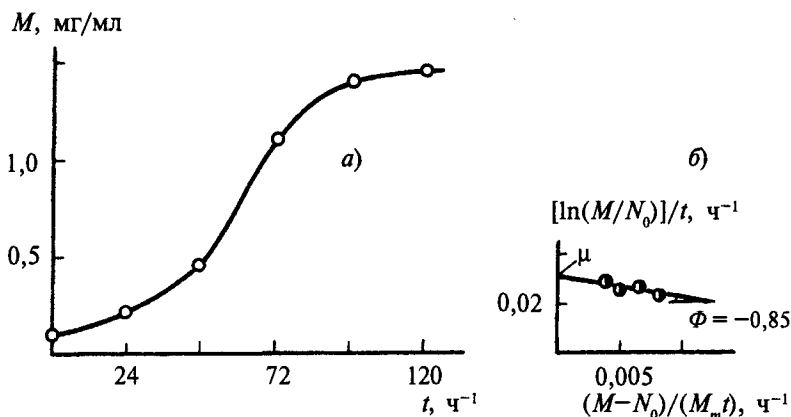


Рис. 5.28. Кинетическая кривая роста популяции *P. shermanii* в присутствии сульфита натрия (а); те же данные в координатах уравнения (5.70) (б).

При сравнении кинетических кривых роста *M.thermoautotrophicus* и *Bac. thuringiensis* (рис. 5.29) видно, что рост первой клеточной популяции осуществляется без процессов осложнения клеточного роста ($0 < \Phi < 1$), а рост второй популяции характеризуется сильным ингибированием продуктом ($\Phi > 1$).

Возможен и более глубокий анализ экспериментальных данных. Например, теоретически можно отличить конкурентное ингибирование от неконкурентного и определить параметры ингибирования. При этом следует иметь в виду, что с усложнением методов анализа экспериментальных данных должна возрастать точность их получения.

Однако обычно в кинетических экспериментах по изучению закономерностей клеточного роста точность экспериментальных данных недостаточна для их углубленного анализа. Тем не менее интересно рассмотреть принципиальные возможности метода.

Чтобы выявить тип ингибирования продуктом реакции, необходимо изучение закономерностей развития клеточных популяций в широком диапазоне концентраций субстрата при нескольких его концентрациях. При этом для определения механизма ингибирования предлагается следующая процедура. Из анализа кинетической кривой определяют параметры μ и Φ . На их основе вычисляются параметры μ_m и K_S (см. § 5.2). Для каждой концентрации субстрата вычисляется функция $K_S/(K_S + S_0)$. Исходя из данных табл. 5.6, можно записать

$$\Phi \frac{K_S + S_0}{K_S} = 1 \quad \text{— неосложненный рост;}$$

$$\Phi \frac{K_S + S_0}{K_S} = 1 + \frac{Y_S S_0}{Y_P K_i} \quad \text{— конкурентное ингибирование;}$$

$$\Phi \frac{K_S + S_0}{K_S} = 1 + \frac{Y_S S_0}{Y_P K_i} \left(1 + \frac{S_0}{K_S} \right) \quad \text{— неконкурентное ингибирование.}$$

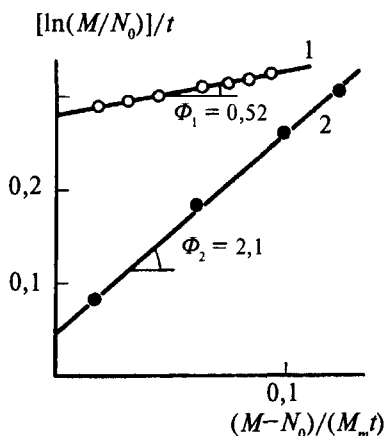


Рис. 5.29. Кинетические кривые роста *M.thermoautotrophicus* (1) и *Bac. thuringiensis* (2) в координатах уравнения (5.70).

Видно, что указанные механизмы могут быть дискриминированы исходя из вида правых частей приведенных уравнений. Если наблюдается линейная зависимость левой части уравнения от правой с тангенсом угла наклона равным единице, то имеет место неосложненный рост. Если наблюдается линейная зависимость с тангенсом угла наклона, превышающим единицу, то имеет место процесс конкурентного ингибирования продуктом. Если наблюдается квадратичная зависимость, то имеет место неконкурентное ингибирование.

Таким образом, кинетический анализ позволяет интерпретировать достаточно сложные кривые роста клеточных популяций и определять количественные характеристики процесса. Появляется общий подход к анализу клеточных популяций. Важно подчеркнуть, что наличие ингибирования и его механизм можно определить по одной единственной кинетической кривой роста популяции. Для этого необходимо определить параметр Φ , используя экспериментальные данные, полученные конверсии субстрата до 50–60%. Данный параметр может быть найден исходя из уравнений (5.68) или (5.71). Вычислив его и используя данные табл. 5.5, можно определить механизм протекания процесса.

Идентификация процесса дает исследователю или практику мощный механизм управления ростом клеточной популяции. Если развитие процесса протекает в условиях неусложненного роста, то интенсифицировать процесс роста клеток можно путем увеличения концентрации субстрата. Если присутствует процесс ингибирования избытком субстрата, то можно подобрать условия, оптимальные для протекания процесса роста клеточной популяции с максимальной скоростью. Если обнаружено ингибирование продуктами ферментации, то скорость роста клеток можно повысить, выводя продукты их жизнедеятельности из инкубационной среды.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите простейшие кинетические схемы ингибирования роста популяции избытком субстрата и продукта. 2. Как механизм ингибирования избытком субстрата объясняет феномен роста ряда популяций в узком диапазоне концентраций субстрата? Приведите кинетические уравнения роста популяции в условиях ингибирования их роста избытком субстрата. 3. Запишите уравнения роста клеточной культуры при глубине конверсии субстрата до 0,5–0,6 для неосложненного роста, для случая ингибирования избытком субстрата, ингибирования продуктами жизнедеятельности клеток. 4. Приведите основные уравнения разностного метода. 5. Перечислите основные методы анализа кинетических кривых роста клеточных популя-

ций в условиях осложнения процесса клеточного роста ингибированием избытком субстрата или продуктами ферментации. Как определяются кинетические параметры в этих случаях?

5.5. Периоды индукции на кинетических кривых роста

Что применимо к *E.coli*,
применимо и к слону.

Ж. Моно

Часто наблюдаемые периоды индукции (лаг-фаза) на кинетических кривых роста клеточных популяций могут иметь различную природу. Можно представить по крайней мере три механизма, которые приводят к появлению на кинетической кривой роста популяции периода, в течение которого не происходит увеличения числа клеток или заметного образования продуктов реакции. Следует подчеркнуть, что период индукции трудно обнаружить из зависимости числа клеток или количества продуктов от времени при прямом наблюдении за этими параметрами, поскольку логарифмический рост культуры приводит к появлению кажущейся лаг-фазы. Период индукции τ определяется при анализе экспоненциальной фазы роста в полулогарифмических координатах из зависимости $\ln(N/N_0)$ от t как отрезок, отсекаемый на оси абсцисс при $\ln(N/N_0) = 0$.

Период индукции может отражать следующие процессы.

1. *Неспецифическую, неферментативную трансформацию исходного субстрата в продукт*, приемлемый для дальнейшего метаболизма клеточной популяции:



Вещество $\bar{S}$ не используется клеткой в силу его химической природы или физического состояния. Процесс перехода вещества $\bar{S}$ в субстрат S характеризуется константой скорости k_0 и может представлять собой химическое превращение вещества или его физическую трансформацию (например, переход из одной фазы в другую).

2. *Адаптационные процессы в клетке*, в первую очередь синтез необходимого фермента или ферментной системы:



Состояние клеток $\bar{N}$ характеризуется отсутствием необходи-

мой ферментной системы и неспособностью клетки усваивать тот или иной субстрат и вступать в процесс деления (автоумножения биокаталитической системы). Образовавшаяся в результате адаптационного процесса клетка в состоянии N способна к автокаталитическому росту:

$$N \rightarrow 2N.$$

3. *Присутствие в культурной среде ингибитора роста*, блокирующего развитие популяции. С течением времени концентрация ингибитора I может падать в результате его расхода или вывода из системы:

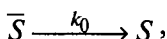


В качестве типичного примера данного механизма, вызывающего период индукции, можно привести влияние кислорода на рост анаэробных организмов. В присутствии заметных количеств кислорода рост популяции блокирован, однако за счет процессов восстановления кислорода или вытеснения его в газовую фазу система «избавляется» от сильного ингибитора, и начинается рост клеточной популяции.

Три обсуждаемых механизма, приводящих к возникновению периода индукции, могут быть идентифицированы путем кинетического эксперимента и последующего анализа экспериментальных данных.

Трансформация пресубстрата в субстрат

В случае, если накопление субстрата в системе идет в соответствии со схемой (5.72)



кинетику его роста описывает уравнение

$$\frac{dS}{dt} = k_0 \bar{S},$$

решение которого записывается следующим образом:

$$S = S_0 [1 - \exp(-k_0 t)]$$

где S_0 — начальная введенная в систему концентрация вещества $\bar{S}$.

Можно показать, что

$$\ln \frac{N}{N_0} = \frac{\mu_m t}{a} + \frac{\mu_m}{k_0} \frac{1-a}{a} \ln \frac{a}{a-1}, \quad (5.75)$$

где $a = 1 + K_s/S_0$.

Как следует из уравнения (5.75), в координатах $[\ln(N/N_0), t]$ тангенс угла наклона, который представляет собой удельную скорость роста клеток, $\mu_m/a = \mu$. В точке $\ln(N/N_0) = 0$, где $t = \tau$, имеем

$$\frac{\mu_m}{a} t = -\frac{\mu_m}{k_0} \frac{1-a}{a} \ln \frac{a}{1-a}.$$

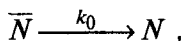
Таким образом, на кинетической кривой роста культуры в случае наличия процесса кинетической стадии трансформации исходного вещества в приемлемый метаболит должен наблюдаться период индукции. Протяженность периода индукции связана с начальной концентрацией пресубстрата соотношением

$$\tau_S = \frac{K_S}{S_0 k_0} \ln \left(1 + \frac{S_0}{K_S} \right).$$

Из данного уравнения следует важная особенность кинетики процесса, включающего стадию трансформации пресубстрата: высокие концентрации пресубстрата могут полностью элиминировать период индукции.

Адаптационный процесс

Если период индукции связан с каталитической адаптацией организма к новым условиям

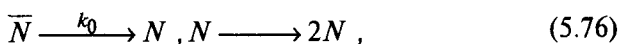


то популяция введенных в систему клеток будет состоять из двух видов:

$$M = N + \bar{N},$$

где клетки типа $\bar{N}$ не адаптированы к новым условиям (не произошел синтез необходимых ферментов); клетки типа N — адаптированные клетки, способные к активному процессу деления.

Полная кинетическая схема для обсуждаемого случая имеет следующий вид:



где k_0 — константа скорости адаптационного процесса.

Систему уравнений, описывающих кинетику роста, можно представить в следующем виде:

$$-\frac{d\bar{N}}{dt} = k_0 \bar{N}; \quad \frac{dN}{dt} = k_0 \bar{N} + \mu N.$$

Чтобы определить в системе рост общего числа клеток, необходимо рассчитать динамику изменения количества (концентраций) клеток типа $\bar{N}$ и N и выяснить динамику изменения общего числа клеток. Можно показать, что

$$\bar{N} = N_0 \exp(-k_0 t),$$

где N_0 — начальная концентрация клеток.

Тогда

$$\frac{dN}{dt} - \mu N = k_0 N_0 \exp(-k_0 t).$$

Можно показать, что

$$M = \frac{k_0 N_0}{k_0 + \mu} \exp(\mu t) + \frac{N_0 \mu}{k_0 + \mu} \exp(-k_0 t). \quad (5.77)$$

Из уравнения (5.77) видно, что при $t = 0$, $M = N_0$, при больших t данное уравнение трансформируется в обычное уравнение экспоненциального роста. Преобразуем уравнение (5.77) в форму, удобную для анализа в полулогарифмических координатах:

$$\ln \frac{M}{N_0} = \mu t + \ln \left\{ \frac{k_0}{k_0 + \mu} \left[1 + \frac{\mu}{k_0} \exp[-(k_0 + \mu)t] \right] \right\}.$$

Следовательно, при больших временах протекания процесса данная зависимость вырождается в линейную функцию:

$$\ln \frac{M}{N_0} = \mu t + \ln \frac{k_0}{k_0 + \mu}.$$

Тангенс угла наклона полученной зависимости равен удельной скорости роста клеток; отрезок, отсекаемый прямой на оси времени (период индукции), имеет вид

$$\tau_a = \frac{1}{\mu_m} \ln \left(1 + \frac{\mu_m}{k_0} \right).$$

Таким образом, в случае адаптационного процесса период индукции не зависит от концентрации субстрата и определяется свойствами клеточной культуры.

Расходуемый ингибитор роста

Рассмотрим кинетику процесса в условиях присутствия сильно-го ингибитора, расходуемого в независимом от роста культуры процессе. Предполагается, что ингибитор, равновесно взаимодействуя с ключевой ферментной системой, предотвращает рост культуры:

$$I + N \xleftrightarrow{K_i} NI. \quad (5.78)$$

При этом комплекс NI не активен в автокаталитическом процессе роста. Концентрация ингибитора в системе в соответствии со схемой (5.78) может быть описана дифференциальным уравнением

$$\frac{dI}{dt} = -k_0 I,$$

и как функция времени будет иметь вид

$$I = I_0 \exp(-k_0 t),$$

где I_0 — концентрация ингибитора в начальный момент времени.

Дифференциальное уравнение для скорости роста культуры в условиях, при которых часть клеток будет находиться в неактивном комплексе NI , можно записать в форме

$$\frac{dN}{dt} = \mu(N - NI).$$

Концентрация клеток в инактивированном состоянии будет задана функцией

$$NI = N \frac{I}{K_i} \exp(-k_0 t).$$

Тогда

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{I_0}{K_i} \exp(-k_0 t) \right). \quad (5.79)$$

Экспоненциальный член, входящий в уравнение (5.79), уменьшается при времени, превышающем $1/k_0$, и становится пренебрежимо мал по сравнению с единицей. В этом случае зависимость $\ln(N/N_0)$ представляет собой линейную функцию от времени:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t - \frac{\mu I_0}{k_0 K_i}.$$

Тангенс угла наклона этой зависимости представляет собой удельную скорость роста культуры; отрезок, отсекаемый на оси времени, период индукции, равный

$$\tau_i = \frac{I_0}{K_i} \frac{1}{k_i}.$$

В этом случае период индукции на кинетической кривой роста культуры не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста клеточной популяции, а определяется только концентрацией ингибитора.

Дискриминация механизмов и определение кинетических параметров

Проведенный выше анализ показывает, что три обсуждаемых механизма появления на кинетических кривых роста периода ин-

дукции описываются различными уравнениями, которые могут быть сопоставлены с экспериментальными данными.

Несложно показать участие или отсутствие в механизме процесса ингибитора, блокирующего развитие культуры. Если экспериментально найденный при различных концентрациях субстрата период индукции не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста культуры, то, вероятно, период индукции связан с действием расходуемого ингибитора. Доказательством этого можно считать обнаружение линейной зависимости между концентрацией введенного в систему ингибитора и периодом индукции.

Из рис. 5.30 видно, что кинетические кривые роста в экспоненциальной фазе не зависят от концентрации субстрата (это указывает на механизм с расходуемым ингибитором роста). В двух других случаях (рис. 5.30а, б) наблюдается ярко выраженная зависимость t от концентрации субстрата, при этом предельно большой период индукции, реализуемый при малых концентрациях субстрата, соответствует обратному значению константы

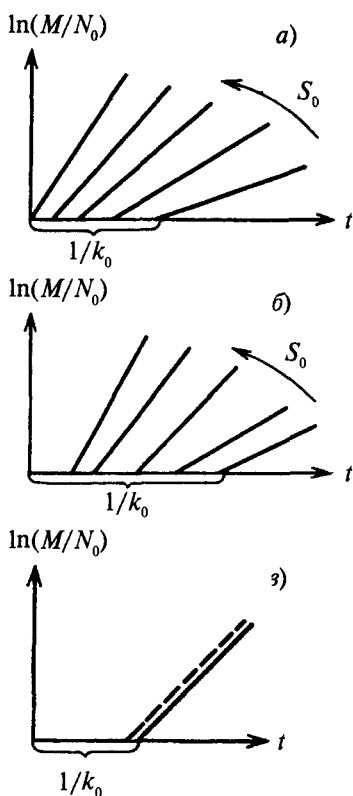


Рис. 5.30. Кинетические кривые роста клеточных популяций в экспоненциальной фазе для различных механизмов роста.

a — конверсия пресубстрата в субстрат, *б* — адаптационный рост, *в* — расходуемый ингибитор роста.

скорости конверсии пресубстрата в субстрат (см. рис. 5.30а) или адаптационного процесса (см. рис. 5.30б). Для механизма с конверсией пресубстрата в субстрат период индукции элиминируется высокими концентрациями субстрата. При адаптационном процессе, даже при очень высоких концентрациях субстрата, может детектироваться остаточный предельный период индукции.

В этом случае период индукции на кинетической кривой роста культуры не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста клеточной популяции, а определяется только концентрацией ингибитора.

Два последних механизма можно дискриминировать на основании изучения зависимости периода индукции от начальной концентрации субстрата или удельной скорости роста. При $S_0 \rightarrow 0$ величина S_0/K_s становится много меньше единицы, а

$$\lim_{S_0 \rightarrow 0} \tau_S = 1 / k_0 ,$$

$$\lim_{S_0 \rightarrow 0} \tau_a = 1 / k_0 .$$

Эта зависимость позволяет определить параметр k_0 :

$$k_0 = 1 / \lim_{S_0 \rightarrow 0} \tau_{a,S} .$$

Однако при больших концентрациях субстрата зависимости периода индукции от начальной концентрации субстрата существенно различаются:

$$\lim_{S_0 \rightarrow \infty} \tau_S = 0 ; \quad \lim_{S_0 \rightarrow \infty} \tau_a = \frac{\ln \left(1 + \frac{\mu_m}{k_0} \right)}{\mu_m} > 0 ,$$

т.е. в случае адаптационного механизма период индукции не снимается высокими концентрациями субстрата.

На рис. 5.31 приведена зависимость периода индукции от концентрации субстрата для всех обсуждаемых механизмов процесса. Аналогично выглядят зависимости периода индукции от удельной скорости роста популяции. Зависимости периода индукции для механизмов (5.72) и (5.73) от экспериментально найденной удельной скорости роста имеют вид

$$\tau_S = - \frac{\mu_m - \mu}{k_0 \mu} \ln \frac{\mu_m - \mu}{\mu} ;$$

$$\tau_a = \frac{1}{\mu} \ln \left(1 + \frac{\mu}{k_0} \right) .$$

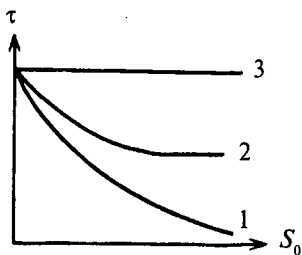


Рис. 5.31. Зависимость периода индукции от концентрации субстрата для различных механизмов.

1 — конверсия пресубстрата в субстрат, 2 — адаптационный процесс, 3 — расходуемый ингибитор роста.

Аналогично

$$\lim_{m \rightarrow 0} \tau_{S,a} = 1 / k_0 .$$

Параметр k_0 может быть вычислен. Для механизма с участием стадии конверсии пресубстрата

$$k_0 = \frac{\mu_m - \mu}{\tau_S \mu} \ln \frac{\mu_m}{\mu_m - \mu} .$$

При найденном значении μ_m и вычислении переменной $\rho = (1 - \mu_m / \mu) \times \ln(1 - \mu_m / \mu)$ в случае справедливости этого механизма должно наблюдаться постоянство μ_m / τ при вариации удельной скорости роста культуры. Эта постоянная равна константе скорости

конверсии пресубстрата в субстрат.

В случае механизма (5.73) должно выполняться соотношение $\exp(\mu \tau_a) = 1 + \mu / k_0$, т.е. должна наблюдаться проходящая через единицу линейная зависимость между переменными $\exp(\mu \tau_a)$ и μ . Тангенс угла наклона этой зависимости дает значение $1/k_0$.

Пример 5.9 [1]. Определить природу наблюдаемых лаг-периодов, представленных на рис. 5.32 отрезками, отсекаемыми на оси абсцисс.

Так как периоды индукции для Fe^{++} и Fe^{+++} зависят от концентрации иона железа и уменьшаются с ростом его концентрации, то можно исключить из рассмотрения механизм с расходуемым ингибитором роста (см. рис. 5.30). В случае Fe^{++} лаг-период с увеличением концентрации субстрата уменьшается и стремится к постоянному значению (≈ 16 ч) (см. рис. 5.32а), что свидетельствует об адаптационном механизме природы τ . Для Fe^{+++} ситуация сложнее. С одной стороны, увеличение концентрации Fe^{+++} приводит к уменьшению τ , который не стремится к постоянному значению (см. рис. 5.32б), что говорит в пользу механизма с конверсией пресубстрата. В данном случае, по-видимому, осуществляется переход $\text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{Fe}^{++}$. С другой стороны, даже при относительно больших концентрациях Fe^{+++} лаг-период не снимается. Это говорит о том, что природа τ в данном случае смешанная. Наряду с механизмом конверсии пресубстрата $\text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{Fe}^{++}$ существенную роль играет механизм, связанный с адаптационными процессами в клетке. Кинетику этих процессов иллюстрирует рис. 5.32а, где отчетливо виден придел уменьшения периода индукции τ .

Определим некоторые параметры. Как видно из рис. 5.32а, $\lim_{S_0 \rightarrow \infty} t_a = 16$ ч. Данные, приведенные на рис. 5.32, дают значение $\mu_m = 0,1 \text{ ч}^{-1}$, следовательно, $k_0 = 0,0025 \text{ ч}^{-1}$.

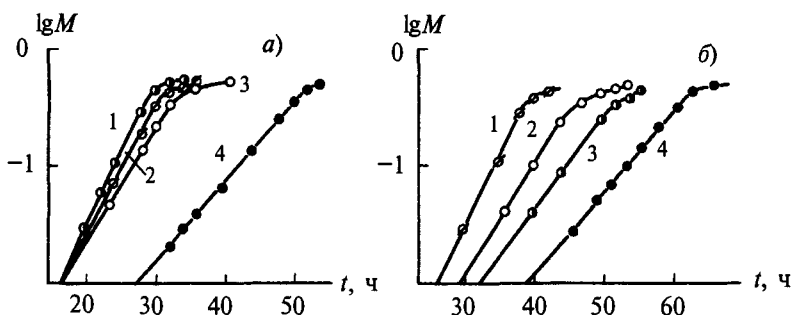


Рис. 5.32. Кривые роста *Pseudomonas aeruginosa* (г/л) на среде с хинолином при различных концентрациях ионов железа:

a — Fe^{++} ; *б* — Fe^{+++} . Концентрация ионов железа: 1 — 134; 2 — 72; 3 — 36; 4 — $18 \text{ M} \cdot 10^{-6}$.

Пример 5.10 [1]. Определить механизм ингибирования кислородом культуры *Thermoanaerobium lactoethylicum* (рис. 5.33).

Как отмечалось выше, типичным примером проявления механизма с расходуемым ингибитором роста является влияние молекулярного кислорода на развитие анаэробных бактерий (см. рис. 5.33*a*). Видно, что лаг-период практически не зависит от концентрации глюкозы как лимитирующего субстрата. Сопоставление этих экспериментальных результатов с теоретическими (см. рис. 5.30) указывает на то, что в данном случае наиболее вероятен механизм, согласно которому в течение лаг-фазы кислород как ингибитор расходуется в процессе развития популяции (поглощается как окислитель или вытесняется из среды образующимся водородом). Доказа-

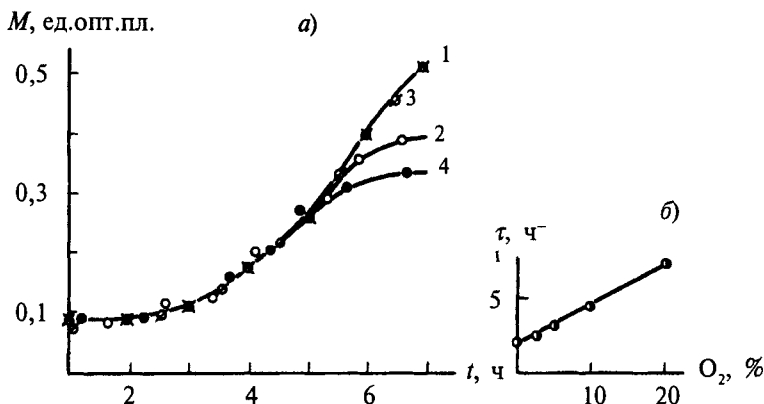


Рис. 5.33. Кинетические кривые роста *T. lactoethylicum* при различных концентрациях глюкозы (*a*) и зависимость величины периода индукции от концентрации кислорода (*б*). Концентрация глюкозы, мМ.

1 — 2,8 мМ; 2 — 5,5; 3 — 13,9; 4 — 27,8.

тельством тому служит линейная зависимость периода индукции от начальной концентрации кислорода в культурной среде (рис. 5.33б). Из тангенса угла наклона этой прямой получаем произведение K_i/k_0 , равное 3,6 (%·ч⁻¹). Отрезок, отсекаемый на оси ординат, по-видимому, соответствует значению адаптационного лаг-периода (~ 2 ч).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение лаг-фазы. 2. Какие основные механизмы могут приводить к появлению лаг-фазы на кинетической кривой роста клеток? 3. Напишите основные уравнения, описывающие лаг-фазу. 4. Какова методика дискриминации механизмов, приводящих к появлению лаг-фазы? 5. Приведите примеры роста клеточных популяций с лаг-фазой. 6. Каков биологический смысл лаг-фазы? 7. Какие факторы и при каких условиях могут изменить длительность лаг-фазы?

5.6. Остановка роста, апоптоз и гибель клеток

Никто не может определить, что такое жизнь,
но каждый отличит живую лошадь от мертвой.

Научный фольклор

В развитии любой клеточной популяции наступает период остановки клеточного роста и гибели клеток. Очевидно, что остановка роста и гибель клеток имеют не меньшее значение, чем их размножение и рост. Особенно эти процессы важны для многоклеточных организмов. Неудержимый и неконтролируемый рост отдельных клеток — причина онкологических заболеваний, остановка роста, старение и гибель клеток — причина старения и смерти организма в целом.

Различные популяции и различные клетки ведут себя совершенно по-разному. Бактериальные клетки и клетки одноклеточных организмов внешне представляются «бессмертными». При попадании в подходящую комфортную среду с избытком лимитирующего субстрата клетки начинают активно размножаться. Ограничение их роста определяется расходом субстрата, накоплением продуктов-ингибиторов, а также специфическим механизмом ограничения роста, который мы назвали «прогрессирующая некомпетентность».

Клетки многоклеточных организмов ведут себя совершенно по-другому. Дифференцированные клетки составляют органы и ткани, и их рост и размножение принципиально ограничены. Если механизм контроля роста разрушается, возникают индиви-

дуальные клетки, растущие неограниченно. Эти клетки составляют популяцию раковых клеток, их рост приводит к гибели организма в целом.

История изучения процессов клеточной гибели

На гумусе моем вы можете построить
светлый храм науки.

Л. Ерохина

Исследование проблемы старения «нормальных» клеток многоклеточных организмов имеет весьма интересную историю. Впервые мысль о том, что нормальные соматические клетки животных и человека детерминированно должны терять способность к делению и гибнуть, была высказана великим немецким биологом Августом Вейсманом в 1881 г. Эта мысль не казалась очевидной. Приблизительно в это же время исследователи научились переводить клетки животных и человека в культуру, т.е. культивировать их *in vitro* при подборе соответствующих сред. В начале века известный хирург, один из основателей техники культивирования клеток *in vitro*, лауреат Нобелевской премии Алексис Каррель поставил эксперимент, который продолжался 34 года. В течение этого срока он культивировал клетки фибробластов, полученных из сердца цыпленка. Опыт был остановлен, потому что автор был уверен, что клетки можно культивировать вечно. Эти результаты убедительно демонстрировали, что старение не является отражением процессов, проходящих на клеточном уровне.

Этот вывод оказался ошибочным. «Бессмертными» являются лишь перерожденные, так называемые трансформированные клетки, потерявшие контроль роста и превратившиеся в раковые. Лишь в 1961 г. Л. Хейфлик, вернувшись к опытам А. Карреля, показал, что нормальные, не «трансформированные» фибробласты человека способны провести около 50 делений и полностью прекратить размножение. Ошибочность выводов А. Карреля была основана на том, что при культивировании клеток в качестве ростовой среды добавлялась композиция, содержащая, по-видимому, начальные «молодые» клетки фибробластов. Опыты Хейфлика были многократно повторены. В настоящее время нет сомнений, что нормальные соматические клетки обладают ограниченным репликационным потенциалом.

Для определения совокупности процессов «программируемого» старения и гибели клеток был предложен термин «апоптоз» — по гречески «листопад». Апоптоз следует отличать от некроза — гибели клеток за счет случайных событий или под действием внешних токсинов. Современный интерес к апоптозу очень велик, он определяется осознанием важной роли апоптоза в поведении клеточных популяций, при этом его роль не меньше, чем роль процессов роста и размножения клеток.

Концепция «программируемой» клеточной смерти существовала очень долго, однако лишь в 1972 г. после работы Керра, Вилли и Куррье [Kerr J.R.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Br.J.Cancer 26, 239–257], в которой было показано, что любые многие «программируемой» и «непрог-

раммируемой» клеточной гибели совершенно близки, интерес к апоптозу сильно возрос. После того как была показана роль в апоптозе процессов деградации ДНК и во многих случаях необходимый синтез de novo РНК и специфических белков, апоптоз стал предметом биохимии и молекулярной биологии.

Ограничения роста соматических клеток в культуре.

Апоптоз, теломеры и теломераза

Молекулярная природа апоптоза весьма разнообразна. Апоптоз изучают по морфологическим изменениям клеток, по индукции, активности и появлению продуктов транслугминазы, «сшивающей» белки, по фрагментации ДНК, по изменению потоков кальция, по появлению на мембране фосфатидилсерина.

Наиболее распространенная в настоящее время концепция «программируемого» старения основана на представлении о теломере. Дело в том, что ДНК полимеразы не способны реплицировать «хвосты» 3' конца матрицы ДНК — несколько нуклеотидов на 3' конце. Многократная репликация ДНК в процессе размножения клеток в этом случае должна приводить к укорачиванию считываемой области. Это укорачивание и может быть причиной старения и падения репликационного потенциала, ухудшения функционирования хромосом. Для предотвращения этого процесса специфический фермент теломераза синтезирует на концах ядерной ДНК многократно повторяемый гексануклеотид ТTAGGG, образующий протяженный участок ДНК, называемый теломерой. Фермент теломераза был предсказан в 1971 г. А. Оловниковым и открыт в 1985 г. Грейдером и Блэкберном.

Для преодоления укорачивания генома и старения согласно этим представлениям клетка должна активировать теломеразный ген и экспрессировать большее количество теломеразы. Ниже, не вдаваясь в подробности молекулярно-биологического анализа апоптоза, рассмотрим несколько кинетических моделей старения, остановки роста и гибели клеток на индивидуальном и популяционном уровне.

Зависимость скорости роста от концентрации

лимитирующего субстрата и параметров клеточного цикла.

Старение клетки в процессе роста

Методология построения кинетических уравнений клеточного роста может быть основана на расчете исходя из химико-кинетических представлений времени удвоения клеточного материала в предположении, что это время определяется какими-то лим-

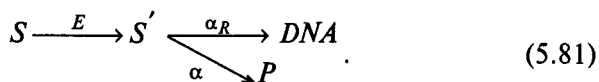
тирующими биохимическими процессами. При условии, что это время удастся рассчитать, рост популяции в экспоненциальной фазе будет описываться уравнением

$$M = M_0 2^{\tau}, \quad (5.80)$$

где τ — характеристическое время клеточного цикла; M_0 — начальная концентрация клеток.

Это достаточно общий и широкий подход, позволяющий проанализировать кинетику роста любой клеточной популяции, если имеется возможность количественного определения τ . Очевидно, что время удвоения будет зависеть от механизма процесса и скорости отдельных его стадий. Рассмотрим механизм деления клетки, предполагая, что действие фермента (или ферментной системы), трансформирующего лимитирующий субстрат, и процесс репликации ДНК являются самыми медленными стадиями. Такая ситуация часто реализуется для активно растущих клеточных популяций, постоянно находящихся в процессе деления.

Проанализируем простейшую кинетическую схему:



На первой стадии процесса происходит трансформация исходного лимитирующего субстрата под действием фермента (или ферментной системы) E с образованием ключевого метаболита S' . Этот процесс представляет собой обычную ферментативную реакцию, и кинетика его описывается «классическим» уравнением Михаэлиса-Ментен. Ключевой метаболит S' участвует в процессе репликации и в других параллельных процессах, приводящих к накоплению клеточного материала P . Предположим, что скорость синтеза ДНК на матрице ДНК пропорциональна концентрации промежуточного метаболита S' и может быть охарактеризована константой скорости α_R . По физическому смыслу это может быть константа скорости удлинения полимерной цепи на одно основание. Важным также представляется предположение о том, что скорость биосинтеза фермента E и белков репликационного комплекса — относительно быстрые процессы, концентрации этих компонентов постоянны и не входят в уравнения скорости процесса. Любое из этих предположений может быть неоправданно, что существенно изменит кинетическое описание, однако это не затрагивает принципы излагаемого метода.

Кинетику процесса в рамках кинетической схемы (5.81) описывает система уравнений

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \alpha_R S'; \quad \frac{dS'}{dt} = \frac{k_{\text{кам}}}{K_S + S} E \times S - (\alpha_R + \alpha) S', \quad (5.82)$$

где ΔDNA — прирост ДНК на исходной матрице.

В условиях стационарности по промежуточному метаболиту ($dS'/dt = 0$) имеем

$$S' = \frac{1}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{\text{кам}}}{K_S + S} E \times S.$$

Соответственно

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{\text{кам}}}{K_S + S} E \times S.$$

На начальном этапе процесса в режиме $S = S_0$ уравнение может быть проинтегрировано:

$$\Delta DNA(t) = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{\text{кам}} E \times S_0}{K_S + S_0} t \quad (5.83)$$

(при этом использовано начальное условие $t = 0, \Delta DNA = 0$).

Репликационный процесс заканчивается, когда количество синтезированной ДНК соответствует количеству базовой, т.е. $\Delta DNA = B$, где B — количество базовой ДНК. Величина B может быть охарактеризована различным образом. Например, если скорость процессов в клетке выражается в ед. моль/с на клетку, то B может быть выражено в ед. моль оснований ДНК на клетку.

При $t = \tau_R, \Delta DNA = B$ имеем

$$B = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{\text{кам}} E \times S_0}{K_S + S_0} t_R$$

или

$$\tau_R = \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_S + S_0}{k_{\text{кам}} E \times S_0} B. \quad (5.84)$$

Таким образом, найдено время, необходимое для удвоения ДНК. Видно, что оно зависит от концентрации субстрата обратно пропорционально активности лимитирующего фермента. Динамика изменения числа клеток в популяции с учетом уравнения (5.84) определяется соотношением

$$M(t) = M_0 2^{\left[\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_S + S_0}{k_{\text{кам}} E \times S_0} B \right] t},$$

т.е. удельная скорость роста культуры будет иметь вид

$$\mu = \frac{\ln 2}{\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_S + S_0}{k_{\text{кам}} E S_0} B + \tau_a}. \quad (5.85)$$

Уравнение (5.85) отражает принципиальную особенность кинетики клеточного роста — зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата. При «насыщающих» концентрациях субстрата имеем максимальную удельную скорость

$$\mu_m = \frac{\ln 2}{\tau_R} = \frac{\alpha_R \ln 2}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{\text{кам}} E}{B}. \quad (5.86)$$

Из уравнения (5.86) видно, что основными факторами, приводящими к существенному уменьшению μ_m по сравнению с $k_{\text{кам}}$, являются распределение потоков ключевого метаболита $\alpha_R/(\alpha_R + \alpha)$ может быть существенно меньше единицы, если $\alpha/\alpha_R \gg 1$, т.е. если на репликационный процесс приходится небольшая доля вещества] и малое количество в клетке лимитирующего фермента. Величина K_S должна соответствовать константе Михаэлиса лимитирующего фермента.

Рассмотренный подход и полученное уравнение (5.85) соответствуют самому простому случаю — линейному развитию во времени репликационного процесса, при этом предполагалось, что репликационная фаза (S-фаза, см. рис. 5.1) является самой медленной.

Многостадийность клеточного цикла

Наиболее общий случай развития клетки включает ряд фаз, в которых не происходит репликационного процесса и клеточного деления. В кинетике роста каждой индивидуальной клетки могут иметь место периоды индукции, предшествующие репликации или следующие за ней. Это вносит определенные изменения в кинетику процесса.

Время удвоения клетки в этом случае определяется уравнением

$$\tau = \tau_R + \tau_a, \quad (5.87)$$

где τ_R — время репликации, представленное уравнением (5.84), τ_a — время нахождения клетки в других фазах клеточного цикла.

Учитывая уравнение (5.84), найдем

$$\tau = \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_S + S_0}{k_{\text{кам}} E S_0} B + \tau_a \quad (5.88)$$

или

$$\mu = \frac{\ln 2}{\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_S + S_0}{k_{\text{кам}} E S_0} B + \tau_a} \quad (5.89)$$

Уравнение (5.89) можно преобразовать к виду

$$\mu = \frac{\frac{\ln 2 k_{\text{кам}} E S_0}{\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} B + \tau_a k_{\text{кам}} E}}{\frac{K_S}{1 + \frac{\tau_a k_{\text{кам}} E \alpha_R}{(\alpha + \alpha_R) B}} + S_0} \quad (5.90)$$

из которого следуют выражения для кинетических параметров уравнения Моно:

$$\mu_m = \frac{\ln 2 k_{\text{кам}} E}{\left(1 + \frac{\alpha}{\alpha_R}\right) B + \tau_a k_{\text{кам}} E} \quad (5.91)$$

$$K_{\text{набл}} = \frac{K_S}{1 + \frac{\tau_a k_{\text{кам}} E \alpha_R}{(\alpha + \alpha_R) B}} \quad (5.92)$$

где K_S — константа сродства субстрата к клетке.

Уравнения (5.89) и (5.90) «вырождаются» в более простую зависимость вида (5.85) при условии

$$\tau_a k_{\text{кам}} E \ll B[1 + (\alpha/\alpha_R)] \quad (5.93)$$

или

$$\tau_a \ll \frac{(\alpha + \alpha_R) B}{\alpha_R k_{\text{кам}} E} \quad (5.94)$$

Это неравенство справедливо при относительно небольших периодах τ_a , т.е. если периоды времени, предшествующие репликационному процессу или следующие за ним, относительно малы. Видно, что неравенство (5.94) выполняется более отчетливо при больших содержаниях ДНК (B) и малых значениях активности лимитирующего фермента ($k_{\text{кам}} E$). При этих условиях деление клетки лимитируется репликационным процессом.

Можно представить и обратную ситуацию, когда $\tau_a k_{\text{кам}} E \gg B[1 + (\alpha/\alpha_R)]$. Как видно из уравнений (5.91) и (5.92),

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau_a}; \quad (5.95)$$

$$K_{\text{Набл}} = \frac{K_S B(\alpha_R + \alpha)}{\alpha_R \tau_a k_{\text{кат}} E}. \quad (5.96)$$

Максимальная удельная скорость роста гиперболически зависит от концентрации лимитирующего фермента, и в пределе лимитирующей стадией становится процесс, характеризуемый переменным параметром τ_a . При этом режиме клетка большую часть времени находится в состоянии покоя, а процесс деления протекает относительно быстро.

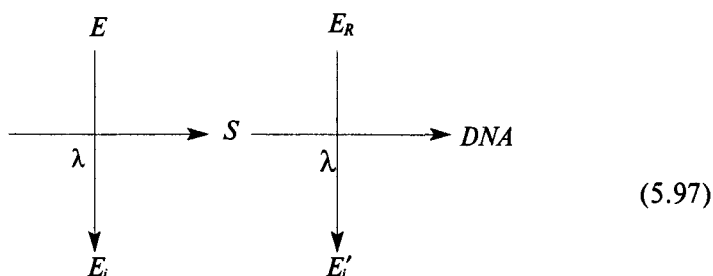
Известно, что процесс развития клеток как микробного, так и животного происхождения включает несколько дискриминируемых стадий. В этой последовательности трансформаций клетки лишь одна стадия представляет собой истинную репликационную стадию. Остальные стадии, связанные с изменением метаболизма, с включением или выключением определенных генов, составляют совокупность процессов, определяющих характеристическое время τ_a . Бактериальные клетки имеют высокие скорости роста и, вероятно, в активной фазе развития популяции постоянно находятся в состоянии митоза. Для описания кинетики их роста, по-видимому, наиболее оправдано использование уравнения (5.85). Для животных клеток в культуре ткани митоз составляет небольшой отрезок времени их развития. В этом случае оправдано описание кинетики процесса с помощью уравнений (5.95) и (5.96). При этом дополнительной кинетической дешифровке должен быть подвергнут параметр τ_a , характеризующий некую наиболее медленную молекулярную трансформацию в процессе развития клетки.

Старение клетки в процессе роста

Весьма важные явления, которые наблюдаются в процессе роста индивидуальной клетки, связаны с процессом старения или инактивации ключевых ферментных систем. Инактивации может подвергаться как репликативный комплекс, так и лимитирующий фермент. Как тот, так и другой процесс должны найти отражение в кинетике роста популяции. Рассмотрим общий случай старения клетки, когда на динамику процесса накладывается кинетика неспецифических инактивационных процессов, вызывающих потерю репликационного потенциала и инактивацию лимитирующего фермента. Такого рода явления могут иметь

место, например, при «старении» мембран клетки, инактивации энергетических процессов.

Простейшую кинетическую схему, описывающую сущность таких процессов, можно представить в виде



где S — исходный лимитирующий субстрат; S' — промежуточный метаболит, лимитирующий репликацию; E — лимитирующий фермент; E_R — ферменты репликативного комплекса; E_i , E'_i — инактивированные формы фермента и репликативного комплекса.

Предполагается, что инактивационные процессы имеют экспоненциальную природу и характеризуются общим кинетическим параметром λ . Тогда кинетику процессов будет описывать система уравнений

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \alpha_R(t) S'; \quad (5.98)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{\text{кам}} E(t) S}{K_S + S} - \alpha_R(t) S'; \quad (5.99)$$

$$\alpha_R(t) = \alpha_{R_0} \exp(-\lambda t); \quad (5.100)$$

$$E(t) = E_0 \exp[-\lambda t]. \quad (5.101)$$

На начальном этапе развития процесса в режиме постоянства концентрации исходного субстрата ($S = S_0$) и стационарности по S' имеет место соотношение

$$S' = \frac{k_{\text{кам}} E_0 S_0}{\alpha_{R_0} (K_S + S_0)}. \quad (5.102)$$

Соответственно кинетику роста цепи ДНК будет описывать уравнение

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{k_{\text{кам}} E_0 S_0}{K_S + S_0} \exp[-\lambda t]. \quad (5.103)$$

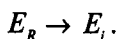
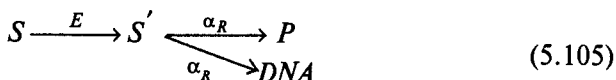
Обозначим

$$v_0 = \frac{k_{\text{кат}} E_0 S_0}{K_S + S_0}.$$

Интегрирование (5.98) при условии $t = 0$, $\Delta DNA = 0$ приводит к функции

$$\Delta DNA(t) = \frac{v_0}{\lambda} (1 - \exp[-\lambda t]). \quad (5.104)$$

Формально схеме (5.97) эквивалентна схема с инактивацией только лишь репликативного комплекса E_R , если «отток» промежуточного субстрата S' на репликационный процесс относительно мал:



При $\alpha_{R_0} \ll \alpha$ уравнения, описывающие кинетику, фактически эквивалентны уравнениям (5.98)–(5.101), однако вместо множителя $1/\alpha_{R_0}$ в уравнении (5.102) появляется множитель $1/\alpha$, т.е.

$$S' = \frac{k_{\text{кат}} E_0 S_0}{\alpha (K_S + S_0)},$$

и соответственно в уравнении (5.103) — множитель α_R/α :

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha_R}{\alpha} v_0 \exp(-\lambda t).$$

При конечном росте полимерной цепи, соответствующей ДНК клетки, уравнение (5.104) позволяет определить время репликационного процесса τ_R . Если принять, что при $t = \tau_R$, $\Delta DNA = B$, то имеем

$$B = \frac{v_0}{\lambda} [1 - \exp(-\lambda t)].$$

Из уравнения следует:

$$\tau_R = -\frac{1}{\lambda} \ln \left(1 - \frac{\lambda B}{v_0} \right).$$

Соответственно

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau_R} = -\frac{\lambda \ln 2}{\ln \left(1 - \frac{\lambda B}{v_0} \right)}.$$

Как функция начальной концентрации субстрата уравнение удельной скорости роста будет иметь вид

$$\mu = - \frac{\lambda \ln 2}{\ln \left[1 - \frac{\lambda B}{k_{\text{кам}} E} \left(1 + \frac{K_S}{S_0} \right) \right]}. \quad (5.106)$$

При малых значениях λ , когда $(\gamma B/k_{\text{кам}})[1+(K_S/S_0)] \ll 1$, логарифмический знаменатель уравнения (5.106) разлагается в быстро сходящийся ряд, что приводит к функции

$$\mu_{\lambda \rightarrow 0} = k_{\text{кам}} \frac{S_0}{S_0 + K_S} \ln 2 \frac{E}{B}. \quad (5.107)$$

Эта функция соответствует уравнению удельной скорости роста типа Моно [см. (5.85)].

Внешне функция (5.106) мало похожа на «классическое» уравнение Моно, однако графически эти функции весьма близки. Это создает определенные трудности для дискриминации двух механизмов на основе конкретных экспериментальных данных. На рис. 5.34а приведены рассчитанные значения μ как функции концентрации субстрата при различных значениях константы скорости инактивации λ . Для сравнения на этом же рисунке приведена кривая для случая неосложненного «старением» роста (кривая с $\lambda = 0$). Видно, что удельная скорость роста культуры для случая «старения» клетки в процессе роста также «насыщается» субстратом:

$$\mu_{S_0 \rightarrow \infty} = \mu_m = - \frac{\lambda \ln 2}{\ln \left[1 - \frac{\lambda B}{k_{\text{кам}} E} \right]}.$$

Принципиальное отличие этих двух функций выявляется при анализе их поведения в условиях малых концентраций субстрата. При старении клеток в процессе роста должна существовать пороговая минимальная концентрация субстрата, ниже которой клеточный рост невозможен. Из уравнения (5.106) следует условие

$$1 - \frac{\lambda B}{k_{\text{кам}} E} \left(1 + \frac{K_S}{S_0} \right) > 0,$$

из которого получаем

$$S_{\text{кр}} = \frac{K_S}{\frac{k_{\text{кам}} E}{\lambda B} - 1}.$$

Видно, что чем больше константа скорости инактивации λ , тем выше значение $S_{кр}$.

В клеточной кинетике часты случаи, когда рост клеток весьма чувствителен к концентрации лимитирующего субстрата; рост культуры полностью прекращается при переходе к низким его концентрациям. Развита кинетическая модель, базирующаяся на представлении о «старении» клеточных механизмов в процессе роста популяции, может служить основой для объяснения феноменов этой группы. Физический смысл критических эффектов заключается в том, что при малых концентрациях субстрата репликационный процесс идет настолько медленно, что инактивационные процессы успевают блокировать рост клетки.

Отличить рост культуры со старением от неосложненного роста можно на основе изучения зависимости удельной скорости роста от концентрации исходного субстрата. В случае заметных эффектов инактивации ключевых элементов клеточного деления кинетические данные не должны линеаризироваться в обратных координатах (рис. 5.34б). Возможность дискриминации механизмов в значительной степени зависит от точности эксперимента, в первую очередь от точности определения удельных скоростей роста популяции.

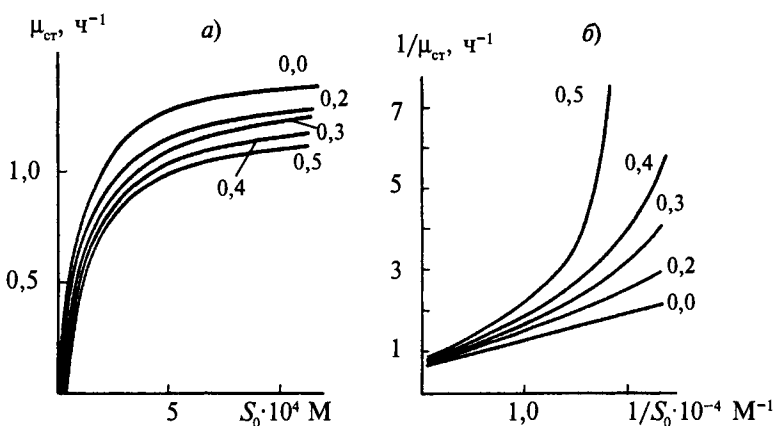


Рис. 5.34. Зависимость удельной скорости роста клеточной популяции от концентрации субстрата в условиях проявления клеточного старения (а); те же данные в обратных координатах (б).

Функции рассчитаны по уравнению (5.106): $K_s = 1 \cdot 10^{-4}$ М; $B/k_{кам} E = 0,66$ ч⁻¹. Значения λ обозначены цифрами на кривых (ч⁻¹).

Для определения кинетических параметров роста культуры из экспериментальных данных можно воспользоваться приближенными уравнениями, основанными на разложении в ряд логарифмического члена уравнения (5.106). При концентрациях субстрата выше критической разложение в ряд логарифмического члена уравнения (5.106) и использование первых двух членов приводят к уравнению

$$\mu = \frac{\ln 2}{\frac{B}{k_{\text{кам}} E} \left(1 + \frac{K_S}{S_0} \right) \left[1 + \frac{\lambda B}{2k_{\text{кам}} E} \left(1 + \frac{K_S}{S_0} \right) \right]}. \quad (5.108)$$

Это уравнение справедливо при невысокой степени нелинейности экспериментальных данных в координатах $1/\mu$ от $1/S_0$. Уравнение (5.108) может быть записано в форме

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1 + \frac{K_S}{S_0}}{\mu_m} \left[1 + \lambda \frac{\ln 2}{2\mu_m} \left(1 + \frac{K_S}{S_0} \right) \right], \quad (5.109)$$

где $\mu_m = \frac{k_{\text{кам}} E \ln 2}{B}$.

При малых значениях $1/S_0$ (большие концентрации субстрата) может быть сделана оценка K_S и μ_m на основе использования асимптотической прямой, описываемой уравнением

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_S}{\mu_m} \frac{1}{S_0}.$$

Эта прямая в координатах $1/\mu$ от $1/S_0$, имеющая вид касательной к точке $1/\mu_m$. Оценка K_S на основе этой прямой позволяет рассчитать функцию Φ при любой концентрации субстрата:

$$\Phi = 1 + (K_S/S_0).$$

С учетом этого уравнение (5.109) может быть трансформировано к виду

$$\frac{1}{\Phi \mu} = \frac{1}{\mu_m} + \lambda \frac{\ln 2}{2\mu_m^2}.$$

В координатах $1/\mu \Phi$ от Φ экспериментальные данные должны быть представлены прямой линией, параметры которой дают значения μ_m и λ .

Кинетические модели апоптоза

Существует всеобщий закон, по велению которого рождаются и умирают.

П. Сир

Рост клеточных популяций ограничен рядом факторов, приводящих к существованию предела в накоплении клеточной биомассы. Для микроорганизмов ограничение плотности популяций является естественным фактором, регулирующим конверсию вещества в клеточную биомассу. В случае клеток животных и растений ограничение роста представляется жизненной необходимостью.

К наиболее важным факторам, ограничивающим рост клеточных популяций, относятся:

1. Истощение системы по лимитирующему субстрату (см. выше).
2. Появление в популяции клеток, потерявших способность к делению.
3. Накопление продуктов — сильных ингибиторов клеточного роста.

Последний фактор представляет особый интерес, поэтому анализу кинетических кривых роста в системах с ингибированием продуктом посвящен § 5.4. Ниже анализируется вторая причина, приводящая к замедлению скорости роста клеточных культур при большой плотности популяции.

*Кинетические модели роста клеточной культуры
с появлением субпопуляции, потерявшей способность
к размножению*

Ограничение роста и предельное накопление клеток при истощении субстрата соответствуют материальному переходу субстрата в клеточную биомассу. Это наиболее простой фактор, ограничивающий рост клеточной популяции. В развитии клеточных популяций заложены и более сложные механизмы ограничения роста. Они связаны с появлением в популяции (по мере ее развития) клеток, потерявших способность к репликации. Рассмотрим кинетические закономерности этих процессов.

На рис. 5.35 приведена кинетика роста бактерии *E.coli*. Кинетическая кривая роста общего числа клеток имеет типичный вид, включающий экспоненциальную фазу с замедлением роста и выходом на предельный уровень. Совершенно по-другому выглядит популяционная кривая числа клеток (M_d), сохраняющих способность к делению (рис. 5.35б). Видно, что типичная кинети-

ческая кривая изменения в системе жизнеспособных клеток в начальный период времени экспоненциально растет, достигает максимума и в дальнейшем быстро падает, т.е. наряду с процессом экспоненциального роста жизнеспособных клеток протекает процесс их инактивации, заканчивающийся почти полным обеднением популяции по жизнеспособным клеткам. Через 15–20 ч общий рост популяции достигает насыщения, при этом в популяции остается всего лишь несколько процентов клеток, способных к делению.

Кинетические кривые типа представленных на рис. 5.35 могут быть получены на основе по крайней мере двух модельных представлений. Назовем эти модели прогрессирующей некомпетентностью и запрограммированным отказом. Рассмотрим кинетические закономерности для обоих механизмов процесса.

Прогрессирующая некомпетентность

Принцип Питера. В иерархии каждый индивидуум имеет тенденцию подниматься до своего уровня некомпетентности.

Следствия принципа Питера. Сливки поднимаются кверху, пока не прокиснут. Путешествие длиной в тысячу миль завершается одним шагом. Принцип Питера, подобно эволюции, не ведает пощады. Чем выше взбираешься по иерархической лестнице, тем более скользкими становятся ее ступени. Некомпетентность не знает границ ни во времени, ни в пространстве. Колледж не может обеспечить компетентность, он может обеспечить диплом.

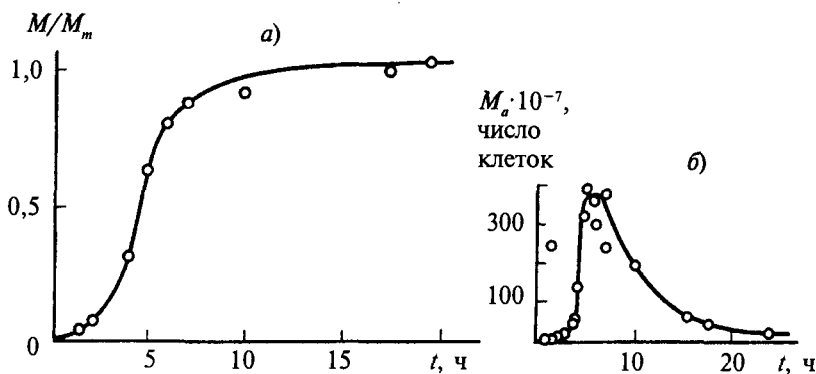


Рис. 5.35. Кинетика роста *E.coli* штамм PR13.

a — кинетика изменения общего числа клеток; b — кинетика изменения числа клеток, способных образовывать колонии на твердой среде.

Изменение концентрации жизнеспособных клеток M_a можно представить в виде

$$\frac{dM_a}{dt} = \mu_a(t)M_a - \lambda M_a, \quad (5.110)$$

где μ_a — удельная скорость роста делящихся клеток, которая зависит от концентрации лимитирующего субстрата, являющегося, в свою очередь, функцией времени; λ — константа скорости инактивации, частота «отказов», приводящих к потере способности клеток к делению.

Накопление в системе «некомпетентных», не способных к делению клеток M_i описывает уравнение

$$\frac{dM_i}{dt} = \lambda M_a. \quad (5.111)$$

Общее число клеток M в системе определяется суммой:

$$M = M_a + M_i.$$

Соответственно

$$\frac{dM}{dt} = \mu_a M_a.$$

Эта система уравнений описывает основные закономерности развития популяций. К сожалению, аналитическое интегрирование этой системы уравнений неосуществимо, однако можно получить достаточно детальную информацию о свойствах системы на основе ее качественного анализа и численного интегрирования.

Важной особенностью в поведении системы является ее экстремальный характер по M_a . Кроме того, кинетическое поведение системы в значительной степени определяется динамикой изменения в системе концентрации субстрата. Как видно из уравнения (5.110), по мере развития процесса первый положительный член его уменьшается, второй, отрицательный, растет за счет роста M_a и соответственно возникает ситуация, в которой $dM_a/dt = 0$. Это условие максимума концентрации компетентных клеток. Если принять, что удельная скорость роста как функция концентрации субстрата дается уравнением Моно, то из уравнения (5.110) при условии $dM_a/dt = 0$ следует:

$$\frac{\mu_m \left(S_0 - \frac{M(t_m) - N_0}{Y_S} \right)}{K_S + S_0 - \frac{M(t_m) - N_0}{Y_S}} = \lambda, \quad (5.112)$$

где t_m — время достижения максимума по M_a .

Из уравнения (5.112) можно найти концентрацию клеток $M(t_m)$ в момент максимальной плотности популяции по компетентным клеткам:

$$M(t_m) = N_0 + Y_S \left[S_0 - \frac{\lambda K_S}{\mu_m - \lambda} \right].$$

Поскольку концентрация субстрата и общее число клеток M связаны линейно, концентрация субстрата в момент прохождения максимума по M_a имеет вид

$$S(t_m) = \frac{\lambda K_S}{\mu_m - \lambda}.$$

Время достижения максимума по M_a соответствует точке перегиба на кинетических кривых роста общего числа клеток M и расхода субстрата S (это следует из условия равенства нулю d^2M/dt^2 в точке перегиба). Интересно отметить, что концентрация субстрата в максимуме по M_a или в точке перегиба кинетической кривой расхода субстрата определяется только кинетическими параметрами роста μ_m , λ , K_S и не зависит от начальной концентрации субстрата.

Удобно проанализировать поведение системы в двух приближениях.

1. *Начальный период развития процесса при малых глубинах расхода субстрата.* В период экспоненциального роста концентрация лимитирующего субстрата сохраняется практически постоянной: $S(t) = S_0$, $\mu_a = \mu_{m,a}$. Соответственно уравнение (5.110) можно записать в виде

$$\frac{dM_a}{dt} = (\mu_{m,a} - \lambda)M_a.$$

Интегрирование этого уравнения при начальных условиях $t = 0$, $M_a = M_{a0}$ приводит к функции

$$M_a = M_{a0} \exp[(\mu_{m,a} - \lambda)t]. \quad (5.113)$$

Динамику изменения концентрации некомпетентных клеток можно найти из уравнения (5.111), подставив в него уравнение (5.113), и провести интегрирование:

$$M_i = \frac{\lambda M_{a0}}{\mu_{m,a} - \lambda} \exp[(\mu_{m,a} - \lambda)t].$$

И наконец, находим

$$M = \frac{\mu_{m,a} M_{a0}}{\mu_{m,a} - \lambda} \exp[(\mu_{m,a} - \lambda)t].$$

Видно, что кинетику накопления биомассы описывает экспоненциальная функция, при этом определяемая на опыте удельная скорость роста дается уравнением

$$\mu_{наб.1} = \mu_{m,a} - \lambda$$

2. Развитие процесса на большую глубину, т.е. переход в режим истощения субстрата, когда $S \approx 0$ и $\mu_a \approx 0$.

В этом режиме, согласно (5.110), имеем

$$\frac{dM_a}{dt} = -\lambda M_{a,m},$$

где $M_{a,m}$ — максимальная концентрация M_a .

Интегрирование этого уравнения приводит к функции

$$M_a = M_{a,m} \exp(-\lambda t).$$

В этом режиме концентрация компетентных клеток должна экспоненциально падать.

Запрограммированный отказ

Ограничение роста клеточной популяции может иметь специфический характер запрограммированного отказа. Биохимические механизмы, останавливающие пролиферацию клеток, имеют, по-видимому, различную природу. В настоящее время ясно, что в ряде случаев остановка роста связана с потерей чувствительности клеток к ростовым факторам среды. В качестве примера рассмотрим особенности роста популяции лимфоцитов, индуцированного действием ростовых факторов. Например, динамика появления и исчезновения на клеточной мембране Т-лимфоцитов рецептора к фактору роста характеризуется тем, что быстрая экспрессия рецептора сменяется стадией его потери. Возможно, что «десенситизация» рецептора к ростовому фактору связана с механизмом его инактивации в процессе реакции.

Рассмотрим кинетику процесса и проследим, как динамика экспрессии рецептора может отражаться на динамике роста клеточной популяции. Кинетику изменения числа рецепторов R на клеточной мембране достаточно строго описывает уравнение

$$R = A[\exp(-\lambda t) - \exp(-\alpha t)], \quad (5.114)$$

где A — постоянная, определяемая кинетическими параметрами; α — кинетический коэффициент, связанный с динамикой роста количества рецепторов; λ — кинетический коэффициент, определяющий скорость инактивации, потери рецептора.

Если предположить, что скорость деления клеток пропорци-

ональна числу рецепторов на клеточной мембране, т.е. $\mu = \mu_0 R$, то кинетика роста компетентных клеток будет дана уравнением $M_a = M_{a0} \exp(\mu_0 R t)$.

Если параметры α и λ существенно отличаются ($\alpha \gg \lambda$), то уравнение скорости роста компетентных клеток будет иметь вид

$$M_a = M_{a0} \exp[\mu_0 \exp(-\lambda t) t] . \quad (5.115)$$

Рассмотрим свойства этого уравнения.

1. Число репликационно компетентных клеток экспоненциально растет в начальный период времени (когда справедливо соотношение $\lambda t \ll 1$):

$$M_a = M_{a0} \exp(\mu_0 t) . \quad (5.116)$$

2. Наличие максимума при

$$t_m = 1/\lambda , \quad (5.117)$$

т.е. время достижения максимума определяется только кинетическим параметром экспоненциального отказа и не зависит от концентрации субстратов, начальной концентрации клеток [уравнение (5.116) следует из условия $dM_a/dt = 0$].

3. Коэффициент амплификации $M_{a,m}$, или максимальное число компетентных клеток, определяется кинетическими параметрами процесса в соответствии с уравнением

$$\frac{M_{a,m}}{M_{a0}} = \exp\left[\frac{\mu_0}{\lambda t}\right] .$$

При бесконечно больших временах процесса число компетентных клеток выходит на исходный уровень:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} M_a = M_{a,0} .$$

Уравнение (5.116) удовлетворительно описывает динамику пролиферации В- и Т-лимфоцитов в культуре (рис. 5.36). Это уравнение получено из предпосылок, связанных с экспоненциальной потерей чувствительности клеток к ростовому фактору, однако оно справедливо для любых систем с экспоненциальным отказом (экспоненциальная инактивация реплицирующего комплекса, экспоненциальная инактивация ключевых ферментных систем и др.).

Сравнение и дискриминация кинетических моделей ограничения клеточного роста

Как следует из вышеизложенного, существуют две группы механизмов, определяющих пределы роста клеточных популяций:

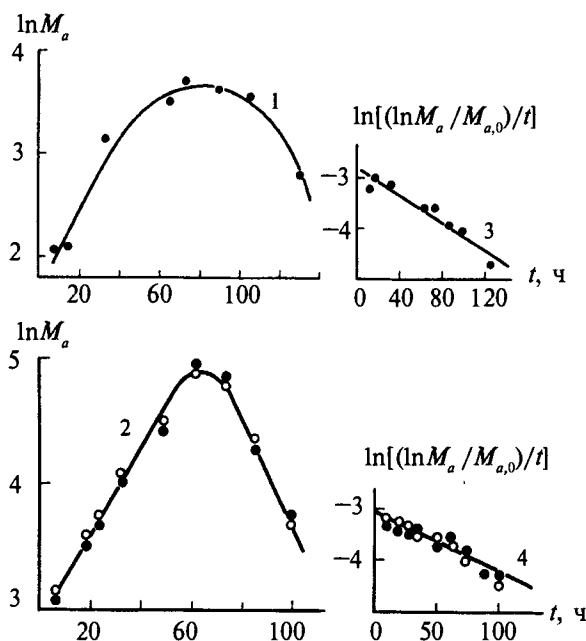


Рис. 5.36. Кинетические закономерности роста В-лимфоцитов, индуцированного фактором роста В-клеток (кривая 1), и Т-лимфоцитов, индуцированного интерлейкином (кривая 2); прямые 3, 4 отражают преобразование кривых 1, 2 в координатах уравнения (5.120).

1. *Расход лимитирующих субстратов.*

2. *Появление в процессе роста культуры субпопуляции клеток, потерявших способность к активному делению.* Последнюю группу механизмов можно разбить на два подкласса: прогрессирующая некомпетентность; запрограммированный отказ.

Отличить механизм истощения системы по субстрату от механизма появления неактивной субпопуляции клеток достаточно просто. Наиболее надежным способом представляется определение в процессе роста культуры числа клеток, способных к активному росту. Для бактериальных клеток это может быть метод подсчета колоний при посеве на твердые среды, для клеток культуры ткани — метод, основанный на использовании витальных красителей.

Из рис. 5.35 и 5.36 видно, что ограничение роста как бактериальных клеток, так и лимфоцитов связано с накоплением неактивной клеточной субпопуляции. Естественно, возникает вопрос: можно ли в рамках этого механизма разграничить случаи

запрограммированного отказа и прогрессирующей некомпетентности?

Рассмотренные модели роста путем накопления субпопуляции клеток, потерявших способность к репликации, приводят к качественно близким кинетическим картинам развития активной субпопуляции клеток. Однако количественные различия позволяют дискриминировать модели и из анализа экспериментальных данных получить информацию о механизме остановки роста. Можно предложить следующие критерии дискриминации моделей:

1. *Кинетическое поведение на начальном этапе развития процесса.* Отклонение от экспоненциального поведения в случае механизма прогрессирующей некомпетентности определяется степенью конверсии субстрата и должно наблюдаться при достаточно высоких глубинах реакции, в то время как в случае запрограммированного отказа отклонение от экспоненциального поведения должно наблюдаться уже при малых конверсиях субстрата. Отклонение от экспоненциального роста в случае запрограммированного отказа весьма существенно:

$$\frac{d \ln M_a}{dt} = \mu_a - \lambda \quad \text{— прогрессирующая некомпетентность; (5.118)}$$

$$\frac{d \ln M_a}{dt} = \mu_0 \exp(-\lambda t)(1 - \lambda t) \quad \text{— запрограммированный отказ. (5.119)}$$

В условиях справедливости (5.118) $d \ln M_a / dt = \text{const}$ до 20–40% конверсии субстрата в случае запрограммированного отказа с самого начала должно наблюдаться уменьшение тангенса угла наклона начального участка кривой в полулогарифмических координатах. Даже при постоянной концентрации субстрата механизм запрограммированного отказа обеспечивает полное прекращение клеточного роста.

На рис. 5.37 видно, что культура *Namalva*, лишенная механизма запрограммированного отказа, развивается экспоненциально (см. кривую 2), что свидетельствует о достаточном количестве субстратов, в то время как нормальные клетки В-лимфоцитов замедляют, а потом прекращают свой рост (см. кривую 1).

2. *Различия в кинетических уравнениях и их анализ.* Из уравнения модели запрограммированного отказа следует:

$$\ln \left(\frac{1}{t} \ln \frac{M_a}{M_{a0}} \right) = \ln \mu_0 - \lambda t, \quad (5.120)$$

т.е. экспериментальные данные в случае реализации этого механизма остановки роста должны линейизоваться в координатах $\ln[\ln(M_a/M_{a0})/t]$, в то время как кинетические данные по развитию популяции с механизмом «прогрессирующей некомпетентности» не должны описываться этим уравнением.

Из рис. 5.38 видно, что экспериментальные данные по росту Т-лимфоцитов достаточно хорошо описываются уравнением (5.120), т.е. остановка роста популяции лимфоцитов осуществляется по механизму запрограммированного отказа. Напротив, рост *E.coli* не описывается уравнением (5.120) и, по-видимому, согласуется с механизмом прогрессирующей некомпетентности.

3. *Запрограммированный отказ — жесткий механизм, ограничивающий рост клеток.* Если известны μ_0 и λ , то может быть вычислено теоретическое значение коэффициента амплификации. Так, из экспериментальных данных по росту *E.coli*, представленных на рис. 5.38, а также из серии нескольких независимых экспериментов было оценено $\mu \approx 2 \text{ ч}^{-1}$,

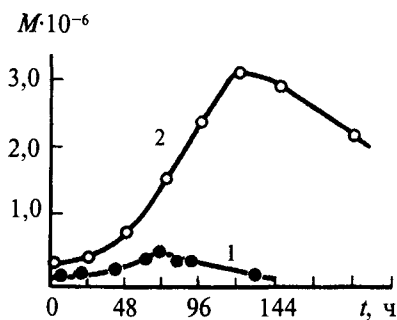


Рис. 5.37. Сравнение кинетических кривых роста нормальных В-лимфоцитов (1) и клеток лимфоидной культуры Namalva (2) (рост клеток индуцировался действием специфического белкового фактора роста В-клеток).

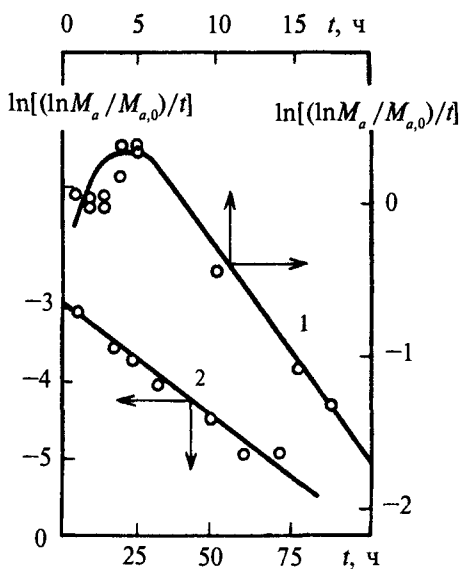


Рис. 5.38. Сравнение кинетических кривых роста популяции *E.coli* (кривая 1) и Т-лимфоцитов (кривая 2) в координатах уравнения «запрограммированного отказа» (5.120).

$\lambda = 0,4 \text{ ч}^{-1}$. Соответственно теоретический коэффициент амплификации для этой системы $\mu_{a,m}$ должен быть равен 6,35. Экспериментально наблюдается величина выше 600. Видно, что рост популяции *E.coli* не описывается уравнениями механизма запрограммированного отказа.

Таким образом, сравнение экспериментальных данных по росту бактериальной и лимфоцитарной клеточных популяций показывает принципиальное различие в механизмах остановки клеточного роста. В то время как предельная плотность бактериальной популяции определяется механизмом прогрессирующей некомпетентности, рост популяции В- и Т-лимфоцитов ограничивается механизмом запрограммированного отказа.

По-видимому, в механизме репликации клетки *E.coli* заложен процесс, приводящий к потере репликационного потенциала. Это может быть как специфическая инактивация репликационного комплекса (например, через термоинактивацию или протеолиз), так и неспецифический процесс «старения» клетки, связанный, например, с разрушением мембранных структур или ДНК. Ограничение роста лимфоцитарных клеток происходит по существенно более «жесткому» механизму. Представляется возможным механизм десенситизации рецепторов к специфическим белковым факторам роста.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие ограничения роста клеточных популяций вы знаете? Что такое апоптоз? Чем апоптоз отличается от некроза? Какие методы наблюдения апоптоза вы знаете или можете предложить? 2. Что такое теломера и теломераза? 3. Получите уравнения роста клеточной популяции в экспоненциальной фазе: а) для многостадийной трансформации субстрата:

$$S_0 \xrightarrow{a_1} S_1 \xrightarrow{a_2} S_2 \dots S_n \xrightarrow{a_{n+1}} DNA; \text{ б) с учетом лимитирующих}$$

транспортных процессов $S_0 \xrightarrow{V_T} S_1 \xrightarrow{E} S_2 \xrightarrow{\alpha} DNA$, где V_T — скорость транспортных процессов. 4. Дайте определение механизма ограничения роста по моделям «прогрессирующая некомпетентность» и «запрограммированный отказ».

5.7. Культивирование генно-инженерных штаммов микроорганизмов.

Кинетика репликации плазмид

Знак вопроса является ключом ко всякому знанию.

О. де Бальзак

В настоящем параграфе рассматриваются процессы динамики изменения числа плазмид на клетку в процессе культивирования клеточных популяций, несущих плазмидный ген. Описаны два процесса изменения количества плазмид:

1. Во время культивирования популяции.
2. При многократном культивировании клеток.

Сложные динамические явления интерпретируются в рамках различных кинетических моделей, основанных на различном поведении плазмид и клеток, несущих чужеродный ген.

Переходные процессы при периодическом культивировании

Два типа кинетического поведения плазмид в растущих популяциях E.coli. В растущих бактериальных популяциях, содержащих природные или искусственно сконструированные плазмиды, наблюдаются специфические динамические эффекты. В зависимости от фазы роста клетки-хозяина и от скорости ее деления можно наблюдать существенные изменения в копийности плазмид. При этом возникают закономерные вопросы: как изменяется копийность плазмид в процессе роста клеточной популяции и какого рода регуляторные процессы проявляются при этом? Качественные ответы на эти вопросы можно получить в литературе, а здесь попробуем ответить на эти вопросы количественно, используя кинетический подход.

Определение копийности плазмид в растущих популяциях различных штаммов *E.coli* показало, что существенной особенностью поведения таких систем является то, что число плазмид на клетку не является постоянным, а закономерно меняется в процессе роста популяции. При этом все наблюдаемые случаи могут быть разделены на два типа — монофазные и бифазные процессы.

В первом случае клетки временно теряют некоторое количество плазмид. Второй случай более сложен: уменьшение копийности плазмиды на начальном этапе процесса в последующем сопровождается ее гиперпродукцией (через 4–6 ч после иноку-

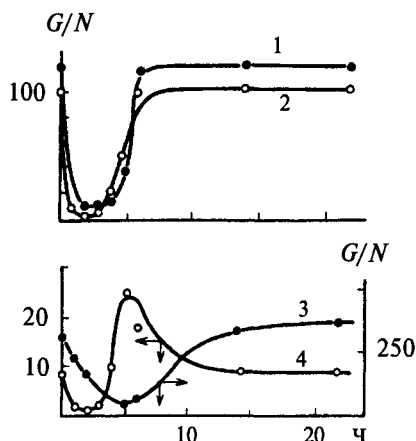


Рис. 5.39. Кинетика копийности различных плазмид, введенных в *E. coli* штамм jM109: pMM24 (1), pUC12 (2), pGEM2 (3), pACYC177 (4).

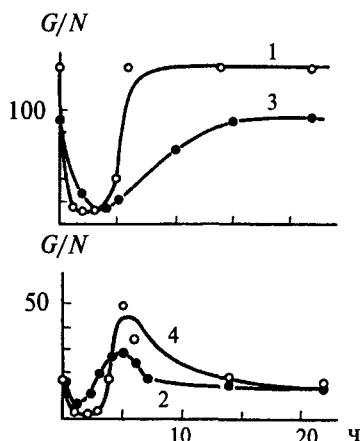


Рис. 5.40. Кинетика различных плазмид, введенных в *E. coli* штамм jM109: pMM24 (1), pACYC177 (2); штамм pR13: pMM24 (3); штамм C600: pACYC177 (4).

ляции концентрация плазмид существенно превышает исходные стационарные уровни).

Возникает естественный вопрос: что определяет тип поведения системы — природа плазмид или природа клеток-хозяев? Для ответа на этот вопрос были проведены следующие эксперименты. Плазмиды с различным репликоном были введены в один и тот же бактериальный штамм:

pMM24 → *E. coli* jM109 ← pUC12;
pACYC177 → *E. coli* jM109 ← pGEM2 .

С другой стороны, было исследовано кинетическое поведение одних и тех же плазмид, введенных в различные бактериальные штаммы:

E. coli jM109 ← pMM24 → *E. coli* pR13;
E. coli C600 ← pACYC177 → *E. coli* jM109.

Поведение различных плазмид не одинаково. Однако плазмиды, имеющие тот же репликон ColE1 (pMM24, pUC12, pGEM2), кинетически идентичны. Таким образом, не природа клетки-хозяина, а структура репликона плазмиды определяет тип кинетического поведения. Этот вывод подтверждается экспериментами по кинетике изменения одной и той же плазмиды в различных штаммах.

**Тип кинетического поведения плазмид, введенных
в различные бактериальные штаммы**

Штаммы <i>E. Coli</i>	Плазмиды (репликон)	Тип поведения
jM109	pMM24 (ColE1)	1
	pUC12 (ColE1)	1
	pACYC177 (p15)	2
	pGEM2 (ColE1)	1
C600	pACYC177 (p15)	2
PR13	pMM24 (ColE1)	1

На рис. 5.39 приведены результаты по динамике копийности плазмиды, введенной в различные штаммы *E.coli*. Данные на рис. 5.40 получены при введении различных плазмид, в различные штаммы *E.coli*. Результаты, суммированы в табл. 5.7.

Итак, в процессе репликации плазмид при росте популяции *E.coli* наблюдаются по крайней мере два типа кинетического поведения, при этом поведение регулируется природой репликона. Плазмиды, содержащие репликон ColE1, будут характеризоваться кинетическим поведением первого типа, в то время как плазмиды, содержащие репликон p15, обнаруживают второй тип кинетического поведения, который характеризуется временным обеднением клеток плазмидами с последующей гиперпродукцией.

Кинетическое описание репликаций плазмид первого типа поведения. Как видно из приведенных выше экспериментальных данных, существует категория плазмид, характеризующихся наличием минимума на кривой изменения копийности в процессе роста клеточной популяции. Естественно предположить, что наблюдаемое поведение объясняется различием значений кинетических параметров, характеризующих рост клетки и плазмиды. Действительно, если удельная скорость репликации плазмид меньше скорости роста клеток или удельная скорость инактивации роста для плазмиды выше, чем соответствующий параметр для клеток, можно ожидать обеднения клеток плазмидами в процессе роста клеточной популяции.

Для кинетического описания процесса воспользуемся следующим подходом. Скорость роста клеток может быть выражена уравнением

$$\frac{dN}{dt} = \mu(t)N .$$

Удельную скорость роста можно представить в виде

$$\mu(t) = \mu_0 f(t). \quad (5.121)$$

Здесь μ_0 — начальная удельная скорость роста; $f(t)$ — управляющая функция.

Сопоставление уравнения (5.121) с экспериментальными данными показывает, что в большинстве случаев управляющую функцию можно представить в виде

$$f(t) = \exp(-\lambda t),$$

где λ имеет размерность константы скорости первого порядка и является фактически удельной скоростью инактивации клеток.

Начальная удельная скорость роста μ_0 является функцией начальных условий, в частности начальной концентрации субстрата. Обсуждаемый подход приводит к следующим уравнениям:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \frac{\mu}{\lambda} [1 - \exp(-\lambda t)];$$

$$N = N_0 \exp \left\{ \frac{\mu}{\lambda} [1 - \exp(-\lambda t)] \right\}, \quad (5.122)$$

где N_0 — начальная концентрация клеток.

Качественное и количественное сопоставление уравнений (5.122) с экспериментом показывает, что эти уравнения достаточно хорошо описывают экспериментальные данные по кинетике роста клеточных популяций. Действительно, как видно из рис. 5.41 и 5.42, накопление клеток в полулогарифмических координатах может быть хорошо представлено возрастающей экспоненциальной функцией с насыщением [уравнение (5.122)].

Для кинетического описания воспользуемся этим уравнением

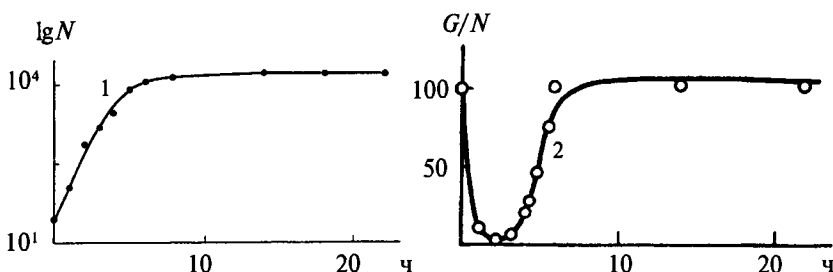


Рис. 5.41. Кинетика изменения числа клеток (1) и копийность плазмиды рUC12 (2) в процессе роста *E.coli* штамм jM109.

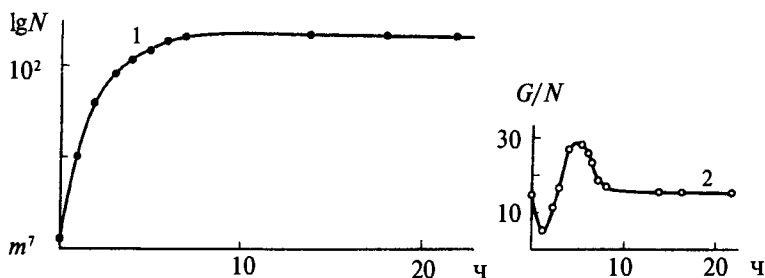


Рис. 5.42. Кинетика изменения числа клеток (1) и копийность плазмиды рАСУС177 (2) в процессе роста *E.coli* штамм С600.

и предположим, что кинетические параметры роста клеток и репликации плазмид могут различаться. Для популяции клеток имеем

$$\frac{d \ln N}{dt} = \mu_c \exp(-\lambda t) ,$$

где μ_c — начальная удельная скорость роста клеточной популяции.

Для популяции плазмид соответственно можно предположить, что кинетика репликации описывается аналогичным уравнением:

$$\frac{d \ln G}{dt} = \mu_p \exp(-\alpha_p t) ,$$

где G — концентрация плазмид в популяции; μ_p — удельная скорость репликации плазмид; α_p — удельная скорость инактивации репликации плазмид.

Тогда

$$\begin{aligned} N &= N_0 \exp \left\{ \frac{\mu_c}{\lambda} [1 - \exp(-\lambda t)] \right\} ; \\ G &= G_0 \exp \left\{ \frac{\mu_p}{\alpha_p} [1 - \exp(-\alpha_p t)] \right\} , \end{aligned} \quad (5.123)$$

где N_0 и G_0 — начальные концентрации клеток и плазмид соответственно.

По определению копийность плазмиды как функция времени имеет вид

$$n = \frac{G}{N} ,$$

что приводит к уравнению

$$n = \frac{G_0}{N_0} \exp \left\{ \frac{\mu_p}{\alpha_p} \left[1 - \exp(-\alpha_p t) \right] - \frac{\mu_c}{\lambda} \left[1 - \exp(-\lambda t) \right] \right\}. \quad (5.124)$$

Параметр $G_0/N_0 = n_0$ представляет собой копияность плазмиды в начальный момент времени. При бесконечно большом времени протекания процесса

$$n_{\infty} = n_0 \exp \left(\frac{\mu_p}{\alpha_p} - \frac{\mu_c}{\lambda} \right).$$

При многократном пересеве культуры система находит устойчивый режим, при котором начальная и конечная величины копияности плазмиды совпадают: $n_{\infty} = n_0$. Это соответствует условию $\mu_p/\alpha_p = \mu_c/\lambda$, которое приводит к уравнению.

$$\frac{n}{n_0} = \exp \left\{ \frac{\mu_c}{\lambda} \left[\exp(-\lambda t) - \exp(-\alpha_p t) \right] \right\}. \quad (5.125)$$

На практике, как правило, реализуется случай, характеризуемый этим уравнением. Это видно, например, из рис. 5.39–5.42, т.е. начальная копияность плазмид и копияность при бесконечном времени практически совпадают.

Проанализируем поведение систем, кинетика которых описывается уравнением типа (5.125). На рис. 5.43 представлены расчетные кривые при вариации параметра λ при постоянных μ_c и α_p (см. рис. 5.43а), а также влияние параметра μ_c при постоянных α_p и λ . Как видно из рис. 5.43а, соотношение параметров λ и α_p регулирует, будет ли на кривой копияности плазмид наблюдаться максимум или минимум. При $\alpha_p = \lambda$ копияность плазмиды во времени не меняется (прямая, соответствующая $\lambda = 0,4$). При $\alpha_p < \lambda$ на кривой копияности плазмид должен наблюдаться минимум, при $\alpha_p > \lambda$ можно ожидать прохождения кривой копияности через максимум.

Таким образом отношение параметров α_p и λ регулирует отношение удельных скоростей роста клеток и плазмид. Минимум на кинетических кривых копияности плазмид должен иметь место, если $\alpha_p/\lambda < 1$ или $\mu_p < \mu_c$, т.е. если удельная скорость репликации плазмид меньше удельной скорости роста клеток. В этом случае на начальном этапе развития процесса скорость роста клеток превышает скорость репликации плазмид и при этом происходит «разбавление» плазмид в клетках. В дальнейшем этот процесс компенсируется относительно более медленным процессом инактивации роста плазмид ($\alpha_p < \lambda$), что на более поздней стадии развития культуры выводит копияность на исходный уровень.

Взаимоотношение клетка-хозяин — плаزمид в кинетическом плане характеризуется некоторым компенсационным законом:

$$\mu_c \alpha_p = \mu_p \lambda = \text{const.}$$

Относительно низкие удельные скорости репликации плазмид компенсируются относительно низкими удельными скоростями их инактивации. Это обеспечивает соответствие начального и конечного уровней копийности плазмиды при периодическом культивировании клеток-хозяев с чужеродным генетическим материалом. Из рис. 5.43б и в видно, что чем меньше значение удельной скорости инактивации плазмид и чем больше удельная скорость роста клеток при прочих равных параметрах, тем глубже минимум на кинетических кривых копийности плазмид в процессе роста клеточной популяции.

Таким образом, качественное сравнение теоретических кривых (см. рис. 5.43) с экспериментальными (см. рис. 5.39—5.42) показывает, что предложенная выше кинетическая модель достаточно адекватно описывает поведение плазмид первого типа в растущей клеточной популяции.

Кинетическое описание репликации плазмид второго типа поведения. Кинетические закономерности репликации плазмид второго типа существенно сложнее. Их поведение в этом случае характеризуется двумя экстремумами на кинетических кривых копийности плазмид в процессе роста клеточной популяции (см. рис. 5.39, 5.40, 5.42).

Для кинетического описания такого рода процессов можно воспользоваться представлением о двухстадийном характере реп-

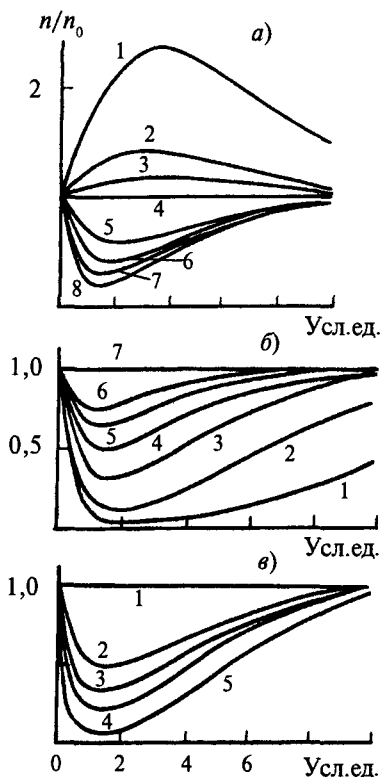


Рис. 5.43. Расчетные кривые копийности плазмид.

$a - \mu_c = 1,4; \alpha_p = 0,4; \lambda:$ 1 — 0,2; 2 — 0,3; 3 — 0,35; 4 — 0,4; 5 — 0,6; 6 — 0,8; 7 — 1,0; 8 — 1,4; $б - \mu_c = 1,4; \lambda = 1,0; \alpha_p:$ 1 — 0,2; 2 — 0,3; 3 — 0,4; 4 — 0,5; 5 — 0,6; 6 — 0,7; 7 — 1,0; $в - \lambda = 1,4; \alpha_p = 0,4; \mu_c:$ 1 — 0; 2 — 0,8; 3 — 1,1; 4 — 1,5; 5 — 2,5.

ликации плазмид в клетках. Следует заметить, что подобные представления, постулирующие двухстадийность процесса, часто используются при кинетическом описании роста клеточных популяций, например при наличии ярко выраженного периода индукции. Адекватной аппроксимацией подобных процессов является двухэкспоненциальная функция, моделирующая удельную скорость роста клеточной популяции.

Итак, если представить, что процесс репликации плазмид сопряжен с накоплением некоторого важного метаболита или компонента репликационного комплекса, то дифференциальное уравнение для концентрации плазмид можно модифицировать следующим образом:

$$\frac{d \ln G}{dt} = \mu_p \exp(-\alpha_p t) [1 - \exp(-\beta t)], \quad (5.126)$$

где член $(1 - \exp(-\beta t))$ характеризует кинетику образования активного репликационного комплекса.

В рамках данного приближения параметр β имеет смысл константы скорости первого порядка, характеризующей кинетику активирующего систему процесса. По физическому смыслу активирующий процесс можно рассматривать как адаптацию системы к новым условиям среды (синтез фермента или ферментативной системы) или элиминирование (во времени) из системы репрессора репликации.

Из уравнения (5.126) следует, что управляющую функцию можно представить в виде $f(t) = \exp[-\alpha_p t] - \exp[-\gamma t]$, где $\gamma = \beta - \alpha_p$.

По физическому смыслу процесс адаптации системы, характеризваемый параметром β , протекает быстрее процесса инактивации роста, так что $\beta > \alpha_p$, $\gamma > 0$. Таким образом, в отличие от систем с простым экспоненциальным отказом наблюдаемая удельная скорость репликации плазмид как функция времени ведет себя по-другому: вначале она возрастает и достигает максимума, а потом падает до нуля. Время достижения максимума для наблюдаемой удельной скорости репликации

$$\tau_n = \frac{\ln \frac{\gamma}{\alpha_p}}{(\gamma - \alpha_p)}.$$

Интегрирование уравнения (5.126) дает зависимость следующего вида:

$$\ln \frac{G}{G_0} = \left[\frac{\mu_p}{\beta} \exp(-\gamma t) - 1 \right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p} [1 - \exp(-\alpha_p t)].$$

Таким образом, зависимость от времени числа плазмид в популяции отражает функция

$$G = G_0 \exp \left\{ \left[\frac{\mu_p}{\gamma} \exp(-\gamma t) - 1 \right] + \frac{\mu_p}{\alpha_p} [1 - \exp(-\alpha_p t)] \right\}. \quad (5.127)$$

Тогда

$$n = n_0 \exp \left\{ \frac{\mu_p}{\gamma} [\exp(-\gamma t) - 1] + \frac{\mu_p}{\alpha_p} [1 - \exp(-\alpha_p t)] + \frac{\mu_c}{\lambda} [\exp(-\lambda t) - 1] \right\}. \quad (5.128)$$

$$\ln \frac{n}{n_0} = \frac{\mu_p}{\gamma} [\exp(-\gamma t) - 1] + \frac{\mu_p}{\alpha_p} [1 - \exp(-\alpha_p t)] + \frac{\mu_c}{\lambda} [\exp(-\lambda t) - 1]. \quad (5.129)$$

Из экспериментальных данных следует, что копияность плазмид в начальный и конечный моменты времени совпадает. Это налагает определенное «жесткое» условие на соотношение параметров:

$$\frac{\mu_p}{\gamma} + \frac{\mu_c}{\lambda} = \frac{\mu_p}{\alpha_p}. \quad (5.130)$$

Сопоставление уравнения (5.128) с экспериментальными данными показывает, что уравнение описывает двухэкстремумный характер кинетического поведения плазмиды. На рис. 5.44 представлены экспериментальные данные по кинетике копияности плазмиды рАСУС177 в двух различных штаммах *E.coli* и теоретическая кривая, рассчитанная по уравнению (5.128). Значения кинетических параметров в ч⁻¹ следующие: $\lambda = 0,5$; $\alpha_p = 0,5$; $\gamma = 0,3$ (*E.coli* jM109); $\lambda = 0,9$; $\alpha_p = 0,6$; $\gamma = 0,5$ (*E.coli*, штамм С600).

Таким образом, качественные различия в поведении плазмид первого и второго типов связаны с различными кинетическими законами репликации, а именно плазмиды второго типа на кинетической кривой общей концентрации плазмид в популяции имеют характерную лаг-фазу-период индукции. Молекулярная при-

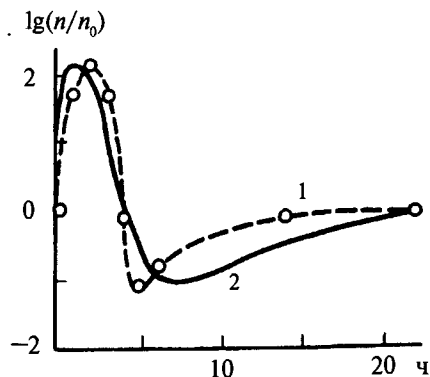


Рис. 5.44. Сравнение экспериментальных данных (1) с теоретической кривой (2) копияности плазмид рАСУС177 в *E.coli*, штамм jM109.

рода этого процесса (синтез дополнительного фактора репликации или элиминация репрессора) требует дальнейшего изучения.

Потеря плазмид в процессе роста клеточной популяции

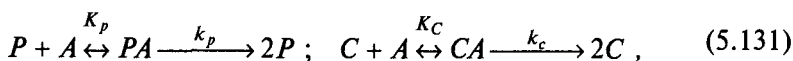
Важной особенностью кинетического поведения микробных культур, несущих плазмиды, является достаточно давно обнаруженный процесс потери последних клетками-хозяевами и соответственно потери закодированной в них информации, в том числе чужеродных генов. Этот процесс имеет важное значение как с точки зрения понимания фундаментальных основ экспрессии гена, так и с точки зрения практического использования генно-инженерных продуцентов. Потеря микробной популяцией заданного ей чужеродного гена в ряде случаев принципиально ограничивает биотехнологическое использование этих микроорганизмов и заставляет искать пути, элиминирующие этот процесс.

Сравнение скоростей роста плазмидсодержащих (р⁺) и плазмиднесодержащих (р⁻)-клеток показывает, что в условиях отсутствия селектирующих факторов (например, антибиотиков, подавляющих рост (р⁻)-клеток) (р⁺)-клетки растут заметно медленнее. Например, сравнение удельных скоростей роста *E.coli* W3101 в (р⁺) и (р⁻)-штаммах показывает, что (р⁻)-клетки растут с удельной скоростью, равной 1,65 ч⁻¹; клетки, содержащие плазмиду рBR328, имеют удельную скорость 1,51 ч⁻¹, клетки, содержащие плазмиду рBR325, — 1,42 ч⁻¹.

Вопрос о влиянии плазмид на рост клеток и роли различных факторов, определяющих взаимоотношения плазмиды и клетки-хозяина, достаточно подробно обсуждается в литературе. Причин, приводящих к уменьшению скорости роста клеточной популяции при введении плазмид, по-видимому, несколько. Первая заключается в том, что вынужденная необходимость синтезировать белки, не участвующие в собственном метаболизме, накладывает на клетки дополнительную нагрузку, вызывающей замедление ее роста.

Вторая фундаментальная причина, приводящая к уменьшению скорости роста (р⁺)-клеток, — это конкуренция хромосомной и плазмидной ДНК за компоненты, необходимые для протекания их процессов репликации. Действительно, имеются экспериментальные данные, которые показывают, что чем больше в клетке плазмид, тем меньше удельная скорость роста популяции. Рассмотрим простейшую кинетическую модель, из которой следует, что конкуренция между генами и плазмидами за факто-

ры репликации должна приводить к замедлению роста (р+)-клеток. Кинетическую схему такого процесса можно представить в следующем виде:



где A — фактор, участвующий в репликации плазмидной и хромосомной ДНК; P и C — соответственно специфические центры комплексообразования фактора A с плазмидой и хромосомой; PA и CA — соответствующие комплексы; K_p и K_c — соответствующие константы связывания; k_p и k_c — эффективные константы скорости репликации плазмиды и хромосомы.

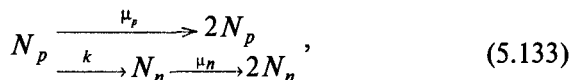
В режиме, при котором фактор A является лимитирующим, стационарное уравнение скорости роста клеток будет иметь вид

$$v_c = \frac{\frac{k_c A_0 C_0}{K}}{1 + \frac{P_0}{K_p} + \frac{C_0}{K_c}}, \quad (5.132)$$

Видно, что скорость роста клеток в соответствии с уравнением (5.132) должна падать с увеличением концентрации плазмидных центров, связывающих фактор A , т.е. уменьшаться с ростом числа плазмид в клетке.

Меньшая скорость роста (р+)-клеток по сравнению с (р-)-клетками будет однозначно приводить к вытеснению из популяции клеток, несущих плазмидные гены. Это один из наиболее мощных факторов, определяющих нестабильность плазмидного гена.

Второй существенный фактор связан с процессами мутационного характера, приводящими к «выщеплению» плазмид в силу специфической или неспецифической деструкции. Приводимый кинетический анализ позволяет не только на количественном уровне описать процессы, приводящие к потере плазмидного гена, но и дает методы дискриминации различных механизмов явления. Представим кинетическую схему процесса следующим образом:



где N_p — клетки несущие плазмидный ген; N_n — клетки, потерявшие плазмиду; μ_p и μ_n — удельные скорости роста соответственно (р+)- и (р-)-клеток. Процесс мутации (р+)-клеток в (р-)-клетки характеризуется константой скорости первого порядка k .

Система дифференциальных уравнений, описывающая кинетику процессов (5.133), имеет вид

$$\frac{dN_p}{dt} = \mu_p N_p - k N_p ;$$

$$\frac{dN_n}{dt} = \mu_n N_n + k N_p .$$

Решение системы дано функциями

$$N_p = N_{p0} \exp[(\mu_p - k)t] ; \quad (5.134)$$

$$N_n = \left(N_{n0} + \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right) \exp \left(\mu_n t - \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right) \exp[(\mu_p - k)t] . \quad (5.135)$$

Экспериментальные данные, как правило, представляются в форме доли клеток, несущих или не несущих плазмиды, в общей популяции клеток. По определению эта доля представляется выражениями

$$\eta_p = \frac{N_p}{N_n + N_p} ;$$

$$\eta_n = \frac{N_n}{N_n + N_p} . \quad (5.136)$$

Подстановка функций (5.134) и (5.135) в уравнения (5.136) приводит к выражениям (5.137), которые можно сопоставить с экспериментом:

$$\eta_p = \frac{N_{p0} \exp[(\mu_p - k)t]}{\left(N_{n0} + \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right) \exp \left[\mu_n t - \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right] \exp[(\mu_p - k)t] + N_{p0} \exp[(\mu_p - k)t]} ;$$

$$\eta_n = \frac{\left(N_{n0} + \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right) \exp \left[\mu_n t - \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right] \exp[(\mu_p - k)t]}{\left(N_{n0} + \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right) \exp \left[\mu_n t - \frac{k N_{p0}}{\mu_n + k - \mu_p} \right] \exp[(\mu_p - k)t] + N_{p0} \exp[(\mu_p - k)t]} . \quad (5.137)$$

Рассмотрим более подробно зависимость от времени доли (р+)-клеток. Уравнения (5.137) можно преобразовать к виду

$$\eta_p = \frac{1}{1 - \frac{k}{\Delta\mu + k} + \left(\frac{N_{p0}}{N_{p0}} + \frac{k}{\Delta\mu + k} \right) \exp[(\Delta\mu + k)t]}, \quad (5.138)$$

где $\Delta\mu = \mu_n - \mu_p$.

Если известно, что время одного «пассажа» постоянно, то уравнения (5.137), (5.138) описывают также изменение (р+)- и (р-)-клеток от числа генераций. На рис. 5.45 и 5.46 приведены теоретические кривые, рассчитанные по уравнению (5.138) при вариации параметров $\Delta\mu$ и k . Как следует из этих рисунков, вид функции определяется соотношением этих параметров. При $\Delta\mu > k$ имеет место четко выраженная лаг-фаза в изменении во времени доли (р+)-клеток, при $\Delta\mu < k$ кривые вырождаются в зависимость, близкую к экспоненциальной, при этом кинетика процесса определяется величиной k и становится нечувствительной к изменениям параметра $\Delta\mu$.

Рис. 5.46 иллюстрирует зависимость η_p при различных значениях k . При больших величинах константы скорости спонтанного мутационного процесса доля (р+)-клеток экспоненциально падает. Величина N_{p0}/N_{n0} определяет значение η_p в начальный момент времени и вид кинетической кривой. При $N_{p0}/N_{n0} \ll 1$ $\eta_p(0) \approx 1$. Заметное отклонение $\eta_p(0)$ от единицы показывает, что в популяции микроорганизмов существенную долю составляют (р-)-клетки.

Сопоставление теоретических уравнений (5.137) и (5.138) с экспериментальными данными приведено на рис. 5.47 и 5.49. Видно, что теоретическим кривым хорошо соответствуют данные эксперимента.

Проведенный кинетический анализ дает ряд достаточно очевидных рекомендаций, помогающих успешно бороться с нестабильностью плазмидного чужеродного гена. Анализ позволяет применять по крайней мере три подхода:

1. Использование селективного давления на клеточную популяцию, блокирующую рост (р+)-

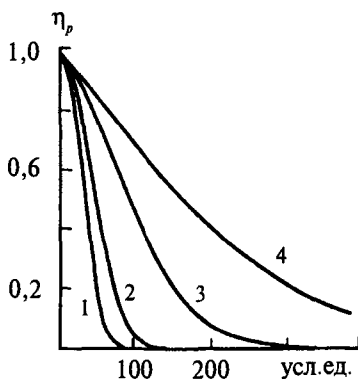


Рис. 5.45. Расчетные кривые доли (р+)-клеток.

$k = 0,003$, $N_{p0}/N_{n0} = 0,001$. $\Delta\mu$: 1 — 0,1; 2 — 0,6; 3 — 0,03; 4 — 0,05. По оси абсцисс — время, усл. ед.

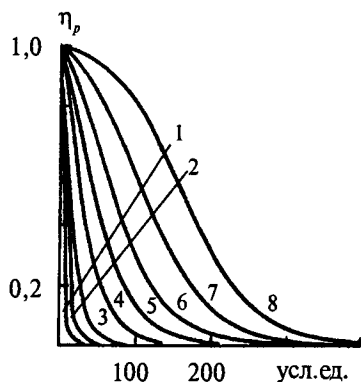


Рис. 5.46. Расчетные кривые доли (p⁺)-клеток.

$\Delta\mu = 0,02$; $N_{m0}/N_{p0} = 0,001$. k : 1 — 0,2; 2 — 0,08; 3 — 0,05; 4 — 0,015; 5 — 0,01; 6 — 0,005; 7 — 0,002; 8 — 0,0005.

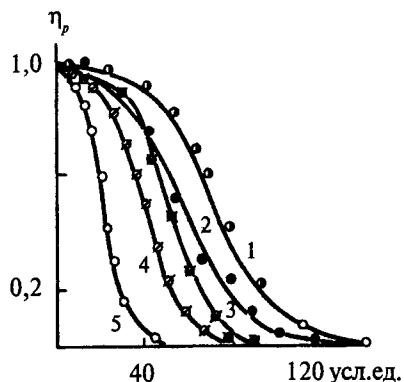


Рис. 5.47. Экспериментальные зависимости $\eta_p(t)$ для плазмиды pBOE106 в растущей популяции *E.coli*, штамм MC100.

Температура: 1 — 27; 2 — 30; 3 — 32; 4 — 33, 5 — 34°C. По оси абсцисс — число генераций популяции.

клеток. Такой подход является классическим, широко применяется при селекции микроорганизмов и связан, как правило, с введением в плазмиду фактора устойчивости к среде (устойчивость к антибиотику, утилизация ключевого метаболита и др.). Действительно, из уравнения (5.137) следует, что (при селек-

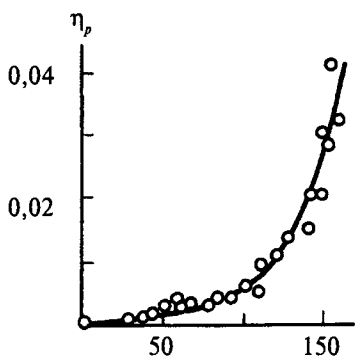


Рис. 5.48. Экспериментальная зависимость доли (p⁻)-клеток в процессе роста *E.coli*, штамм B377, плазмиды pMC169.

По оси абсцисс — число генераций популяции.

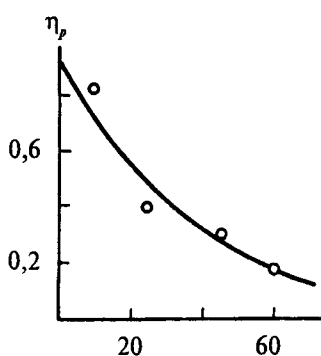


Рис. 5.49. Экспериментальные данные по зависимости η_p для плазмиды BOE147 в растущей популяции *E.coli*, штамм MC1000.

По оси абсцисс — число генераций популяции.

тивном давлении, при блокировке роста (р-)-клеток) $\mu_n = 0$, $\eta_p = 1$ во всем интервале времен протекания процесса.

2. Как видно из рис. 5.47, определенные результаты по стабилизации гена могут быть получены за счет температурного режима роста популяции. Видно, что величина $\Delta\mu$ закономерно уменьшается с понижением температуры роста. Таким образом, для стабилизации системы роста популяции с плазмидами, культивирование следует проводить при возможно низких температурах, обеспечивающих тем не менее жизнеспособность клеточной популяции.

3. Качественные изменения в кинетическое поведение плазмидонесущей микробной популяции может внести метод иммобилизации клеток. При иммобилизации клеток, как правило, замедляется их рост, что может приводить к ситуациям, при которых $\Delta\mu = 0$. Время работы плазмидного гена в этих условиях увеличивается.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Как изменяется копияность плазмид в процессе роста клеточных популяций? 2. Какие типы кинетического поведения плазмид вы знаете? Чем определяется тип поведения? 3. Получите уравнение роста популяции клеток и плазмид, используя представления об экспоненциальной управляющей функции. 4. При каких условиях на кинетических кривых плазмид первого типа поведения должен наступить максимум? минимум? 5. Каковы причины потери плазмид в процессе многократного культивирования генно-инженерных клеток? 6. Получите уравнение динамики изменения (р+)- и (р-)-клеток в процессе многократных «пассажей».

5.8. Культивирование клеток в режиме хемостата

В банке живет хламидамонада,
Пиво не пьет, не ест шоколада —
А много ли ей, малюсенькой,
надо?

Студенческая песня

Культивирование клеток в открытых системах (проточных реакторах) — один из наиболее перспективных и развитых способов их выращивания. Преимущества этого способа культивирования состоят в стандартности условий проведения процесса, высокой производительности, возможностях тонкого управления кинетикой роста популяции. Кинетические закономерности

роста и эволюции клеточных популяций в открытых системах достаточно просты и наиболее изучены. Ниже анализируются основные уравнения, описывающие рост популяции в режиме хемостата, при этом особое внимание обращено на дискриминацию механизмов и условий роста, на сопоставление теории и эксперимента, на определение экспериментальных данных параметров роста культур.

Неосложненный рост

Рассмотрим кинетические закономерности роста клеток в открытой системе при непрерывной подаче субстрата.

Представим, что в сосуд объемом V подается раствор лимитирующего субстрата с концентрацией S_0 и объемной скоростью u . Под действием клеток субстрат конвертируется в продукт (продукты) P и осуществляется прирост биомассы. Поскольку система ограничена по объему, избыточный раствор непрореагировавшего субстрата, продукты реакции и часть клеток популяции выводятся из реакционного объема с той же объемной скоростью u . Предполагается, что режим перемешивания в реакторе организован таким образом, что обеспечивает постоянные по всему объему концентрации субстрата S , продукта P и клеток M . Эти условия так называемого безградиентного ферментера известны как режим *хемостата*.

Через некоторое время в системе устанавливаются стационарные концентрации исходного субстрата, продуктов реакции, числа клеток (биомассы) популяции. Рассмотрим, каково значение стационарных концентраций компонентов процесса, как эти стационарные концентрации зависят от параметров роста культуры, от скорости ввода в систему субстрата.

Динамика изменений в системе концентраций клеток M определяется скоростью роста культуры μ и скоростью вывода ее из фермента:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - \frac{u}{V} M. \quad (5.139)$$

Параметр u/V , имеющий размерность обратного времени, называется *скоростью разбавления* D .

Экспериментально параметр D может быть найден при изучении кинетики вымывания какого-либо вещества A , присутствующего в ферменте в начальный момент времени $t = 0$. Скорость вывода вещества A описывается уравнением

$$-dA/dt = DA,$$

которое приводит к экспоненциальной зависимости следующего вида:

$$A(t) = A_0 \exp[-Dt] , \quad (5.140)$$

где A_0 — концентрация в начальный момент времени.

Линеаризация экспериментальных данных в координатах $\ln [A(t)/A_0] = -Dt$ позволяет утверждать, что используемая система достаточно хорошо описывается уравнениями идеального, безградиентного реактора с перемешиванием и позволяет определить параметр D .

Изменение концентрации исходного субстрата будет описываться дифференциальным уравнением

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \frac{1}{Y_s} \mu(S)M .$$

Первое слагаемое в этом уравнении характеризует скорость ввода субстрата, второе — вывод из системы непрореагировавшего субстрата, третье — расход субстрата в результате его потребления для роста культуры.

Соответственно концентрация продукта ферментационной конверсии P также зависит от скорости роста клеток и скорости протока:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_P} \mu(S)M - DP .$$

Первое слагаемое характеризует скорость ферментационного накопления продукта, второе — вывод продукта из ферментера.

Если принять, что удельная скорость роста клеточной популяции как функция концентрации субстрата дается уравнением Моно, то все кинетические закономерности роста культуры в режиме хемостата описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m SM}{K_S + S} - DM \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_s} \frac{\mu_m SM}{K_S + S} \\ \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_P} \frac{\mu_m SM}{K_S + S} - DP . \end{cases} \quad (5.141)$$

Если система функционирует при постоянной скорости разбавления D достаточно большое время, то концентрации био-

массы, субстрата и продукта становятся постоянными, не зависящими от времени. В этих условиях

$$\frac{dM}{dt} = 0; \quad \frac{dS}{dt} = 0; \quad \frac{dP}{dt} = 0.$$

Условия равенства нулю во времени всех компонентов процесса соответствуют условиям стационарности.

Из уравнения (5.140) в условиях стационарности следует ряд важных выводов.

1. В стационарном режиме удельная скорость роста клеток соответствует скорости разбавления. При $dM/dt = 0$ из уравнения (5.141) следует: $\mu(S) = D$. Таким образом, скоростью разбавления в рамках определенных ограничений (см. ниже) можно задавать удельную скорость роста культуры.

2. Стационарная концентрация субстрата $S_{ст}$ в ферменте определяется скоростью разбавления и кинетическими параметрами роста клеток и не зависит от начальной концентрации субстрата. Из уравнений (5.141) следует:

$$S_{ст} = \frac{DK_S}{\mu_m - D}. \quad (5.142)$$

Стационарная концентрация субстрата в ферменте тем меньше, чем больше максимальная удельная скорость роста культуры и чем

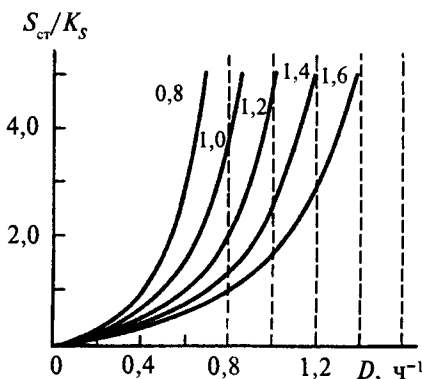


Рис. 5.50. Зависимость относительной стационарной концентрации субстрата $S_{ст}/K_S$ от скорости разбавления D при различных значениях μ (ч^{-1}) (цифры на кривых).

Пунктирные линии: $\mu_m = D$.

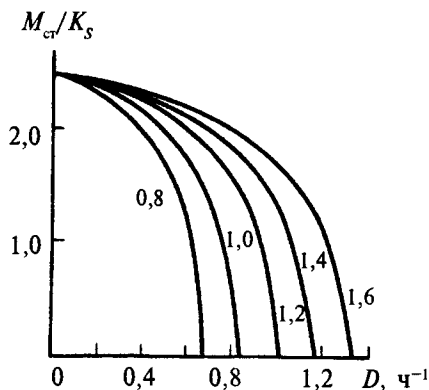


Рис. 5.51. Зависимость относительной стационарной концентрации биомассы ($M_{ст}/K_S$) от скорости разбавления при различных значениях μ_m (ч^{-1}) (цифры на кривых).

$S_0/K_S = 5,0$; $Y_S = 0,5$.

меньше значения константы сродства клетки к субстрату K_s . Важно подчеркнуть, что S_{cm} не зависит от концентрации вводимого субстрата. Это позволяет говорить об аутостабилизации условия роста культуры по субстрату в режиме хемостата. Зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления имеет сложный характер. При низких скоростях разбавления в условиях $D \ll \mu_m$ стационарная концентрация субстрата линейно зависит от скорости разбавления (рис. 5.50):

$$S_{cm} \approx \frac{K_s}{\mu_m} D.$$

При скоростях разбавления, приближающихся к μ_m , стационарная концентрация субстрата начинает расти.

3. Стационарная концентрация биомассы линейно зависит от концентрации вводимого в ферментер раствора субстрата. Из уравнений (5.141) следует

$$M_{cm} = Y_S \left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right). \quad (5.143)$$

Зависимость стационарной концентрации биомассы от скорости разбавления приведена на рис. 5.51. Видно, что $M_{cm} \approx S_0 Y_S$ при $D \rightarrow 0$

Экспериментально наблюдаемая зависимость M_{cm} и S_{cm} от концентрации вводимого субстрата приведена на рис. 5.52. Видно, что стационарная концентрация метанола при постоянной D не зависит от концентрации вводимого раствора субстрата, а стационарная концентрация биомассы в условиях неосложненного роста линейно возрастает с увеличением начальной концентрации метанола.

4. Рост культуры в режиме хемостата характеризуется критической скоростью разбавления D_c , выше которой рост популяции не наблюдается. При скоростях раз-

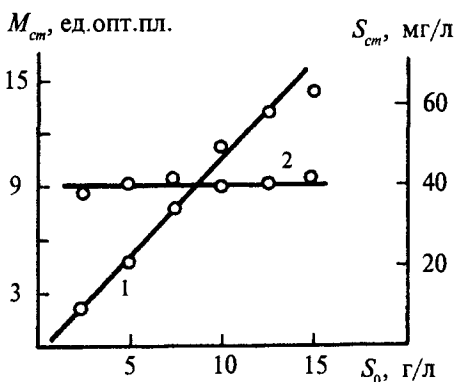


Рис. 5.52. Эффект аутостабилизации метанола, лимитирующего рост популяции псевдомонад в проточной культуре при $D = 0,35 \text{ ч}^{-1}$:

1 — концентрация биомассы, 2 — концентрация метанола.

бавления, соизмеримых с максимальной скоростью роста клеток, культура «вымывается» из ферментера. Значение критической скорости разбавления может быть найдено из уравнения (5.143) при условии, что $M_{cm} = 0$ (при этом $S = S_0$):

$$D_c = \frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0}.$$

Графически D_c может быть найдено из точки пересечения кривых с осью абсцисс (см. рис. 5.51).

5. *Стационарная концентрация продукта линейно связана с концентрацией вводимого субстрата:*

$$P_{cm} = \frac{M_{cm}}{Y_P} = \frac{Y_S}{Y_P} \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_m - D} \right).$$

Зависимость стационарного состояния концентрации продукта от S_0 и D аналогична зависимости от переменных стационарной концентрации клеток.

Определение параметров роста культуры из данных по стационарным состояниям компонентов процесса

Определение таких параметров, как Y_s , Y_p , μ_m , K_s , необходимо при описании роста клеток в режиме хемостата. Наиболее просто могут быть найдены экономические коэффициенты Y_s и Y_p . Для этого необходимо знать стационарные концентрации субстрата, биомассы и продукта. В рамках рассматриваемого приближения предполагается, что Y_s и Y_p постоянны в течение развития процесса и не зависят от скорости потока. Это допущение в большинстве случаев оправдано, хотя возможны и существенные отклонения. Проверкой этого предложения является независимость найденных параметров Y_s и Y_p от скорости разбавления.

Кроме того, значение Y_s также может быть найдено как тангенс угла наклона зависимости M_{cm} от S_0 . Например, из данных, представленных на рис. 5.52, следует, что Y_s для роста изученной культуры в исследованном диапазоне концентраций равно 1,12 оптических ед/(г/л).

Рассмотрим некоторые методы определения параметров роста культур клеток в условиях хемостата.

Изучение зависимости стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления. Воспользуемся одной из анаморфоз уравнения (5.142):

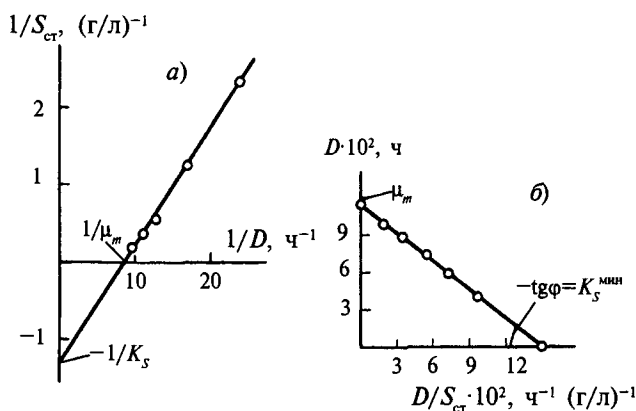


Рис. 5.53. Хемостатическое культивирование *Thibacillus ferrooxidans* [Гришин и др., 1983]. pH = 2,3; 30°C, Fe⁺⁺ = 9 г/л.

a — графический метод определения параметров; *б* — линейаризация в координатах уравнения (5.144).

$$\frac{1}{S_{cm}} = \frac{\mu_m}{K_s} \frac{1}{D} - \frac{1}{K_s}$$

или

$$D = \mu_m - K_s \frac{D}{S_{cm}}. \quad (5.144)$$

Согласно полученным уравнениям зависимость $1/S_0$ от $1/D$ должна представлять собой прямую с тангенсом угла наклона μ_m/K_s ; отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $-1/K_s$ (рис. 5.53). Значение μ_m может быть найдено из длины отрезка, отсекаемого прямой на оси абсцисс. Использование уравнения (5.144)

также позволяет графически найти значения μ_m и K_s . Тангенс угла наклона дает значения K_s ; отрезок, отсекаемый на оси D , μ_m .

Изучение зависимости стационарной концентрации биомассы от скорости разбавления и вводимой концентрации субстрата. Как следует из уравнения (5.143), стационарная концентрация биомассы линейно зависит от начальной концентрации субстрата (рис. 5.54). Из данных рисунка можно определить Y_s и отрезок, отсекаемый на оси абсцисс:

$$a = -\frac{DK_s Y_s}{\mu_m - D}.$$

В случае, если Y_s не зависит от скорости потока в ферменте,

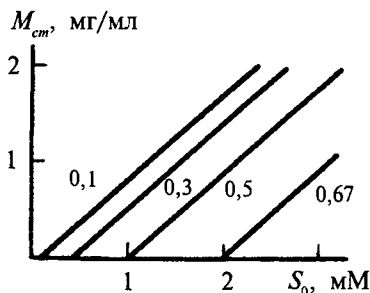


Рис. 5.54. Теоретические зависимости стационарной концентрации биомассы от начальной концентрации субстрата при различных скоростях разбавления (цифры на прямых, $D \text{ ч}^{-1}$).

$\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$, $K_S = 1 \text{ мМ}$, $Y_S = 1,0 \text{ мг}$.

тангенсы углов наклона прямых M_{cm} от S_0 должны быть одинаковы. Если M_{cm} известно, то параметры роста культуры μ_m и K_S можно установить, используя линейную анаморфозу уравнения (5.143):

$$\frac{1}{S_0 - M_{cm} / Y_S} = \frac{\mu_m}{DK_S} - \frac{1}{K_S}.$$

Так же как и в случае уравнения (5.144), тангенс угла наклона зависимости $1/S_0 - M_S/Y_S$ от $1/D$ дает значение μ_m/K_S , отрезок, отсекаемый на оси ординат, $-1/K_S$. Полученное уравнение

полностью соответствует уравнению (5.144), поскольку $S_{cm} = S_0 - M_S/Y_S$.

Совершенно аналогично параметры роста культуры могут быть найдены и при использовании другой анаморфозы

$$\frac{D}{S_0 - M_{cm} / Y_S} = \frac{\mu_m}{K_S} - \frac{D}{K_S}$$

из зависимости $D/(S_0 - M_{cm}/Y_S)$ от D .

Кинетические параметры роста популяции могут быть установлены также и при исследовании стационарного уровня продукта как функции скорости разбавления. Из уравнения (5.143) видно, что стационарная концентрация продукта связана со стационарной концентрацией биомассы. Поэтому для определения параметров роста из данных по стационарным уравнениям продукта полностью применимы методы, описанные при исследовании системы по накоплению биомассы.

Ингибирование субстратом

Рассмотрим закономерности развития культуры в хемостате, если рост клеточной популяции ингибируется избытком субстрата. Основные дифференциальные уравнения, описывающие кинетику процесса, имеют вид базовых уравнений типа (5.141), только удельную скорость роста культуры как функцию концентрации субстрата надо представить в виде уравнения

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_S}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}.$$

В стационарном состоянии кинетику процесса описывает система уравнений

$$\begin{cases} \frac{\mu_m S_{cm}}{K_S + S_{cm} + S_{cm}^2 / K_i} = D \\ D(S_0 - S_{cm}) = \frac{\mu_m S_{cm}}{K_S + S_{cm} + S_{cm}^2 / K_i} \frac{M_{cm}}{Y_S} \\ \frac{\mu_m S_{cm} M_{cm}}{K_S + S_{cm} + S_{cm}^2 / K_i} = DP_{cm} Y_P. \end{cases} \quad (5.145)$$

Так же как и в случае неосложненного ингибирования процесса, видно, что скоростью разбавления можно задавать системе удельную скорость роста популяции $\mu(S) = D$.

Принципиальной особенностью системы с ингибированием избытком субстрата в проточном режиме является существование двух устойчивых стационарных состояний. Это следует из анализа уравнений (5.145). Рассмотрим его графическое решение (рис. 5.55). Прямые, параллельные оси S , представляют собой функции $\mu = \text{const} = D$. Пересечения этих прямых с графиком $\mu(S)$ дают значения S_{cm} , представляющие собой корни уравнения (5.145). Из рисунка видно, что система может функционировать в трех принципиально разных режимах.

Если $D \gg D_c$, где D_c — некоторая критическая скорость разбавления, то в системе вообще невозможно образование стационарного состояния, кривая $\mu(S)$ и прямая $\mu = D$ не имеют общей точки пересечения. Эту ситуацию иллюстрирует прямая 1, которая соответствует $D = \mu_m S_0 / (K_S + S_0)$. Таким образом,

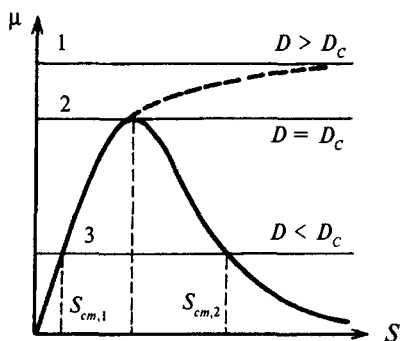


Рис. 5.55. Графическое определение параметров роста культуры в режиме хемостата при наличии процессов ингибирования субстратом.

в отличие от процесса, не осложненного ингибированием субстратом, критическая скорость разбавления, при которой возможно стационарное состояние, для системы с ингибированием субстратом ниже $\mu_m S_0 / (K_s + S_0)$.

При $D = D_c$ система может иметь одно стационарное состояние. Это иллюстрируется пересечением $\mu(S)$ с прямой 2 в точке максимума.

Наконец, если $D < D_c$, в ферментере могут быть реализованы два стационарных состояния. Прямая 3 с кривой $\mu(S)$ имеет две точки пересечения, два стационарных состояния, характеризующихся различными значениями $S_{cm1,2}$, $M_{cm1,2}$.

Ингибирование продуктом

Рассмотрим закономерности культивирования клеток в открытой проточной системе с учетом эффектов ингибирования образующимися продуктами для двух основных механизмов ингибирования — *конкурентного* и *неконкурентного*.

Система уравнений, описывающая кинетику процесса в режиме хемостата в том случае, если клетка «чувствует» присутствие продукта, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dM}{dt} = \mu M - DM \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \mu M / Y_S \\ \frac{dP}{dt} = \frac{\mu M}{Y_P} - DP \end{cases} \quad (5.146)$$

Удельная скорость роста как функция концентрации субстрата и продукта реакции будет иметь вид

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_i}\right) + S} \quad \text{— конкурентное ингибирование;} \quad (5.147)$$

$$\mu = \frac{\mu_m S}{\left(1 + \frac{P}{K_i}\right)(K_s + S)} \quad \text{— неконкурентное ингибирование.} \quad (5.148)$$

Конкурентное ингибирование продуктом. В этом случае

$$S_{cm} = \frac{K_S \left(1 + \frac{S_0 Y_S}{K_i Y_P} \right)}{\left(\frac{\mu_m}{D} - 1 \right) + \frac{K_S Y_S}{K_i Y_P}}.$$

Данное уравнение описывает зависимость стационарной концентрации субстрата от концентрации вводимого субстрата, скорости разбавления, кинетических параметров роста культуры, константы равновесия ингибирования продуктом. Следует подчеркнуть важную особенность ферментационного процесса с ингибированием продуктом: стационарный уровень концентрации субстрата является функцией начальной его концентрации. Это отличает процесс с ингибированием продуктом от процесса с неосложненным ростом.

Неконкурентное ингибирование продуктом. В этом случае

$$S_{cm} = \frac{K_S}{2} \left[\frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} - 1 + \frac{S_0}{K_S} \sqrt{\left(1 - \frac{S_0}{K_S} - \frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} \right)^2 + 4 \left(\frac{S_0}{K_S} + \frac{1}{\alpha} \right)} \right]. \quad (5.149)$$

Рассмотрим два важных частных случая.

1. *Относительно слабое ингибирование продуктом.* В этом режиме (5.149) приобретает вид

$$S_{cm} = \frac{K_S}{2} \left[\frac{1 - \mu_m/D}{a} + \sqrt{\left[\frac{\mu_m}{Da} - \frac{1}{a} \right]^2 + \frac{4}{a}} \right],$$

где $a = (Y_S K_S / Y_P K_P)$ — безразмерный параметр, характеризующий относительную эффективность ингибирования клеточного роста продуктом. Можно показать, что это уравнение соответствует кинетике неосложненного роста.

2. *Сильное ингибирование продуктом.* В этом режиме из (5.149) имеем

$$S_{cm} = \frac{K_S}{2} \left[\frac{S_0}{K_S} - 1 + \sqrt{\left(1 - \frac{S_0}{K_S} \right)^2 + 4 \frac{S_0}{K_S}} \right].$$

В данном случае стационарная концентрация субстрата соответствует начальной концентрации, вводимой в ферментер, концентрация биомассы равна нулю, стационарного роста культуры нет.

Как видно из уравнения (5.149), точное описание кинетики роста культуры клеток в хемостате в условиях неконкурентного ингибирования продуктом содержит громоздкую иррациональную функцию, в силу чего рассмотрение решения и сопоставление с ним экспериментальных данных весьма неудобно. Для определения параметров роста культуры воспользуемся достаточно точным приближенным решением. Если процесс проводится в режиме, когда

$$\gamma = \frac{4\left(\frac{S_0}{K_S} + \frac{1}{a}\right)}{\left[\left(1 + \frac{\mu_m}{aD}\right) - \left(\frac{S_0}{K_S} + \frac{1}{a}\right)\right]^2} \ll 1, \quad (5.150)$$

то иррациональная часть уравнения может быть разложена в быстросходящийся ряд относительно параметра γ . Неравенство (5.150) хорошо выполнимо в условиях

$$D \ll \frac{\mu_m}{a \frac{S_0}{K_S} + 1 - a}. \quad (5.151)$$

Из (5.151) следует, что чем больше концентрация субстрата, тем меньше должна быть скорость разбавления, для которой справедливо такое неравенство, т.е. $\gamma \ll 1$. В режиме (5.150) или (5.151) стационарная концентрация субстрата может быть представлена уравнением

$$S_{cm} \approx \frac{K_S + aS_0}{\left(\frac{\mu_m}{D} - 1\right) + (a + 1)}. \quad (5.152)$$

Уравнение (5.152) очень похоже на уравнение, описывающее кинетику с конкурентным ингибированием продуктом. Таким образом, для определения параметров роста культуры клеток в условиях неконкурентного ингибирования продуктом можно воспользоваться теми методами и подходами, которые рассмотрены выше для механизма конкурентного ингибирования продуктом. Однако необходимо иметь в виду, что для случая неконкурентного ингибирования уравнение (5.152) имеет приближенный характер и тем точнее описывает решение, чем ниже скорость разбавления и ниже концентрация вводимого субстрата.

Ингибирование ионами водорода

При культивировании клеточных культур весьма часто реализуются ситуации, когда продуктами ферментативного превращения являются кислоты, например молочная, янтарная, уксусная, накопление которых приводит к изменению рН и изменению скорости роста клеточной культуры.

Процесс ингибирования ионами водорода роста клеточной культуры может носить как конкурентный, так и неконкурентный характер. Для предотвращения процесса ингибирования кислотными продуктами обычно вводят с постоянной скоростью v_0 растворы щелочей.

Можно показать, что в режиме ингибирования ионами водорода и при нейтрализации кислотного продукта скорость разбавления имеет ограничение как сверху, так и снизу:

$$\frac{\mu_m S_0}{K_S + S_0} > D > \frac{v_0}{K_i \left(1 + a \frac{S_0}{K_S} \right)}. \quad (5.153)$$

Таблица 5.8

Кинетические закономерности роста клеточных популяций в режиме хемостата

Механизм процесса	Стационарная концентрация субстрата	Стационарная концентрация биомассы	Стационарная концентрация продукта
Неосложненный рост	$S_{cm} = \frac{DK_S}{\mu_m - D}$	$M_{cm} = \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_m - D} \right) Y_S$	$P_{cm} = \frac{Y_S}{Y_P} \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_m - D} \right)$
Ингибирование субстратом	$S_{cm,1} = \frac{DK_S}{\mu_m}$ $(D \ll D_c)$	$M_{cm,1} = \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_m} \right) Y_S$	$P_{cm,1} = \frac{Y_S}{Y_P} \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_m} \right)$
	$S_{cm,2} = \frac{\mu_m K_i}{D}$	$M_{cm,2} = \left(S_0 - \frac{\mu_m K_i}{D} \right) Y_S$	$P_{cm,2} = \frac{Y_S}{Y_P} \left(S_0 - \frac{\mu_m K_i}{D} \right)$
Ингибирование продуктом	$S_{cm} = \frac{\alpha S_0 D}{\mu_m + \alpha D}$	$M_{cm} = Y_S S_0 \frac{\mu_m - D}{\mu_m + \alpha D}$	$P_{cm} = \frac{Y_S}{Y_P} S_0 \frac{\mu_m - D}{\mu_m + \alpha D}$

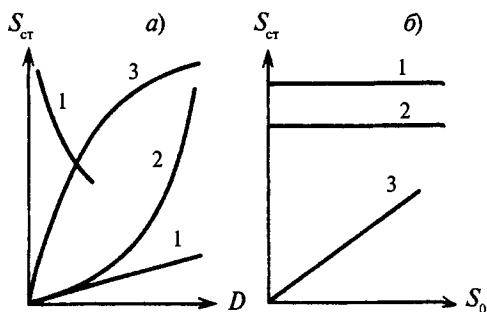


Рис. 5.56. Зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления (а) и от начальной концентрации субстрата (б) в режиме хемостата.

1 — ингибирование субстратом, 2 — неосложненный рост, 3 — ингибирование продуктом.

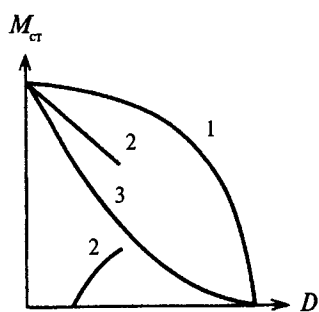


Рис. 5.57. Зависимость стационарного уровня биомассы от скорости разбавления.

1 — неосложненный рост, 2 — ингибирование избытком субстрата, 3 — ингибирование продуктом.

Культивирование клеток в проточном режиме имеет ряд преимуществ по сравнению с периодическим культивированием. Основные преимущества связаны с возможностью интенсификации процесса, возможностью осуществлять непрерывное культивирование клеток в постоянных условиях, управление скоростью роста с помощью скорости разбавления. Уравнения, описывающие рост популяций в режиме хемостата, максимально просты. Достаточно просто и определение основных кинетических параметров в этих условиях. В табл. 5.8 перечислены основные закономерности роста популяций в режиме хемостата. Рис. 5.56 и 5.57 иллюстрируют многообразие зависимостей, которые могут наблюдаться в эксперименте в этих условиях.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение режима хемостата. 2. Каковы преимущества непрерывного культивирования? 3. Какие основные закономерности роста популяций могут быть в режиме хемостата? Выпишите основные уравнения. 4. Как определить параметры роста μ_m , K_s , Y_s из данных по зависимости стационарной концентрации биомассы и субстрата от скорости развития и S_0 ?

5.9. Компьютерное моделирование кинетики роста клеточных популяций. Уравнения роста в безразмерных переменных

Мне пришло в голову, что обычное интервью с дьяволом или волшебником можно с успехом заменить искусным использованием положений науки.

Г. Уэллс

Методы математического моделирования с использованием вычислительных машин все шире применяются для изучения механизмов, лежащих в основе роста и развития клеточных популяций. С одной стороны, эти подходы обеспечивают возможность фундаментального исследования динамики процессов с учетом всей совокупности эффектов, усложняющих рост популяции, с другой — позволяют вести обоснованный поиск технологических режимов, тонкого управления процессом роста клеток.

Математические модели клеточной кинетики, о которых пойдет речь, представляют собой математические описания, дающие возможность получить зависимость скорости превращений субстратов, а также скорости роста биомассы от концентрации субстратов и клеток. Для кинетической модели основными элементами являются субстраты и клетки, участвующие в процессе, а также стадии превращения этих субстратов в продукты.

Любая постановка задачи по динамике роста и развития клеточных популяций начинается с формулировки гипотезы исследователя и построения кинетической схемы изучаемого процесса. При этом исследователь конкретизирует конечные продукты, начальные субстраты, а также ферменты и другие внутриклеточные регуляторы, влияющие на кинетику клеточного синтеза. Затем записываются уравнения, представляющие собой математическую модель процесса. Центральным моментом построения уравнений динамики является выделение ключевых реакций, скорость которых ограничивает интенсивность накопления целевого продукта.

При построении модели необходимо учитывать различные ограничивающие факторы и требования. Предположим, что реакция осуществляется в закрытой системе. Тогда к кинетическим характеристикам предъявляются следующие требования:

1. Общая масса системы не меняется (закон сохранения массы).

2. Отрицательные концентрации не могут существовать.

3. Скорость реакции является непрерывной функцией концентраций реагентов. Математически это означает, что функция изменения концентрации во времени не должна иметь разрывов.

Таким образом, исследователь при решении каждой конкретной задачи по управляемому биосинтезу проходит следующие этапы:

1. Гипотеза исследователя.

2. Логическая модель (кинетическая схема процесса).

3. Математическая модель процесса.

4. Интегрирование системы уравнений.

5. Идентификация параметров модели (дискриминация механизмов).

6. Проверка адекватности модели.

7. Использование математической модели для прогнозирования и управления процессом.

Необходимость использования ЭВМ в анализе закономерностей клеточного роста определяется главным образом возможностями ЭВМ провести численное интегрирование систем дифференциальных уравнений, описывающих развитие во времени клеточного процесса. Большая группа кинетических задач может найти кинетическое описание и решение лишь при использовании ЭВМ.

Остановимся на двух понятиях, которые сформулированы и решаются в рамках кинетического моделирования, — это так называемые прямая и обратная кинетические задачи.

Прямая кинетическая задача — это расчет состава многокомпонентной реагирующей смеси и скоростей реакции на основе заданной кинетической модели с известными или предполагаемыми параметрами. Надежность решения прямой задачи зависит от того, находятся ли в нашем распоряжении достоверные значения параметров, полученные из теоретических соображений или из специальных экспериментов, или они отсутствуют.

Обратная кинетическая задача — восстановление на основе экспериментальных данных вида кинетической модели и ее параметров. Универсального метода решения обратной задачи не существует. Ее решение чаще всего находят, перебирая серию прямых задач. При этом математической обработке предшествует качественный анализ экспериментальных данных, цель которого — резко сократить число рассматриваемых гипотез.

Численное интегрирование уравнения скорости роста клеточной популяции

Кинетические закономерности роста клеточной культуры в большинстве случаев достаточно сложны. Механизмы развития систем, включающие стадии автокаталитического увеличения концентраций катализаторов, как правило, характеризуются кинетическими кривыми сложного характера, требующими весьма изощренного и тонкого анализа. Выше были рассмотрены аналитические приближения к изучению кинетики роста популяции и идентификации механизма роста. Разработанные подходы, основанные на интегральных формах скорости роста культуры, дают в большинстве случаев достаточно точную информацию о механизме процесса и позволяют определить наиболее важные параметры, входящие в уравнение скорости.

С точки зрения экспериментатора существенным недостатком использования интегральных уравнений роста является применение достаточно громоздких функций определяемых переменных. Проводя изучение процесса роста популяции, экспериментатор на опыте измеряет изменение во времени таких переменных, как плотность культуры, концентрация исходного субстрата, концентрация промежуточных или конечных продуктов. Теоретическое рассмотрение процесса роста в рамках интегральных уравнений не дает явной связи между этими переменными и временем. Интегрирование уравнений скорости роста во всех случаях, за исключением начального приближения (экспоненциальной фазы роста), приводит к неявным функциям.

Можно думать, что различные механизмы развития процесса (например, процессы с ингибированием продуктом или субстратом) должны характеризоваться некоторыми особенностями кривой роста, которые выявляются при визуальном анализе получаемой кинетической кривой. Для этого необходимо иметь типичные теоретические кинетические кривые роста для процессов, протекающих по различным механизмам. Такую возможность обеспечивает численное интегрирование уравнений роста популяции. Интегрирование может быть проведено с любой точностью, существенно превышающей точность экспериментального исследования, и могут быть получены численные явные функции, связывающие экспериментально определяемые величины со временем.

Преимущества подхода, основанного на кинетическом моделировании с помощью вычислительной машины, становятся особенно очевидны при изучении динамики сложных клеточных

процессов, таких, например, как процессы в смешанных и симбиотрофных культурах. Для подобного рода систем аналитическое интегрирование уравнений скорости становится невозможным. Рассмотрим кинетические закономерности роста клеточных популяций при периодическом культивировании в рамках приближения, основанного на численном интегрировании уравнений скорости.

Уравнение скорости роста в безразмерных переменных

Для анализа кинетики процесса иногда полезно перейти к безразмерным относительным переменным

$$s = \frac{S}{S_0}; \quad m = \frac{M}{M_{\infty} - N_0}; \quad p = \frac{P}{P_{\infty}}; \quad \tau = \mu_m t, \quad (5.154)$$

где M_{∞} и P_{∞} — предельные концентрации биомассы и продукта, образующихся при бесконечно большом времени протекания процесса.

Важно отметить, что M_{∞} связано с начальными концентрациями субстрата и биомассы следующим отношением:

$$M_{\infty} = Y_s S_0 + N_0.$$

Переменные (5.154) позволяют анализировать кинетику процесса в безразмерных величинах, при этом значения s для всего развития процесса лежат в диапазоне от 1 до 0, значения m — от $N_0/(M_{\infty} - N_0)$ до $1 + N_0/(M_{\infty} - N_0)$. Время в указанных безразмерных переменных измеряется периодом, в течение которого в режиме максимальной удельной скорости роста концентрация биомассы увеличивается в e раз (при $\tau = 1$ абсолютное время равно $1/\mu_m$).

Дифференциальное уравнение клеточного роста в безразмерных переменных может быть записано так:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{K_S / S_0 + s}. \quad (5.155)$$

Дифференциальное уравнение скорости расхода субстрата при $Y_s = 1$ имеет такой же вид:

$$\frac{ds}{d\tau} = -\frac{ms}{K_S / S_0 + s}. \quad (5.156)$$

Видно, что форма уравнения скорости и вид кинетической кривой как интегральной формы дифференциального уравнения определяются лишь одним безразмерным параметром K_S/S_0 .

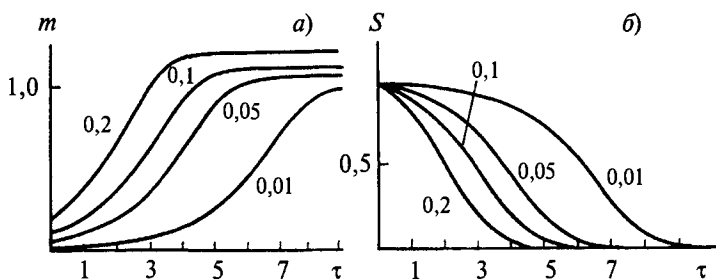


Рис. 5.58. Зависимость от времени концентрации биомассы (а), субстрата (б) для систем с различным количеством введенного инокулята (цифры на кривых). $K_S/S_0 = 0,5$.

Уравнения (5.155) и (5.156) были проинтегрированы с помощью ЭВМ (решение прямой задачи) (рис. 5.58). Видно, что при прочих равных условиях скорость процесса сильно зависит от количества введенного инокулята. Так, при переходе от посева с 1%-й культурой от максимально возможной плотности к посеву с 20%-й культурой время, в течение которого расходуется половина субстрата, уменьшается от 6,2 до 2,1 ед. τ .

Другим важным фактором, влияющим на динамику системы, является концентрация субстрата, точнее, безразмерное отношение K_S/S_0 (рис. 5.59). Как видно из рисунка, форма кривой и время, в течение которого конвертируется 50% субстрата (τ_{50}), зависят от этого отношения. При переходе от $K_S/S_0 = 2$ к $K_S/S_0 = 0,1$ τ_{50} меняется от 6,2 до 2 ед. τ .

Расчеты показывают, что существует линейная зависимость между τ_{50} и K_S/S_0 . Ее можно представить эмпирическим уравнением, которое следует из данных, приведенных на рис. 5.59:

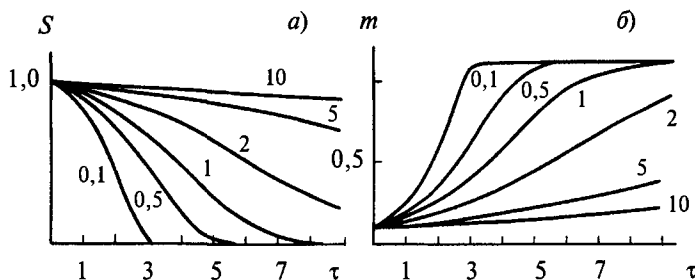


Рис. 5.59. Зависимость от времени концентрации субстрата (а) и биомассы (б) для систем с различными значениями параметра K_S/S_0 (цифры на кривых). $N_0/(M_\infty - N_0) = 0,1$.

$$\tau_{50} \approx 1,8 + 2,3 \frac{K_s}{S_0}.$$

При большой концентрации субстрата, существенно превышающей константу K_s , время полупревращения субстрата выходит на предельный уровень, приблизительно равный 1,8 ед. τ . Таким образом, если известно μ_m , то предельно возможное время полупревращения субстрата t_{50} в условиях его насыщающих концентраций может быть оценено по простейшему уравнению $t_{50} \approx 1,8/\mu_m$.

Эта оценка справедлива, когда количество инокулята около 10%. Как было показано, τ_{50} также зависит от количества изначально введенных в систему клеток (см. рис. 5.58).

Метод двойного зеркального отражения

Из данных, приведенных на рис. 5.59, следует, что кинетические кривые роста культур в условиях $K_s/S_0 \gg 1$ и $K_s/S_0 \ll 1$ существенно различаются по форме кинетической кривой. Для определения условий проведения эксперимента (выяснения области соотношения K_s/S_0) предлагается следующая достаточно простая процедура.

Кинетическая кривая роста при $\tau = \tau_{50}$ разбивается с помощью осей 1-1' и 2-2' на четыре квадранта (рис. 5.60), и двумя последовательными зеркальными отражениями часть кинетической кривой, лежащей в III квадранте, проецируется в I квадрант. Графически двойное зеркальное отражение можно получить, если из единицы вычесть ординаты точек кривой, лежащих в III квадранте (заштрихованная область), и отложить в I квадранте, взяв за нулевой отсчет времени $\tau = \tau_{50}$, и двигаться в обратном направлении.

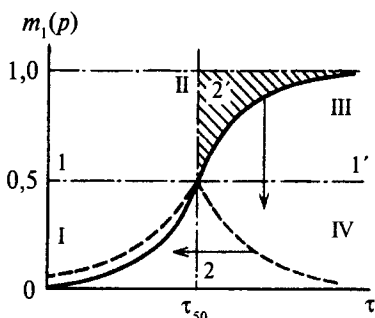


Рис. 5.60. Метод двойного зеркального отражения.

Кинетическая кривая роста в условиях $K_s \gg S_0$ практически симметрична. Двойное зеркальное отражение верхней части кривой должно либо совпадать с начальным участком кривой, либо лежать несколько выше (рис. 5.61, кривые 1). В условиях $K_s \ll S_0$ отражение верхнего участка кинетической кривой ляжет существенно ниже начального участка (рис. 5.61, кривые 2).

Таким образом, можно на основе качественного анализа вида кривой определить, в каком режиме протекает процесс: в условиях $K_s \ll S_0$ (режим максимальной скорости роста) или в условиях $K_s \gg S_0$ (режим первого порядка по концентрации субстрата).

Для практического использования обсуждаемого метода существенно выполнение следующих условий:

1. При построении кинетической кривой должен быть исключен период индукции.

2. Выводы будут однозначны, если для данной культуры показано, что механизм роста не включает стадии ингибирования избытком субстрата или ингибирования продуктом. В последних двух случаях метод двойного зеркального отражения может приводить к близким зависимостям, но другим качественным выводам.

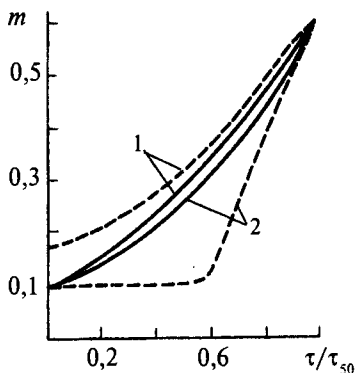


Рис. 5.61. Двойное зеркальное отражение полной кинетической кривой роста клеточной популяции в режимах: $K_s \gg S_0$ (1), $K_s \ll S_0$ (2).

Сплошные линии — нижний участок кривой роста, пунктир — верхний участок.

Ингибирование субстратом

Уравнение скорости роста культуры с ингибированием избытком субстрата в безразмерных переменных имеет следующий вид:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{\frac{K_s}{S_0} + s \left(1 + \frac{S_0}{K_i} s \right)}. \quad (5.157)$$

Видно, что в отличие от процесса без ингибирования субстратом в этом случае кинетика роста определяется двумя безразмерными параметрами — K_s/S_0 , S_0/K_i (рис. 5.62). Из рисунка видно, что ингибирование субстратом приводит к появлению несимметричности на кривой роста культуры. Особенно это хорошо обнаруживается при использовании метода двойного зеркального отражения (рис. 5.63). Верхний участок кинетической кривой для случаев ингибирования субстратом, отраженный в I квадранте, располагается существенно ниже, чем нижний участок, что является характерной особенностью данного процесса.

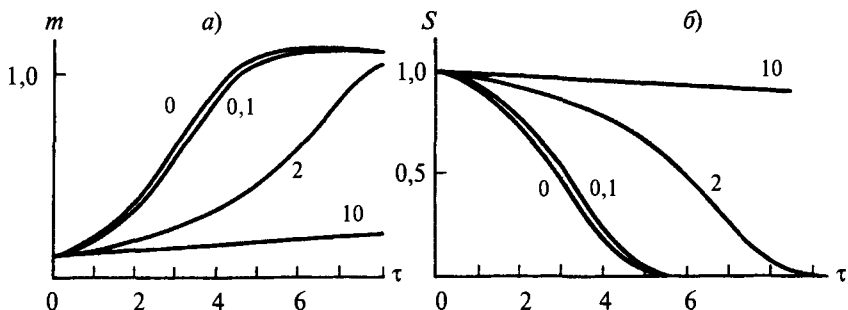


Рис. 5.62. Кинетические кривые роста клеточной популяции (а) и расход лимитирующего субстрата (б) в случае ингибирования избытком субстрата. Цифрами на кривых обозначены: S_0/K_i , $K_s/S_0 = 0,5$; $N_0/(M_\infty - N_0) = 0,1$.

Ингибирование продуктом

Уравнения скорости роста культуры при ингибировании образующимся продуктом в безразмерных переменных имеют следующий вид:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{\left(1 + \frac{P_\infty}{K_i}\right) \left(\frac{K_s}{S_0} + s\right)} \quad \text{— неконкурентное ингибирование;}$$

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{\frac{K_s}{S_0} \left(1 + \frac{P_\infty}{K_i P}\right) + s} \quad \text{— конкурентное ингибирование.} \quad (5.158)$$

Видно, что кинетика роста управляется также двумя безразмерными параметрами: K_s/S_0 , P_∞/K_i (рис 5.64). После небольшого, почти недетектируемого периода экспоненциального роста развитие культуры переходит в режим почти постоянной скорости, наблюдается длинный, близкий к линейному участок накопления биомассы или продукта.

Характерной особенностью процесса с ингибированием продуктом является специфический вид кинетической кривой при двойном зеркальном отражении верхнего участка кривой (см. рис. 5.63). Видно, что кривая существенно несимметрична, при этом отражаемая ветвь лежит заметно выше начального участка.

Таким образом, кинетические кривые роста клеточных популяций для различных механизмов протекания процесса имеют различную форму. Визуализацию различий удобно проводить с использованием метода двойного зеркального отражения.

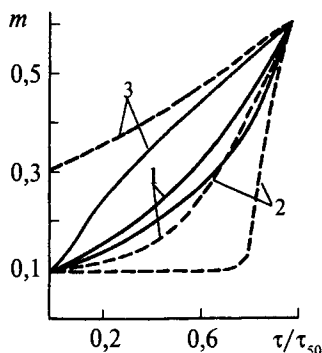


Рис. 5.63. Метод двойного зеркального отражения для систем с неосложненным ростом (1) и ингибированием избытком субстрата (2) и ингибирования продуктом (3).

Сплошные линии — нижние участки кинетических кривых, пунктир — верхние участки кинетических кривых.

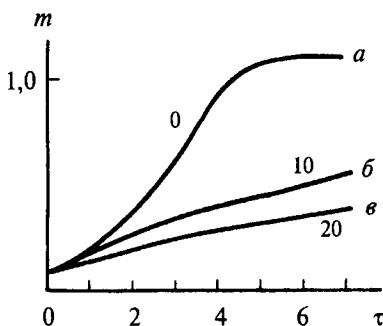


Рис. 5.64. Кинетические кривые роста при ингибировании продуктом ферментации. Неосложненный рост (а), конкурентное ингибирование (б), неконкурентное ингибирование (в).

$N_0/(M_{\infty} - N_0) = 0,1$; $K_i/S_0 = 0,5$. P_{∞}/K_i обозначены цифрами на кривых.

Достаточно легко идентифицируются процессы с ингибированием продуктом и процессы, протекающие в режиме первого порядка по лимитирующему субстрату (см. рис. 5.61 и 5.63). Кинетические кривые в условиях $S_0 \gg K_s$ и при ингибировании избытком субстрата имеют близкие формы, их идентификация на основе одной кинетической кривой не всегда может быть сделана. Для дискриминации этих механизмов могут быть применены другие методы, например исследование развития культуры в экспоненциальной фазе при различных начальных концентрациях лимитирующего субстрата (см. § 5.2).

Рост культуры при наличии процесса лизиса клеток

Уравнение скорости роста культуры при наличии лизиса клеток имеет вид

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{\frac{K_s}{S_0} + s} - \lambda m, \quad (5.159)$$

где λ — безразмерный параметр, характеризующий скорость лизиса клеток.

В отличие от процесса в отсутствие лизиса клеток в обсуждаемом случае кинетика роста определяется двумя безразмерными

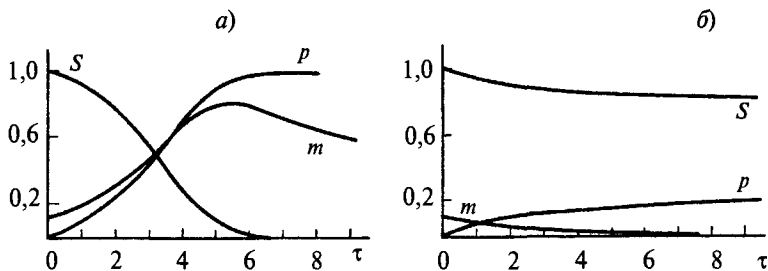


Рис. 5.65. Кинетические кривые роста клеточных популяций (m), накопления продукта (p) и расхода субстрата (s) с учетом процесса лизиса клеток при $K_s/S_0 = 0,5$ и λ : $a - 0,1$; $b - 1,0$.

параметрами: K_s/S_0 и λ (рис. 5.65). Из рисунка видно, что лизис клеток приводит к появлению несимметричности на кривых расхода s и образования p , а также, что очень важно, к прохождению через максимум кривой роста культуры, причем с увеличением λ эти процессы усиливаются.

При значениях λ , близких или превышающих единицу, наблюдается отмирание культуры. Условие отмирания культуры имеет вид

$$\lambda \geq \frac{s}{s + \frac{K_s}{S_0}}.$$

Кинетические кривые роста культуры с участием стадии лизиса клеток сравнительно легко идентифицируются из-за наличия характерного максимума или ниспадающей ветви на кривых роста культуры. В этих условиях концентрация продукта достигает насыщения и не изменяется во времени.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие преимущества численного анализа уравнений клеточного роста вы знаете?
2. Напишите уравнения перехода к безразмерным переменным.
3. Для каких целей используется метод двойного зеркального отражения? Приведите примеры использования метода. В каких случаях кинетические кривые роста удается совместить с помощью метода двойного зеркального отражения, а в каких случаях не удается?
4. Какие задачи решаются с помощью численного анализа уравнений клеточного роста? Приведите примеры.
5. Приведите кинетические уравнения роста клеточных популяций в безразмерных переменных для неосложненного роста, ингибирования продуктом и субстратом. Как дискриминировать эти механизмы с помощью метода двойного зеркального отражения?

5.10. Популяции, взаимодействующие по принципу хищник—жертва. Модель Лотки-Вольтерры

Статистика заставляет предположить, что уменьшение интенсивности лова благоприятствует развитию наиболее прожорливых видов.

В. Вольтерра

Интересные и сложные закономерности характеризуют рост микроорганизмов в смешанных культурах и микробных ассоциациях. Эта область в последнее время привлекает большое внимание, поскольку природные популяции микроорганизмов в большинстве случаев представляют собой симбиотические ассоциации, смешанные культуры или культуры микроорганизмов, находящихся в конкурентной борьбе за какой-либо фактор, ограничивающий рост популяций. Решение ряда вопросов промышленной микробиологии также связано с изучением и использованием не монокультур, а ассоциаций микроорганизмов.

Взаимоотношения между популяциями часто носят антагонистический характер. Наиболее типичным примером такого рода взаимодействий являются взаимоотношения по принципу хищник—жертва. Под хищником понимают популяцию организмов, размножающуюся и растущую за счет поглощения и уничтожения «жертвы». В мире микроорганизмов это достаточно хорошо представленный случай. Например, многие простейшие живут за счет поглощения бактерий. Бактериофаги развиваются за счет нападения и уничтожения микроорганизмов. На уровне макроорганизмов этот тип взаимодействия популяций также хорошо известен (лиса—заяц, сова—лемминг и др.)

При взаимодействии хищник—жертва численность популяций обоих видов часто не достигает постоянных стационарных значений, а колеблется в различных фазах вокруг некоторых усредненных стационарных значений. Качественно такого рода устойчивые колебания можно объяснить следующим образом. При высокой численности (концентрации) жертвы популяция хищников активно растет до того момента, пока популяция жертв становится настолько малочисленной, что рост популяции хищника становится невозможным, при этом популяция хищника начинает уменьшаться. Через некоторое время популяция жертв восстанавливается. Такого рода колебания могут быть устойчивыми.

Впервые на взаимодействующие популяции обратил внимание А. Лотка, который в 1925 г. выпустил книгу «Элементы фи-

зической биологии», сформулировав при этом основные дифференциальные уравнения, описывающие взаимодействия конкурирующих популяций.

Интерес известного итальянского математика Вито Вольтерра к анализу поведения биологических популяций возник в результате многочисленных бесед с зоологом Умберто Д'Анкона. Ученый, изучая статистику рыбных рынков, установил факт, что в годы Первой мировой войны и в последующие годы, когда промысел рыб заметно упал, в улове существенно увеличилась доля хищных видов рыб. Это наблюдение послужило основой создания математической теории борьбы за существование (*Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. Париж, 1931*).

Рассмотрим основные закономерности динамики популяции при взаимодействии типа хищник—жертва и найдем объяснение обнаруженного У. Д'Аконом феномена. Для популяции жертвы дифференциальное уравнение, описывающее динамику развития популяции, может быть представлено в виде

$$\frac{dN_1}{dt} = aN_1 - \alpha N_1 N_2, \quad (5.160)$$

где N_1 — численность популяции.

Первый член правой части характеризует размножение вида (удельная скорость роста α), второй член — скорость его гибели. Предполагается, что скорость гибели пропорциональна числу «встреч» жертвы и хищника (численность популяции хищников обозначена N_2). Произведение $N_1 N_2$ характеризует вероятность встречи хищника и жертвы, величина α — вероятность гибели «жертвы».

Для популяции хищника динамика изменения численности может быть представлена уравнением

$$\frac{dN_2}{dt} = \beta N_1 N_2 - \lambda N_2, \quad (5.161)$$

Скорость роста популяции хищника пропорциональна числу встреч с жертвой (величина $\beta N_1 N_2$), убыль популяции осуществляется за счет естественного «оттока» (величина λN_2). Уравнения (5.160) и (5.161) представляют собой нелинейные дифференциальные уравнения, и их решение в виде аналитических функций получено быть не может. Для анализа поведения системы можно использовать два подхода: численное решение системы уравнений и исследование зависимости одной переменной от другой (метод фазового портрета). Рассмотрим несколько особенностей системы.

Стационарное состояние. При $dN_1/dt = 0$ и $dN_2/dt = 0$ имеем

$$N_1 = \frac{\lambda}{\beta}, \quad N_2 = \frac{a}{\alpha}. \quad (5.162)$$

Связь между $N_1(t)$ и $N_2(t)$ (фазовый портрет). Введем безразмерные переменные

$$n_1 = \frac{N_1}{N_{1,ст}}, \quad n_2 = \frac{N_2}{N_{2,ст}}. \quad (5.163)$$

С учетом этих соотношений система уравнений может быть преобразована к виду:

$$\frac{dn_1}{dt} = a(1 - n_2)n_1, \quad \frac{dn_2}{dt} = \lambda(1 - n_1)n_2.$$

Деление этих уравнений одно на другое позволяет исключить время и перейти к дифференциальному уравнению с разделяющимися переменными

$$\frac{dn_1}{dn_2} = \frac{-\lambda(1 - n_1)n_2}{\alpha(1 - n_2)n_1};$$

$$\frac{1 - n_2}{n_2} dn_2 = -\frac{\lambda}{a} \frac{1 - n_1}{n_1} dn_1.$$

Интегрирование этого уравнения приводит к функции

$$a(\ln n_2 - n_2) = \lambda(\ln n_1 - n_1) + c,$$

где c — постоянная интегрирования, зависящая от начальной численности популяции.

Потенцирование функции приводит к соотношению

$$\left(\frac{n_1}{e^{n_1}}\right)^\lambda \left(\frac{n_2}{e^{n_2}}\right)^\alpha = e^c$$

Это уравнение определяет связь между n_1 и n_2 и позволяет вычислить значение n_2 при заданном значении n_1 .

Такая процедура называется получением фазового портрета (методы анализа системы двух нелинейных дифференциальных уравнений с помощью фазовых портретов см.: Рубин А.В. Кинетика биологических процессов. М., 1973).

Для системы уравнений Лотки—Вольтерры рассчитанные значения n_2 (n_1) представляют собой замкнутые кривые для любых начальных состояний, за исключением стационарного. Такой вид фазового портрета характерен для колебательных процессов.

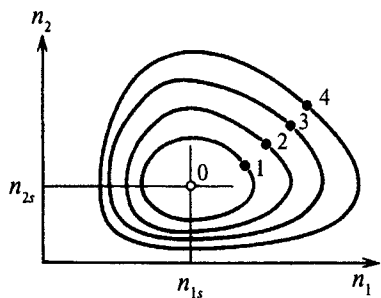


Рис. 5.66. Фазовая плоскость, соответствующая моделям Лотки–Вольтерры.

Точка 0 отвечает стационарному состоянию. Колебательные траектории, отмеченные цифрами 1, 2, 3 и 4, соответствуют различным начальным условиям (Бейли Дж., Уоллис Д. М., 1989).

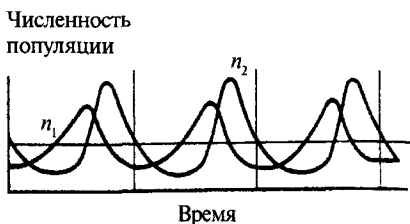


Рис. 5.67. Периодические колебания численности популяции жертвы n_1 и хищника n_2 .

Численное решение системы уравнений

Расчет численности популяций прямым численным интегрированием системы уравнений приводит к периодическим функциям $n_1(t)$ и $n_2(t)$ (рис. 5.66, 5.67).

Периодические колебания численности хищника и жертвы в рамках модели Лотки–Вольтерры

Такого рода периодические колебания часто наблюдаются в эксперименте (рис. 5.68). На рисунке приведены динамические кривые изменения численности простейшего *Tetrahymena*

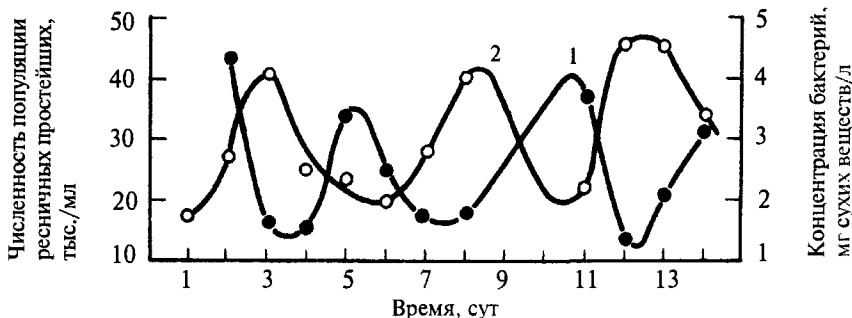


Рис 5.68. Колебания численности популяции при росте смешанной культуры *Tetrahymena pygiformis* (хищник) (1) и *Aerobacter aerogenes* (жертва) (2) в хемостате.

pyriformis (хищник) и *Aerobacter aerogenes* (жертва) при росте культур в хемостате (Бейли Дж., Уоллис Д. Основы биохимической инженерии. М., 1989). Видно, что имеют место хорошо выраженные колебания численности.

Средняя численность популяций

Интегрирование уравнения (5.161) по периоду колебаний T приводит к уравнению

$$\ln \frac{n_1(T)}{n_1(0)} = aT - a \int_0^T n_2(t) dt.$$

Величина n изменяется с периодом T , что означает $n_1(0) = n_1(T)$ соответственно

$$\ln \frac{n_1(T)}{n_1(0)} = 0.$$

С учетом этого имеем

$$\frac{1}{T} \int_0^T n_2(t) dt = 1$$

или

$$\frac{1}{T} \int_0^T N_2(t) dt = N_2 \quad (5.164)$$

Соответственно для N_1 имеем

$$\frac{1}{T} \int_0^T N_1(t) dt = N_1 \quad (5.165)$$

Интегралы в первой части уравнений (5.164) и (5.165) дают усредненные значения численности популяций по времени. Видно, что независимость от начальных условий и кинетических параметров α , a , β , λ средние значения численности популяции равны численности популяций в стационарном состоянии. Отсюда следует вывод, определяющий поведение популяций при неспецифическом воздействии на их численность.

Представим, что на обе популяции оказано положительное воздействие, например уменьшен «отток» за счет уменьшения неспецифического отбора популяций (уменьшение «лова» в рамках феномена Д'Акона). В этом случае

$$\frac{dN_1}{dt} = aN_1 - \alpha N_1 N_2 + \delta N_1 ;$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \beta N_1 N_2 - \lambda N_2 + \delta N_2 ,$$

или

$$N_1 = \frac{\lambda - \delta}{\beta} , \quad N_2 = \frac{a + \delta}{\alpha} .$$

Уменьшение лова приводит к увеличению средней численности популяции хищников и уменьшению средней численности популяции жертв. Наоборот, если происходит неспецифическое подавление численности, например неселективное давление на популяцию микроорганизмов с помощью антибиотиков, то

$$N_{1,ст} = \frac{\lambda + \delta}{\beta} ;$$

$$N_{2,ст} = \frac{a - \delta}{\alpha} ,$$

т.е. результатом воздействия будет увеличение средней численности жертв и уменьшение средней численности хищников.

Модель Лотки–Вольтерры была первым примером применения количественных методов к анализу сложных соотношений во взаимодействующих популяциях. В дальнейшем модель была расширена на сообщества, состоящие из многих видов, было введено ограничение роста жертвы, была исследована проблема устойчивости решений, рассмотрены другие модели конкуренции. Результаты этой работы приведены в книге Дж. Бейли, Д. Уоллиса. Основы биохимической инженерии. М., 1989.

Однако достижения А. Лотки и В. Вольтерры неоспоримы. Они заложили основы современной количественной теории биологических сообществ.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные положения моделей Лотки–Вольтерры. 2. Напишите уравнения, описывающие изменение численности популяции хищника и жертвы. 3. Напишите уравнение стационарного состояния для моделей Лотки–Вольтерры. 4. Какова средняя численность популяций хищника и жертвы при описании их моделями типа Лотки–Вольтерры?

5.11. Компьютерные модели кинетики роста клеточных популяций. Ассоциации микроорганизмов

Вполне вероятно, что 95% оригинальных научных работ принадлежат менее чем 5% профессиональных ученых, но большая часть этих работ вообще не была бы написана, если бы остальные 95% ученых не содействовали созданию общего достаточно высокого уровня науки.

Н. Винер

Общие вопросы анализа роста популяций в смешанных культурах рассмотрены в монографии Н.С. Печуркина (1978), где основное внимание обращено на классификацию взаимодействий популяций и описание их роста в проточных системах. Изучены закономерности роста культур, конкурирующих за один субстрат, типы взаимодействий микробных культур друг с другом, развитие смеси популяций на сложных субстратах. Выделяют по крайней мере шесть типов взаимодействия микроорганизмов: от симбиоза муталистического типа, при котором рост каждой из культур стимулируется ростом другой культуры, и до строго антагонистического взаимодействия, при котором развитие одной культуры блокирует развитие другой. Рассмотрены также закономерности развития популяций разных трофических уровней, включая классическую систему хищник—жертва (см. также Вольтерра В., 1931, Бейли Дж., Уоллис Д., 1989) и систему паразит—хозяин.

Ниже с использованием ЭВМ анализируются закономерности развития симбиотических ассоциаций в режиме периодического культивирования. Симбиотические ассоциации, по-видимому, представляют собой наиболее распространенный и отшлифованный эволюцией тип взаимодействия микробных популяций. Наиболее классическим примером в этом плане может служить микробная ассоциация образования метана анаэробными бактериями.

Рассмотрим закономерности симбиотических процессов на примере некоторых модельных систем.

Ассоциация двух микроорганизмов

Признаться в этом страшно мне, поскольку мало в этом чести, но я с собой наедине глупей, чем если с кем-то вместе.

И. Губерман

Представим микробную ассоциацию, состоящую из двух микроорганизмов M_1 и M_2 , использующую для своего роста не-

кий субстрат S_1 , причем рост организма M_1 происходит с потреблением субстрата S_1 и образованием продукта S_2 . Продукт S_2 , в свою очередь, служит субстратом для роста организма M_2 . В результате роста организма M_2 образуется конечный продукт P . Обсуждаемый процесс можно представить в виде системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{dM_1}{dt} &= \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}; \\ \frac{dM_2}{dt} &= \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2}; \\ \frac{dS_1}{dt} &= -\frac{1}{Y_{S_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}; \\ \frac{dS_2}{dt} &= -\frac{1}{Y_{S_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2} + \frac{1}{Y_{P_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}; \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{1}{Y_{P_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2},\end{aligned}\tag{5.166}$$

где K_1 и K_2 — константы сродства субстратов S_1 и S_2 к микроорганизмам M_1 и M_2 соответственно; μ_1 и μ_2 — максимальные скорости роста микроорганизмов M_1 и M_2 ; Y_{s1} и Y_{p1} — экономические коэффициенты, позволяющие выражать концентрации S_1 , S_2 и M_1 , а Y_{s2} и Y_{p2} — концентрации S_2 , P и M_2 в одних единицах.

Для анализа кинетики процесса полезно систему уравнений привести к безразмерным относительным переменным:

$$\begin{aligned}s_1 &= \frac{S_1}{S_{1,0}}; \quad s_2 = \frac{S_2}{S_{2,0}}; \quad p = \frac{P}{P_{\infty}}; \\ \tau &= \mu_1 t; \quad m_1 = \frac{M_1}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}; \quad m_2 = \frac{M_2}{M_{2,\infty} - N_{2,0}},\end{aligned}\tag{5.161}$$

где $M_{1,\infty}$, $M_{2,\infty}$, P_{∞} — предельное количество биомассы M_1 , M_2 и продукта P , образующихся при бесконечной продолжительности процесса.

Переменные (5.161) позволяют анализировать кинетику процесса в безразмерных величинах, при этом значения s_1 , s_2 , p лежат в диапазоне от 0 до 1, значения m_1 — от $N_{1,0}/(M_{1,\infty} - N_{1,0})$

до $[N_{1,0}/(M_{1,\infty} - N_{1,0})] + 1$, значения m_2 — от $N_{2,0}/(M_{2,\infty} - N_{2,0})$ до $[N_{2,0}/(M_{2,\infty} - N_{2,0})] + 1$. Время в указанных безразмерных переменных измеряется отрезком, на протяжении которого в режиме максимальной скорости концентрация биомассы M_1 увеличивается в e раз.

Система дифференциальных уравнений (5.166) в безразмерных координатах выглядит следующим образом (для упрощения анализа все экономические коэффициенты приняты равными единице):

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1 / S_{1,0} + s_1}; & \frac{dm_2}{d\tau} &= \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{2,0} + s_2}; \\ \frac{ds_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1 / S_{1,0} + s_1}; & \frac{ds_2}{dt} &= \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{2,0} + s_2}; & \frac{dp}{d\tau} &= \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{2,0} + s_2}. \end{aligned} \quad (5.168)$$

Из этих уравнений видно, что процессом управляют и определяют вид кинетических кривых три безразмерных параметра: $K_1/S_{1,0}$, $K_2/S_{1,0}$ и μ_2/μ_1 . Первые два параметра, характеризующие отношения констант сродства микроорганизма с лимитирующими субстратами к начальным концентрациям лимитирующих субстратов, оказывают существенное влияние на ход процесса. Они изменяют как форму кинетической кривой, так и время, в течение которого конвертируется 50% лимитирующего субстрата (см. § 5.9).

На влиянии третьего параметра — отношения максимальных скоростей роста микроорганизмов M_1 и M_2 — остановимся более подробно (рис 5.69). Видно, что наблюдаются закономерное падение концентрации исходного субстрата S_1 , рост культур M_1 и M_2 , накопление конечного продукта P и характерный кинетический максимум для промежуточного продукта S_2 . Наличие этого максимума при росте микробных ассоциаций свидетельствует о том, что для исследуемой культуры характерен симбиотический тип взаимодействий микроорганизмов (см. рис. 5.69).

При уменьшении максимальной скорости роста второго микроорганизма (увеличение отношения μ_1/μ_2) происходит относительное замедление роста M_2 и соответственно повышение максимума на кинетической кривой для S_2 (см. рис. 5.69б). Весь процесс распадается практически на две независимые стадии: сначала быстрый рост M_1 и быстрое накопление S_2 , а затем медленное расходование S_2 и такой же медленный рост M_2 и P . Процесс образования продукта лимитирует низкая скорость второй стадии.

При относительном увеличении максимальной удельной ско-

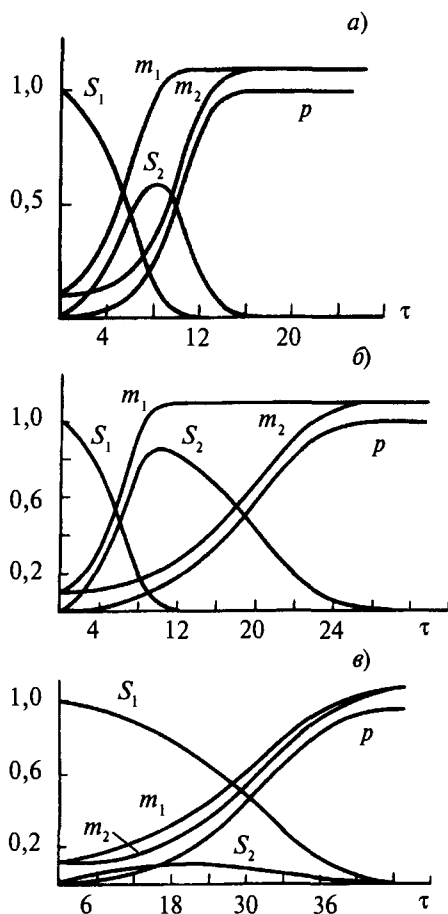


Рис. 5.69. Численное решение системы (5.168) при μ_1/μ_2 равном: 1 (а); 2,5 (б); 0,2 (в). $K_1/S_{1,0} = K_2/S_{2,0} = 0,5$; $m_{1,0} = m_{2,0} = 0,1$.

2. $\mu_1 \gg \mu_2$ — процесс распадается как бы на две независимые стадии: быстрое развитие микроорганизма M_1 и медленное и длительное развитие микроорганизма M_2 , который и лимитирует образование конечного продукта P . Здесь также возможно определение кинетических характеристик процесса.

3. $\mu_1 \ll \mu_2$ — процесс как бы сжимается в одну стадию, кривые роста микроорганизмов M_1 и M_2 практически совпадают, почти отсутствует промежуточный продукт S_2 , скорость образования P

рости роста второго микроорганизма наблюдается замедление расхода и роста M_1 , понижение максимума по S_2 (см. рис. 5.69в). При $\mu_1 \ll \mu_2$ субстрат S_2 практически не детектируется в системе и наблюдается слияние кривых роста микроорганизмов M_1 и M_2 , при этом вторая стадия процесса становится слабо-заметной, весь процесс лимитируется скоростью первой стадии. В таких ситуациях часто оказывается невозможным определение кинетических параметров второй стадии.

Таким образом, при изучении симбиотических ассоциаций, состоящих из двух микроорганизмов, в зависимости от соотношения максимальных удельных скоростей роста возможны три предельных случая протекания процесса.

1. $\mu_1 \approx \mu_2$ — рост обоих микроорганизмов происходит последовательно — обе стадии процесса проявляются достаточно четко, что дает возможность определить все кинетические параметры системы.

лимитируется скоростью первой стадии. Можно определить только кинетические характеристики медленной первой стадии. Кинетика накопления продукта, несмотря на то что он образуется в результате роста второго микроорганизма, определяется кинетической кривой роста первой культуры.

Ассоциации трех микроорганизмов

Представим симбиотическую ассоциацию, включающую три микроорганизма. При этом трофические связи между этими организмами следующие: исходный субстрат S_1 является субстратом для организма M_1 , в результате роста которого образуется вещество S_2 , являющееся исходным субстратом для организма M_2 . Растущий организм M_2 выделяет вещество S_3 , которое потребляется при росте организма M_3 , и в результате образуется конечный продукт P . Эти процессы можно описать системой дифференциальных уравнений

$$\begin{aligned} \frac{dM_1}{dt} &= \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}, \quad \frac{dM_2}{dt} = \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2}, \quad \frac{dM_3}{dt} = \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}, \\ \frac{dS_1}{dt} &= -\frac{1}{Y_{S_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}, \quad \frac{dS_2}{dt} = \frac{1}{Y_{P_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1} - \frac{1}{Y_{S_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2}, \\ \frac{dS_3}{dt} &= \frac{1}{Y_{P_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2} - \frac{1}{Y_{S_3}} \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}, \quad \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{P_3}} \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}. \end{aligned} \quad (5.169)$$

По аналогии с предыдущим случаем μ_1, μ_2, μ_3 — максимальные удельные скорости роста; K_1, K_2, K_3 — константы сродства субстратов; $Y_{S_1}, Y_{S_2}, Y_{S_3}, Y_{P_1}, Y_{P_2}, Y_{P_3}$ — экономические коэффициенты для выражения в одних единицах концентраций субстратов, продуктов и микроорганизмов. Приведем систему (5.169) к безразмерным переменным:



Калужный С.В.

Физикохимик, микробиолог. Один из основоположников численных методов анализа кинетики роста клеточных популяций. Совместно с С.Д. Варфоломеевым разработал теорию симбиотрофных микробных ассоциаций.

$$s_1 = \frac{S_1}{S_{1,0}}; \quad s_2 = \frac{S_2}{S_{2,0}}; \quad s_3 = \frac{S_3}{S_{3,0}} \quad p = \frac{P}{P_\infty};$$

$$\tau = \mu_1 t; \quad m_1 = \frac{M_1}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}; \quad m_2 = \frac{M_2}{M_{2,\infty} - N_{2,0}}, \quad m_3 = \frac{M_3}{M_{3,\infty} - N_{3,0}} \quad (5.170)$$

В этом случае система уравнений в безразмерных переменных будет иметь следующий вид (для упрощения анализа все экономические коэффициенты также приняты равными единице):

$$\begin{aligned} \frac{dm_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1 / S_{1,0} + s_1}; \quad \frac{dm_2}{d\tau} = \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{1,0} + s_2}; \quad \frac{dm_3}{d\tau} = \frac{\mu_3 / (\mu_1 s_3 m_3)}{K_3 / S_{1,0} + s_3}; \\ \frac{ds_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1 / S_{1,0} + s_1}; \quad \frac{ds_2}{d\tau} = \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{2,0} + s_2} - \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{1,0} + s_2}; \\ \frac{ds_3}{d\tau} &= \frac{\mu_2 / (\mu_1 s_2 m_1)}{K_2 / S_{1,0} + s_2} - \frac{\mu_3 / (\mu_1 s_3 m_3)}{K_3 / S_{1,0} + s_3}; \quad \frac{dp}{d\tau} = \frac{\mu_3 / (\mu_1 s_3 m_3)}{K_3 / S_{1,0} + s_3}. \end{aligned} \quad (5.171)$$

Как видно, этой системой управляют пять параметров: $K_1/S_{1,0}$; $K_2/S_{1,0}$; $K_3/S_{1,0}$; μ_2/μ_1 ; μ_3/μ_1 . Первые три параметра, как и в ранее рассмотренных вариантах, отражают влияние концентраций лимитирующих субстратов, а два последних — соотношения удельных скоростей роста культур. Проварьируем последние два параметра и проследим за изменением вида кинетических кривых (рис. 5.70).

1. $\mu_2/\mu_1 = \mu_3/\mu_1 = 1$. Это случай, когда максимальные удельные скорости роста всех трех микроорганизмов примерно совпадают (рис. 5.70а). Видно, что развитие всех трех микроорганизмов идет последовательно, кривые роста похожи друг на друга, за исключением начальной фазы процесса. Наблюдается довольно быстрое падение концентрации S_1 и существуют характерные максимумы по промежуточным продуктам S_2 и S_3 .

2. $\mu_2/\mu_1 = 1$, $\mu_3/\mu_1 = 5$ (или $\mu_3 \gg \mu_1 = \mu_2$) — условия относительно быстрой последней стадии (см. рис. 5.70). Видно, что в условиях быстрой третьей стадии практически исчезает максимум по S_3 , а кривые роста микроорганизмов M_2 и M_3 практически совпадают, вторая стадия процесса как бы сливается с третьей, хотя и определяет накопление продукта P .

3. $\mu_2/\mu_1 = 5$, $\mu_3/\mu_1 = 1$ (или $\mu_2 \gg \mu_1 = \mu_3$) — условия относительно быстрой второй стадии (см. рис. 5.70б). Здесь ситуация другая:

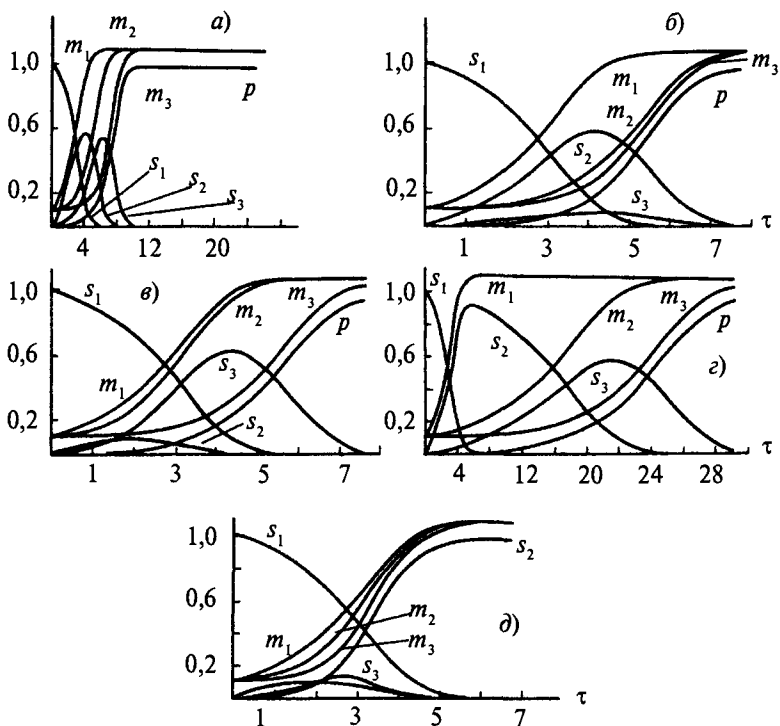


Рис. 5.70. Численное интегрирование системы (5.165) при $\mu_1/\mu_2 = \mu_2/\mu_3 = 1$ (а); $\mu_1/\mu_2 = 1$, $\mu_3/\mu_1 = 5$ (б); $\mu_1/\mu_2 = 0,2$, $\mu_1/\mu_3 = 1$ (в); $\mu_1/\mu_2 = \mu_1/\mu_3 = 5$ (г); $\mu_1/\mu_2 = \mu_1/\mu_3 = 0,2$ (д).

практически исчезает промежуточный субстрат S_2 , кривые роста m_1 и m_2 близки, при этом быстрая вторая стадия как бы растворяется в медленной первой и определение ее кинетических параметров становится затруднительным.

4. $\mu_2/\mu_1 = 0,2$, $\mu_3/\mu_1 = 0,2$ (или $\mu_1 \gg \mu_2 = \mu_3$) — условия относительно быстрой первой стадии (см. рис. 5.70г). Вид кинетических кривых напоминает картину первого случая, за исключением более быстрого роста первого организма. По истечении некоторого времени система работает как ассоциация двух микроорганизмов.

5. $\mu_2/\mu_1 = \mu_3/\mu_1 = 5$ (или $\mu_1 \ll \mu_2 = \mu_3$) — условие замедленной первой стадии (см. рис. 5.70д). Обращает на себя внимание практически полное отсутствие S_2 и S_3 , а также слияние трех кинетических кривых роста организмов: m_1 , m_2 , m_3 . Кинетика роста m_2 и m_3 практически не проявляется — все лимитирует первая стадия. Из такого вида кинетических кривых возможно определение кинетических параметров только лимитирующей стадии, т.е. первой.

Таким образом, если экспериментально достаточно подробно исследованы зависимости от времени концентрации исходных, промежуточных субстратов и продуктов ферментации, получены кинетические кривые роста отдельных микроорганизмов, то можно на основе качественного совпадения экспериментальных зависимостей с одной из теоретических, представленных на рис. 5.69—5.70, идентифицировать лимитирующую стадию развития симбиотической ассоциации. Более строгий количественный подход основан на моделировании роста микробной ассоциации с помощью решения прямой задачи и определения кинетических параметров роста при решении обратной. Рассмотрим особенности и возможности этого подхода на примере анализа закономерностей роста метангенерирующей микробной ассоциации.

Симбиотрофная метангенерирующая ассоциация

Анаэробный процесс образования метана из различного рода органических материалов представляет собой сложный многоступенчатый процесс, на разных стадиях которого принимают участие микроорганизмы различной природы. Микробиологическое образование метана — широко распространенный, устойчиво протекающий в анаэробных условиях процесс, имеющий в настоящее время промышленное значение. Первый этап биodeградации часто связан с гидролизом высокомолекулярных соединений (полисахаридов, белков, жиров и т.д.) до соответствующих олиго- и мономеров, которые на последующих этапах конвертируются в органические кислоты и спирты, молекулярный водород и диоксид углерода. Затем органические кислоты и спирты превращаются в уксусную кислоту, водород и CO_2 , из которых в дальнейшем образуется метан.

Количественная картина метаногенеза реконструировалась на основе исследования динамики образования и расходования исходных промежуточных соединений и конечных продуктов процесса с использованием биокинетического подхода.

Экспериментально исследовалась в закрытой системе кинетика генерации CO_2 , метана, органических интермедиатов. При этом в качестве исходных субстратов был использован широкий набор индивидуальных соединений и их смесей — углеводов, аминокислот, ароматических соединений, органических кислот и спиртов. Конверсия всех органических соединений протекает через промежуточное образование уксусной, пропионовой и масляной кислоты с частичным образованием этанола. Типичные наблюдаемые кинетические кривые приведены на рис. 5.71.

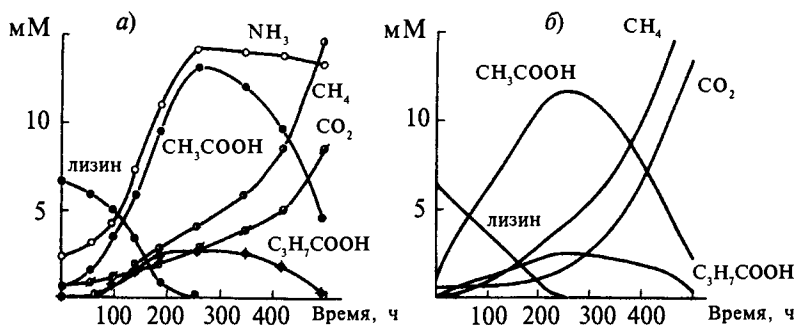
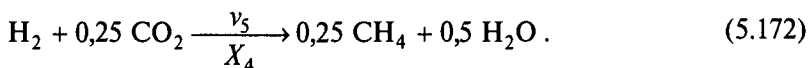
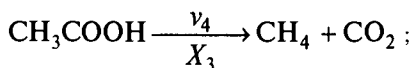
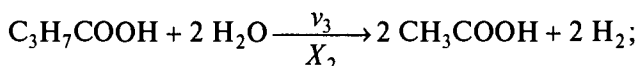
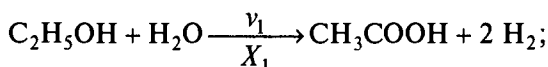
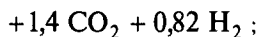
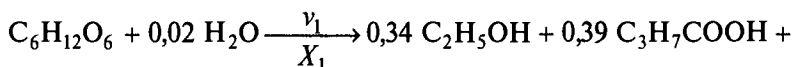


Рис 5.71. Кинетика конверсии лизина метангенерирующим консорциумом. *а* — экспериментальные данные; *б* — теоретические расчеты.

Базовые химические реакции включают последовательную трансформацию исходных молекул в конечные продукты. Например, схема химических трансформаций для глюкозы выглядит следующим образом:



Эти уравнения соответствуют химическим трансформациям, протекающим под действием микроорганизмов X_1 , X_2 , X_3 , X_4 . Соответствующие скорости могут быть охарактеризованы величинами v_1 , v_2 , v_3 , v_4 , v_5 . Последние две реакции представляют собой реакции метанообразования.

Химически нестандартными представляются стадии окисления водой этанола и масляной кислоты с образованием уксусной кислоты и водорода. В обычных условиях это термодинамически

запрещенные процессы. Возможность протекания этих процессов в микробиологических консорциумах обеспечивает микроорганизм, активно потребляющий молекулярный водород. Для того чтобы метаногенез активно протекал, необходимо, чтобы парциальное давление водорода было ниже критического, которое равно 0,002 атм. При кинетическом описании системы также необходимо учесть многочисленные регуляторные эффекты.

Система дифференциальных уравнений, описывающих динамику процесса, имеет вид

$$-\frac{dC_6H_{12}O_6}{dt} = v_1, \quad (5.173)$$

$$\text{где } v_1 = \frac{q_1 X_1 C_6H_{12}O_6}{(K_1 + C_6H_{12}O_6)(1 + L_1 H_2)};$$

$$\frac{dX_1}{dt} = 1,2 X_1 v_1 - (a_1 + b_1 H^+) X_1,$$

где q_1 — удельная скорость роста микроорганизма X_1 ; K_1 — константа сродства микроорганизма к глюкозе.

Уравнение учитывает регуляторный эффект ингибирования роста глюкозотрансформирующего микроорганизма водородом (константа ингибирования $1/L_1$. В анализ также включены известные процессы лизиса, характеризующиеся параметром a_1 и b_1 (pH-индуцируемый лизис). Стадии образования уксусной кислоты и водорода описывают уравнения:

$$\frac{dX_2}{dt} = 0,8 Y_3 v_3 + 0,4 Y_2 v_2 - (a_2 + b_2 H^+) X_2;$$

$$v_2 = \frac{q_2 X_1 C_2H_5OH}{\left(K_2 + C_2H_5OH + \frac{C_2H_5OH^2}{L_2} \right) \left(1 + \frac{HP}{Ka_1} + \frac{Kb_1}{H^+} \right) (1 + L_3 H_2)};$$

$$v_3 = \frac{q_2 X_2 C_3H_7COOH}{(K_3 + C_3H_7COOH) + (1 + L_4 H_2 + L_5 CH_3COOH) \left(1 + \frac{H^+}{Ka_2} + \frac{Kb_2}{H^+} \right)};$$

$$\frac{dC_2H_5OH}{dt} = 0,34 (1 - Y_1) v_1 - v_2;$$

$$\frac{dC_3H_7COOH}{dt} = 0,39 (1 - Y_1) v_1 - v_3, \quad (5.174)$$

где q_2, q_3 — удельные скорости роста организмов, X_2 и X_3, K_2 и K_3 — соответствующие константы родства.

Уравнения также учитывают большую группу регуляторных эффектов:

лизис и рН-зависимый лизис микроорганизма X_2 (параметры a_2 и b_2H^+);

ингибирование водородом (константы L_3 и L_4);

ингибирование этанолом (константа L_2);

колоколообразование рН-зависимости (константы Ka_1, Kb_1, Ka_2 и Kb_2).

Заключительные стадии образования метана описывают уравнения:

$$\frac{dX_3}{dt} = 0,4 Y_4 v_4 - (a_3 + b_3 H^+) X_3 ;$$

$$\frac{dX_4}{dt} = 0,1 Y_5 v_5 - (a_4 + b_4 H^+) X_4 ;$$

$$v_4 = \frac{q_4 X_3 \text{CH}_3\text{COOH}}{(K_4 + \text{CH}_3\text{COOH}) + (1 + L_6 \text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}) \left(1 + \frac{H^+}{Ka_4} + \frac{Kb_3}{H^+}\right)} ;$$

$$v_5 = \frac{q_5 X_4 \text{H}_2\text{CO}_2}{(K_5 + K_6 \text{CO}_2 + K_7 \text{H}_2 + K_6 \text{H}_2 \text{CO}_2) \left(1 + \frac{H^+}{Ka_4} + \frac{Kb_4}{H^+}\right)} ;$$

$$\frac{d\text{CH}_3\text{COOH}}{dt} = 1,31 (1 - Y_1) Y_1 + (1 - Y_2) v_2 + 2 (1 - Y_3) v_3 + 2R - v_4 ;$$

$$\frac{d\text{H}_2}{dt} = 0,82 (1 - Y_1) + 2v_2 + 2Y_3 + 2R - v_5 .$$

(5.175)

Соответственно параметры $q_4, q_5, K_4, K_5, K_6, K_7, K_8$ характеризуют рост микроорганизмов x_3 и x_4 . При анализе необходимо учитывать эффекты ингибирования масляной кислотой (L_6), лизис и рН-зависимый лизис (параметры a_3, b_3H^+, a_4, b_4H^+), рН-зависимости роста (константы Ka_3, Kb_3, Ka_4, Kb_4). Заметное количество водорода образуется из биомассы путем ее лизиса (параметр R).

Эта система уравнений была решена численно и методами минимизации отклонений. При подборе параметров были по-

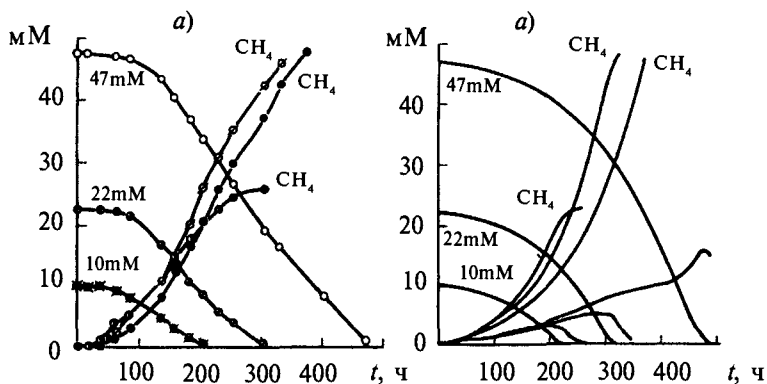


Рис. 5.72. Кинетика конверсии масляной кислоты метангенерирующим консорциумом при различных концентрациях субстрата (цифры на кривых).

a — экспериментальные данные; *б* — теоретические расчеты.

лучены теоретические кривые, наиболее близко описывающие экспериментальные данные. Эта процедура была проделана для всех экспериментально изученных субстратов, подвергающихся разложению (углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты). Были найдены параметры, адекватно описывающие экспериментальные данные и не зависящие от природы субстрата деструкции. [При вариации субстратов от природы субстрата зависят лишь параметры роста первого организма (q_1 , K_1 , L_1 , a_1 , b_1)]. Значения найденных параметров приведены в табл. 5.9.

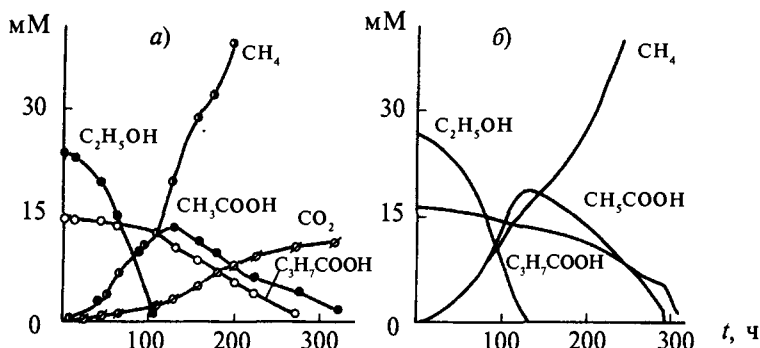


Рис. 5.73. Кинетика конверсии смеси этанола и масляной кислоты при действии метангенерирующего консорциума микроорганизмов.

a — экспериментальные данные; *б* — теоретические расчеты.

Параметры метаногенного консорциума микроорганизмов*

Параметры	Значение	Параметры	Значение
$q_1, \text{ч}^{-1}$	8,25	$K_1, \text{мМ}$	0,128
$q_2, \text{ч}^{-1}$	0,778	$K_2, \text{мМ}$	0,6
$q_3, \text{ч}^{-1}$	1,267	$K_3, \text{мМ}$	0,114
$q_4, \text{ч}^{-1}$	0,932	$K_4, \text{мМ}$	2,7
$q_5, \text{мМ/ч}$	12,373	$K_5, \text{мМ}$	9,8
$K_6, \text{мМ}$	0,085	$K_7, \text{мМ}$	2,27
Y_1	0,164	Y_2	0,1
Y_3	0,131	Y_4	0,045
Y_5	0,116	$L_1, \text{мМ}^{-1}$	20,0
$L_2, \text{мМ}^2$	950,0	$L_3, \text{мМ}^{-1}$	3,9
$L_4, \text{мМ}^{-1}$	65,0	$L_5, \text{мМ}^{-1}$	1,6
$L_6, \text{мМ}^{-1}$	0,02	pKa_1	6,05
pKa_2	6,05	pKa_3	6,19
pKa_4	6,19	pKb_1	8,0
pKb_2	8,0	pKb_3	7,92
pKb_4	7,92	$a_1, \text{ч}^{-1}$	0,0083
$a_2, \text{ч}^{-1}$	0,00035	$a_3, \text{ч}^{-1}$	0,00055
$a_4, \text{ч}^{-1}$	0,00045	$b_1, \text{ч}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	7,5x103
$b_2, \text{ч}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	7,5x103	$b_3, \text{ч}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	5x103
$b_4, \text{ч}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	5x103		

* Параметры q , K_i , L_i , a_i , b_i соответствуют процессу конверсии глюкозы.

Теоретически полученные кривые достаточно хорошо описывают экспериментальные данные. На рис. 5.71 приведены экспериментальные кривые конверсии лизина и теоретические кривые, полученные на основе модельных расчетов. Видно, что, несмотря на сложность процессов, теория и эксперимент хорошо соответствуют друг другу.

Рис. 5.72 дает представление о динамике конверсии масляной кислоты при различных ее начальных концентрациях. Рис. 5.73 описывает динамические явления при конверсии смеси этанола и масляной кислоты. Хорошо видны изменения скорости выделения метана (производные к кривой накопления метана) при росте консорциума на смеси субстратов. В целом по всей совокупности субстратов соответствие теории и эксперимента можно считать удовлетворительным.

Из табл. 5.9 следует, что наиболее медленно растущими организмами в консорциуме являются β -оксиданты, осуществляющие окисление органических молекул водой с образованием уксусной кислоты, а также непосредственные продуценты метана, конвертирующие ацетат, водород и CO_2 .

Следует подчеркнуть, что адекватного описания экспериментальных данных невозможно получить без учета регуляторных эффектов, в первую очередь ингибирования роста первого и второго микроорганизма молекулярным водородом ($L_1 = 20 \text{ mM}^{-1}$, $L_4 = 65 \text{ mM}^{-1}$), а также ингибирования второй стадии этанолом. Важно также отметить, что эффективный метаногенез протекает в очень узком диапазоне концентраций ионов водорода ($pK_{a1} = 6,0$; $pK_{b1} = 8,0$; $pK_{a2} = 6,0$; $pK_{b2} = 8,0$; $pK_{a3} = 6,2$; $pK_{b3} = 7,0$). Развита модель позволяет описывать динамику метангенерирующего консорциума достаточно адекватно. Это дает возможность предсказывать поведение системы при различных начальных условиях, различных режимах и времени.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите кинетическую схему и системы дифференциальных уравнений для симбиотической ассоциации двух микроорганизмов. Каковы закономерности роста при $\mu_1 \sim \mu_2$, $\mu_1 \gg \mu_2$ и $\mu_1 \ll \mu_2$? 2. Дайте описание кинетической схемы и системы дифференциальных уравнений для симбиотической ассоциации трех микроорганизмов. 3. Каковы базовые химические реакции метангенерирующей микробиологической ассоциации?

5.12. Общие законы развития популяций

Я думаю, ученые наврали, —
Прокол у них в теории, порез:
Развитие идет не по спирали,
А вкривь, и вкось, в разнос, наперерез.

В. Высоцкий

Количественное изучение развития во времени численности различных популяций — одна из задач современной биокинетики. Значимость знаний о закономерностях роста и эволюции во времени популяций трудно переоценить. На понимании законов роста популяций основаны такие важные отрасли знаний, как количественная микробиология, количественная онкология, экология, демография, социология. Все эти в общем-то далекие по своему конкретному предмету науки объединены одним —

необходимостью понимания поведения во времени большой совокупности, сообщества индивидуумов, детерминированно стремящихся увеличить свою численность. Есть несколько общих свойств популяций, не зависящих от природы составляющих их субъектов. Этими детерминантами развития являются следующие:

1. Популяция для своего нормального развития должна количественно расти. Закон роста всех популяций основан на связи скорости роста с численностью популяции $dN/dt = \mu(t)N$, где условия скорости роста — функция многих переменных и факторов роста.

2. Развитие и рост популяции находятся во взаимодействии с окружающей средой и ее качественной трансформацией.

3. Для трансформации окружающей среды популяция создает и использует необходимый набор методов, приемов, инструментов.

В настоящее время наиболее богатый материал по популяционной динамике имеется для популяций различных клеток. В последнее десятилетие в популяционной микробиологии и количественной онкологии получен богатый экспериментальный материал. Фактически каждый исследователь, работающий в области изучения и селекции микроорганизмов, в генетической инженерии, в биотехнологии, в количественной онкологии, проводит многочисленные эксперименты по популяционной динамике. В целом микроорганизмы и клеточные культуры очень часто используют для изучения фундаментальных биологических явлений. Большая часть современных знаний по молекулярной биологии, молекулярной генетике, генетической инженерии была получена на основе изучения микробов. Это определяется тем, что микроорганизмы и клеточные линии относительно легко культивируются, процесс генерации нового поколения занимает от десятков минут до нескольких часов по сравнению с макроорганизмами, для роста которых требуются годы и десятилетия. Вместе с тем сценарии развития близки для всех популяций, развивающихся в закрытых системах.

Поэтому представляется интересным посмотреть на динамику роста численности популяции человека с точки зрения популяционного микробиолога. Задача облегчается тем, что по популяционной динамике человека существуют достаточно надежные и количественные статистические данные. Эти данные приведены, например, в статье С.П. Капицы «Главная проблема человечества» (Вестник Российской академии наук. Т. 68, № 3, 1998. С. 234–241.)

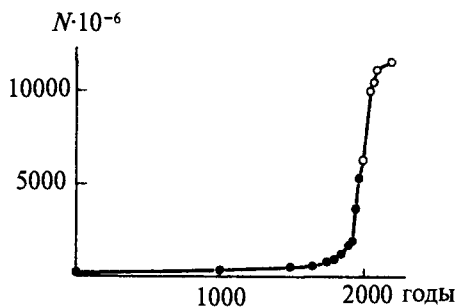


Рис. 5.74. Динамика роста популяции *Homo sapiens*.

Светлые точки — прогноз.

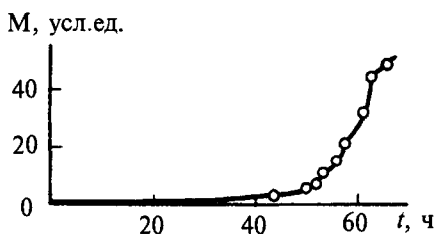


Рис. 5.75. Динамика роста популяции *Pseudomonas aeruginosa*.

тики роста популяции в закрытых системах. Графические данные приведены на рис. 5.74. Видно, что кинетическая кривая роста численности населения Земли весьма похожа на типичные кинетические кривые роста микроорганизмов или клеточных культур в закрытых системах (см. кинетические кривые роста, приведенные в книге).

Например, на рис. 5.75 приведена кинетическая кривая роста *Pseudomonas aeruginosa*. Видно, что как кривая роста микроорганизма, так и кривая численности популяции людей характеризуется хорошо выраженным и продолжительным периодом индукции и активной фазой роста. В демографии этот процесс называют демографическим популяционным переходом. Это действительно очень острый, почти фазовый переход, происходящий почти по принципу «все или ничего». Из кривой роста численности популяции людей следует, что $\mu = 52$ года в настоящее время, что соответствует средней продолжительности активной жизни человека (аналог периода клеточного цикла). Период индукции равен $\tau = 1750 \pm 100$ лет, если отсчет вести от Рождества Христова. Большой период времени, в течение 4,5 млн.

Демографы, занимаясь количественным описанием этой кривой нашли эмпирическое уравнение, достаточно хорошо описывающее динамику процесса в широком интервале времени:

$$N(t) = \frac{200 \times 10^9}{2025 - t}. \quad (5.176)$$

Уравнение хорошо зарекомендовало себя при $t < 2025$ лет. Как утверждают демографы, в период 4,4 млн. лет до н.э. до настоящего времени эмпирическое уравнение достаточно хорошо описывает динамику развития человеческой популяции.

Однако посмотрим на эту кривую с использованием подходов, развитых выше, для описания кинетики роста популяции.

лет, человечество развивалось в высшей степени малоинтенсивно. Численность его составляла проценты от современного состояния. Затем произошел и продолжает развиваться популяционный (демографический) период, который обеспечивает типичный для микробиологических систем популяционный рост.

Как было рассмотрено выше, микробиологическая кинетика дает молекулярное толкование периодам индукции на кривых роста. Это может быть адаптационный процесс, связанный с созданием инструмента — ферментов, способных трансформировать основной субстрат, либо трансформация пресубстрата в субстрат, либо развернутое во времени исчезновение ингибитора роста. Очевидно, что для кинетики роста численности человечества период индукции связан с адаптационным процессом. Происходила достаточно медленная адаптация человека к окружающей среде с созданием необходимых «инструментов» и методов, обеспечивающих дальнейшее развитие популяции. Точно так же, как микроорганизмы в процессе роста изыскивают и модифицируют аппарат трансформации окружающей среды, так и человечество в течение сотен веков разрабатывало основы, позволявшие создать аппарат трансформации среды, адекватной популяционным задачам человечества.

XVII—XVIII вв. для этого были критическими. Что же произошло в 1700 г. или, точнее, в период 1650—1800 гг? История не отмечает сколько-нибудь заметных качественных изменений окружающей человека среды. Ответы на этот вопрос более или менее очевидны. Это был период становления современной науки, создававшей основы промышленной революции. В эти годы были заложены основы современной математики и механики, химии и биологии. Созданы основы дифференциального и интегрального исчисления, заложены основы механики, термодинамики, открыты законы электричества, идентифицированы и описаны многие химические элементы. Открыты микроорганизмы, созданы первые тепловые машины, заложены основы современных методов преобразования энергии. В эти годы жили и творили Ньютон, Лейбниц, Кулон, Карно, Левенгук, Ломоносов, Кавендиш, Фарадей, Ом и другие ученые. Были заложены основы естествознания в современном понимании этого слова. Ученые этого периода — истинные герои человечества, обеспечившие своими трудами возможности его дальнейшего популяционного скачка. Фактически 90% в настоящее время живущих людей обязаны им своим рождением и существованием на Земле. Если ли бы не произошло популяционного перехода, численность популяции людей составляла бы всего лишь 300—500 млн.

Таким образом, суть обсуждаемой аналогии состоит в следующем. Любая свободно развивающаяся популяция (микробиологические клеточные культуры, популяции макроорганизмов), для того чтобы существовать, должна активно расти. Рост популяции однозначно связан с преобразованием среды. Эволюция популяции идет в направлении создания инструмента трансформации вещества и энергии. Для простейших клеток инструменты — это необходимый набор ферментов, для человечества — необходимый уровень знаний, позволяющий создавать средства преобразования среды. Создание необходимого инструмента в обоих случаях обеспечивает рост популяции или в терминах демографии — демографический переход.

Вместе с тем можно обнаружить и ряд качественных различий в динамике популяционного роста двух обсуждаемых систем. Рост популяции людей даже в период малоинтенсивного роста протекает по закону, опережающему экспоненциальный рост. Видно, что удельная скорость роста *Homo sapiens* непрерывно возрастала. Даже в период малоинтенсивного роста происходило качественное изменение условий, обеспечивающих популяционный рост.

Анализ показывает, что рост сравниваемых популяций описывают принципиально различные дифференциальные уравнения. Для иллюстрации существенных различий в законах роста популяций микроорганизма и человека воспользуемся процедурой, описанной в гл. 1: оценим порядок дифференциального

уравнения скорости по численности популяции (аналог определения порядка скорости химической реакции — см. § 1.2). Для этого кинетическую кривую роста популяции продифференцируем и определим скорость роста популяции.

Проще всего это сделать графическим дифференцированием. В результате этой операции получим связь между dN/dt и N . Представим эти данные в логарифмических координатах и определим порядок процесса. Результаты этой процедуры представлены на рис. 5.76. Видно, что в

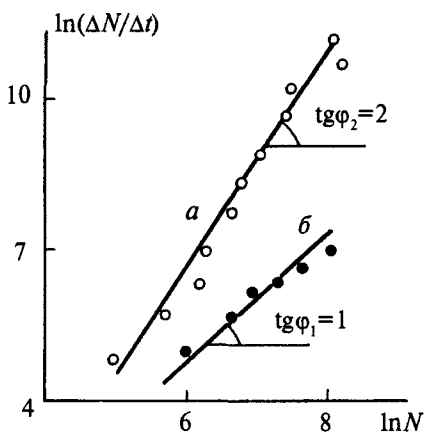


Рис. 5.76. Определение порядка уравнения скорости роста.

а — популяция *H.sapiens*; б — популяция *P.aeruginosa*.

то время как рост микроорганизма характеризуется линейной связью между скоростью процесса и численностью популяции ($n = 0,98 \pm 0,12$), скорость роста популяции человека пропорциональна квадрату численности ($n = 2,1 \pm 0,3$).

Таким образом, дифференциальные уравнения роста обсуждаемых популяций выглядят следующим образом:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad P.aeruginosa \quad (5.177)$$

$$\frac{dN}{dt} = kN^2 \quad H.sapiens \quad (5.178)$$

Это принципиально разные дифференциальные уравнения. Уравнение (5.178) отражает кооперативный характер роста популяции человека. Найденный закон скорости приводит к эмпирическому уравнению (5.176), принятому в демографии.

Действительно, интегрирование (5.178) при начальных условиях $t = 0$, $N = N_0$ (за начало отсчета принята дата Рождения Христа) дает

$$N(t) = \frac{N_0}{1 - kN_0 t} = \frac{1/k}{1/kN_0 - t}. \quad (5.179)$$

Мальтус (1736 г.), впервые обративший внимание на интенсивный рост популяции человека, не оценил его популяционный потенциал. Численность популяции человека увеличивается гораздо быстрее, чем это предсказывает обычный экспоненциальный рост. Особенно драматически скорость роста увеличивается к 2025 г. (точнее к 2035 ± 15 г.). Функции (5.74) и (5.76) имеют разрыв при $t = 2035$ г. ($t \rightarrow 2035$, $N \rightarrow \infty$). Все мы являемся участниками этого демографического перехода, близкого к демографической катастрофе.

Возникает естественный вопрос: что же дальше? — Уравнения (5.177) и (5.179) справедливы в очень интервале времен. Из рис. 5.74 и 5.76 видно, что эти уравнения в приближении к развитию популяции человека адекватно описывают динамику роста по крайней мере в течение последних 2000 лет.

Может ли человечество за оставшиеся 20–30 лет (то есть при жизни нашего поколения) остановить процесс, закон развития которого строго прослеживается последние несколько тысяч лет? Это действительно «главная проблема человечества». Вопрос открыт, и ответ на него мы получим в ближайшие десятилетия.

Из популяционной динамики клеточного роста известно несколько механизмов, замедляющих и останавливающих рост по-

пуляции: расход «лимитирующего» субстрата; ингибирование продуктами; «запрограммированный» отказ от безудержного роста, «прогрессирующая некомпетентность», появление субпопуляции, потерявшей способность к размножению, «контактное» торможение (см. § 5.4).

Расход лимитирующего субстрата очень редко является истинным и единственным фактором, ограничивающим рост популяции. Для популяции человека это также, по-видимому, не самый существенный фактор. Ингибирование продуктом — весьма распространенный механизм остановки роста. Для клеточных культур накопление кислот и существенное смещение pH — реальный фактор, блокирующий развитие популяции. Для популяции человека аналогом ингибирования продуктом является ухудшение экологической обстановки, что, по-видимому, уже в настоящее время сказывается на развитии популяции.

Очевидно, что основную роль в остановке роста популяции человека уже играет и будет играть большую роль в будущем механизм запрограммированного отказа от безудержного роста. Для микроорганизмов и клеточных культур это весьма эффективный механизм стабилизации численности популяции. Для демографического роста запрограммированный отказ обеспечивается контролем рождаемости. Уже в настоящее время этот фактор находит отражение в росте численности популяции человека.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каковы основные закономерности развития человеческой популяции? 2. Какими факторами может быть вызван период индукции на кривой роста популяции *Homo sapiens*? 3. Как определить порядок уравнения скорости роста из популяционной кривой? 4. Приведите дифференциальное интегральное уравнение роста популяции человека.

5.13. Краткое содержание главы

Он был эрудит,
Разбирался неплохо
И в палочках Баха,
И в музыке Коха.

Р. Коган

В настоящей главе рассмотрены основные закономерности, определяющие рост и развитие популяций. Основой всех кинетических моделей роста популяций является уравнение, содер-

жащее член, отражающий «автокаталитическое» увеличение числа особей популяции:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N.$$

Согласно этому базовому уравнению скорость роста пропорциональна плотности популяции.

Для клеточных популяций выделяют несколько фаз развития, включая период индукции (лаг-фаза), фазу экспоненциального роста, стационарную фазу и фазу лизиса.

Наиболее простые уравнения описывают экспоненциальную фазу роста. В период экспоненциальной фазы удельная скорость роста постоянна. Удельная скорость роста может быть интерпретирована как величина, обратная времени клеточного цикла, времени удвоения клеток. Оказалось, что удельная скорость роста прежде всего зависит от концентрации субстрата (или группы субстратов), наиболее необходимых для развития популяции. Такие субстраты называют лимитирующими.

Уравнение зависимости удельной скорости клеток от концентрации лимитирующего субстрата по своей форме полностью аналогично уравнению Михаэлиса, используемого для анализа кинетики ферментативных реакций. Этот тип уравнений характерен для всех разделов биокинетики. Если читатель просмотрит всю книгу от начала до конца, то обнаружит, что одно и то же уравнение описывает концентрационную зависимость скорости ферментативной реакции (уравнение Михаэлиса), молекулярной рецепции (уравнение Кларка), удельной скорости роста микроорганизмов (уравнение Моно). В этот же ряд можно поставить уравнение Лэнгмюра, описывающее явление адсорбции. Этот тип уравнений отражает взаимодействия между молекулами при ограниченном ресурсе центров взаимодействия.

Экспоненциальная фаза роста — удобная фаза исследования характера роста. В экспоненциальной фазе хорошо анализируются эффекты ингибирования, pH-зависимости, ингибирования избытком субстрата и продуктом.

Поскольку существует связь между использованным количеством субстрата и приростом биомассы, уравнение роста может быть проинтегрировано и в неявной форме найдена связь $N(t)$ во всем диапазоне времен. В этой главе развиты методы анализа кинетических кривых роста популяций с учетом динамики расхода субстрата.

Для роста популяции микроорганизмов весьма характерны осложняющие рост явления — ингибирование избытком суб-

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_0} = \mu - \Phi \frac{\frac{M}{N_0} - 1}{t}. \quad (5.70)$$

Возможно также использование разностного уравнения:

$$\frac{\ln \frac{M_i}{M_j}}{t_i - t_j} = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{t_i - t_j} \frac{1}{M_m}. \quad (5.71)$$

Пример 5.7 [1]. Определить механизм ингибирования и константу ингибирования *Propionibacterium shermanii* при выращивании культуры на среде с «лимитирующим» субстратом — сульфитом натрия.

Кинетическая кривая роста этой культуры приведена на рис. 5.28. Преобразование экспериментальных данных в координатах уравнения (5.70) дает: $\mu = 0,032 \text{ ч}^{-1}$, $\Phi = -0,85$. Таким образом, присутствует процесс ингибирования роста культуры избытком субстрата.

Так как ингибирование избытком субстрата заметно, то это говорит о том, что область использованных концентраций сульфита натрия сравнима с K_i и превышает K_s . Следовательно,

$$K_i \approx S_0 \frac{1 - \Phi}{\Phi}.$$

Найденное значение $K_i = 50 \text{ мг/мл}$.

Пример 5.8 [1]. На рис. 5.29 представлены кинетические кривые роста *Methanobacterium thermoautotrophicus* и *Bacillus thuringiensis* в координатах уравнения (5.70). Дайте заключение о факторах, возможно, осложняющих рост этих популяций.

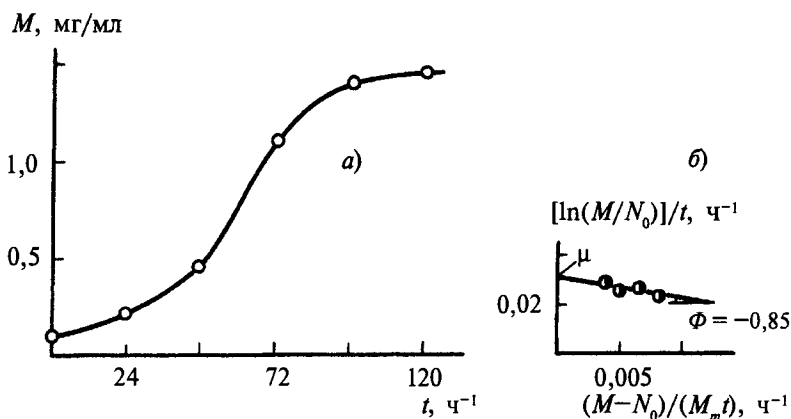


Рис. 5.28. Кинетическая кривая роста популяции *P.shermanii* в присутствии сульфита натрия (а); те же данные в координатах уравнения (5.70) (б).

При сравнении кинетических кривых роста *M.thermoautotrophicus* и *Bac. thuringiensis* (рис. 5.29) видно, что рост первой клеточной популяции осуществляется без процессов осложнения клеточного роста ($0 < \Phi < 1$), а рост второй популяции характеризуется сильным ингибированием продуктом ($\Phi > 1$).

Возможен и более глубокий анализ экспериментальных данных. Например, теоретически можно отличить конкурентное ингибирование от неконкурентного и определить параметры ингибирования. При этом следует иметь в виду, что с усложнением методов анализа экспериментальных данных должна возрастать точность их получения.

Однако обычно в кинетических экспериментах по изучению закономерностей клеточного роста точность экспериментальных данных недостаточна для их углубленного анализа. Тем не менее интересно рассмотреть принципиальные возможности метода.

Чтобы выявить тип ингибирования продуктом реакции, необходимо изучение закономерностей развития клеточных популяций в широком диапазоне концентраций субстрата при нескольких его концентрациях. При этом для определения механизма ингибирования предлагается следующая процедура. Из анализа кинетической кривой определяют параметры μ и Φ . На их основе вычисляются параметры μ_m и K_s (см. § 5.2). Для каждой концентрации субстрата вычисляется функция $K_s/(K_s + S_0)$. Исходя из данных табл. 5.6, можно записать

$$\Phi \frac{K_s + S_0}{K_s} = 1 \quad \text{— неосложненный рост;}$$

$$\Phi \frac{K_s + S_0}{K_s} = 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \quad \text{— конкурентное ингибирование;}$$

$$\Phi \frac{K_s + S_0}{K_s} = 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \left(1 + \frac{S_0}{K_s} \right) \quad \text{— неконкурентное ингибирование.}$$

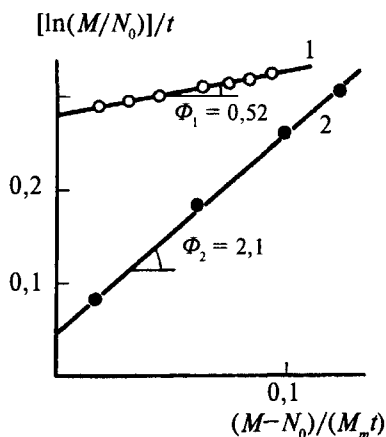


Рис. 5.29. Кинетические кривые роста *M.thermoautotrophicus* (1) и *Bac.thuringiensis* (2) в координатах уравнения (5.70).

НЕКОТОРЫЕ МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ БИОКИНЕТИКИ

В каждой естественной науке есть столько истины, сколько в ней есть математики.

И. Кант

6.1. Элементы математической статистики

Есть три разновидности лжи: ложь, гнусная ложь и статистика.

Б. Дизраэли

Введение в биометрию

Математическая статистика — теоретическая наука, основанная на методах теории вероятностей. Теория вероятностей оценивает априорную (до опыта) возможность появления того или иного события при условии появления этого события, а математическая статистика устанавливает условия появления события апостериорно (после опыта), при конкретной реализации явления. Основную роль в развитии теории математической статистики сыграли К. Пирсон и Р. Фишер.

Биометрия — прикладная наука, использующая методы математической статистики для описания биологических объектов. Учет субстрата в биометрии позволяет сделать правильный выбор аппарата математической статистики, статистической модели и содержательно интерпретировать полученные результаты.

Центральным понятием биометрии является генеральная совокупность. Все объекты одного и того же типа составляют *генеральную совокупность*. Так, например, генеральную совокупность величин каталитических констант пероксидаз хрена составляет совокупность всех измеренных величин каталитических констант пероксидаз, когда-либо (в прошлом, настоящем или в

будущем) выделенных из любого хрена. Таким образом, генеральная совокупность содержит всю информацию о всех индивидах данного типа. Однако достаточно очевидно, что изучение генеральной совокупности практически невозможно (за исключением редких конечных случаев).

Поэтому в реальных исследованиях работают с *выборочными совокупностями (выборками)*, отбирая часть индивидуумов из генеральной совокупности. При этом одной из основных задач математической статистики является оценивание параметров генеральной совокупности по результатам выборочной.

Биокинетика предполагает количественное изучение ряда параметров, изменяющихся в зависимости от условий проведения эксперимента. Важно отметить, что *никакое измерение не может быть выполнено абсолютно точно, что результат любого измерения всегда содержит некоторую погрешность*. Поэтому основными задачами биокинетического исследования являются:

1. Описание генеральной совокупности на основании выборочных экспериментальных данных.
2. Определение значимости (неслучайного характера) различий между совокупностями экспериментальных данных.
3. Изучение статистической связи между выборочными данными.

Достаточно часто стараются провести измерения с наибольшей точностью, чтобы уменьшить ошибку измерений. Однако следует иметь в виду, что чем точнее измеряется изучаемая величина, тем труднее это сделать, а зачастую излишняя точность только мешает. Следовательно, при измерении заданной величины не следует превышать ту точность измерений, которая необходима для решения поставленной задачи. Поэтому в книге приводятся практические рекомендации по выбору точности измерений для основных биокинетических методов. Их можно найти в разделах, посвященных описанию соответствующих методов.

Введение в теорию погрешностей

— Взгляни на этого математика, — сказал логик, — он замечает, что первые девяносто девять чисел меньше сотни, и отсюда с помощью того, что он называет индукцией, заключает, что все числа меньше сотни.

— Физик верит, — сказал математик, — что 60 делится на все числа. Он замечает, что 60 делится на 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Он проверяет несколько других чисел, например 10, 20 и 30, взятых, как он говорит, наугад. Так как 60 делится и на них, то он считает экспериментальные данные достаточными.

— Да, но взгляни на инженера, — возразил физик. — Инженер подозревает, что все нечетные числа простые. Во всяком случае, 1 можно рассматривать как простое число, доказывает он. Затем идут 3, 5, 7, все, несомненно, простые. Затем идет 9 — досадный случай; 9, по видимому, не является простым числом. Но 11 и 13, конечно простые. Возвратимся к 9, — говорит он, — я заключаю, что 9 должно быть ошибкой эксперимента.

Д. Поппа

Изучением закономерностей поведения погрешностей измерения занимается *теория погрешностей*. В ней принято разделять все погрешности измерения на:

1. *Систематические*, которые возникают при действии факторов, одинаковым образом влияющих на выполнение всех измерений, проводимых одним и тем же прибором. При этом во всех измерениях величина систематической ошибки одинакова.

2. *Случайные*, возникновение которых связано с действием факторов, меняющихся от опыта к опыту. Величина случайной ошибки варьирует от измерения к измерению.

3. *Грубые (выбросы)*, связанные с ошибкой проведения эксперимента, например с неправильной записью показаний прибора. Для их устранения в биокинетике используют постановку опытов в параллелях (см. гл. 1). Чаще всего выбросы связаны с нарушением однородности экспериментального материала или с несоблюдением условий проведения эксперимента (неточным воспроизведением эксперимента).

Параллельные наблюдения (измерения) проводятся одновременно, в одних и тех же условиях. При этом число параллелей определяется исходя из необходимой точности измерений и разрешающей способности метода. Обычно в биокинетике ставят опыт не менее чем в 3–5 параллелях.

Постановка опытов в параллелях позволяет выявить ошибки, связанные непосредственно с проведением эксперимента (например, забыли добавить реактив), контрольные опыты позволяют выявить ошибки, связанные с неправильной подготовкой эксперимента (плохо вымытая посуда, неправильно приготовленный реактив и т.д.).

В отличие от постановки опытов в параллелях, которые ставятся одновременно, в биокинетике достаточно часто используются *контрольные опыты*, проводимые в другой момент времени (на другой день, через неделю и т.д.) в тех же самых условиях. Для контрольных опытов используют те же самые или заново приготовленные реактивы.

Для нивелирования влияния систематических ошибок на результаты исследований наиболее часто пытаются перевести систематическую погрешность измерения в случайную, за счет организации измерений таким образом, чтобы постоянный фактор, влияющий на результат измерений, в каждом из них действовал по-разному.

Так, например, для определения числа клеток в культуральной жидкости можно отобрать небольшую аликвоту этой жидкости и подсчитать число клеток в ней несколько раз. Домножив полученный результат на отношение объемов культуральной жидкости и аликвоты, можно определить число клеток в культуральной жидкости. Однако результат такого определения числа клеток будет искажен систематической ошибкой определения объема аликвоты и ее неоднородностью.

Если же из культуральной жидкости отобрать несколько аликвот и в каждой из них произвести подсчет клеток только один раз, то при том же числе измерений, что и в предыдущем случае, систематическая ошибка измерений будет превращена в случайную. При этом величину случайной ошибки, в отличие от систематической, легко оценить с помощью методов математической статистики.

Нормальный закон распределения

В исследовании, проводимом в идеальных условиях, присутствует только случайная ошибка. Свойства этой ошибки таковы, что для увеличения оценки изучаемой величины в n раз необходимо в n^2 раз увеличить число измерений. Так, для увеличения точности оценки исследуемого параметра в 2 раза необходимо увеличить число его измерений в 4 раза.

Часто в эксперименте проводят однократные измерения разных объектов, взятых из одной и той же группы. В теории вероятностей показано, что при достаточно большом числе измерений эта ошибка имеет так называемый *нормальный (гауссовский) закон распределения*. На практике этим достаточно большим чис-

лом измерений является 30. Рассматриваемые ниже методы математической статистики используют предположение о том, что выборка имеет приближенно (асимптотически) нормальный закон распределения. В специальной математической литературе можно найти и другие методы, так называемые *методы непараметрического оценивания* или *непараметрические методы*.

В простейшем случае предполагают, что закон распределения выборочных оценок параметров генеральной совокупности, так же как и закон распределения случайной ошибки измерения, нормальный. Существуют специальные методы, позволяющие проверить данное предположение — λ -критерий Колмогорова-Смирнова, χ^2 -критерий Пирсона.

Нормальный закон распределения полностью описывается двумя параметрами — математическим ожиданием и дисперсией.

Математическое ожидание оценивают по формуле

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (6.1)$$

где n — число измерений; x_i — значение, полученное при i -м измерении.

Дисперсия оценивается по формуле

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2. \quad (6.2)$$

Кривая нормального закона распределения симметрична относительно математического ожидания. Величина дисперсии определяет степень разброса изучаемого параметра: чем больше дисперсия, тем больше степень разброса (рис. 6.1). Заметим, что 64%

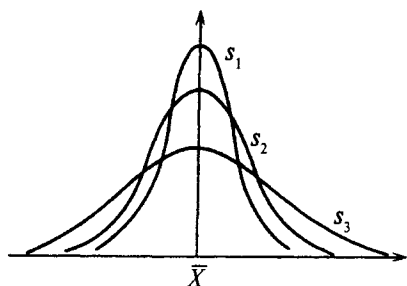


Рис. 6.1. Нормальный закон распределения ($s_1 < s_2 < s_3$)

оценок параметров отклоняются от $\bar{x}$ не более чем на $\pm s$. Поэтому в научных статьях, отчетах и т.д. экспериментальные данные представляют в виде $\bar{x} \pm s$.

В качестве характеристики разброса используют коэффициент вариации

$$w = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (6.3)$$

при $s \ll \bar{x}$ и $\bar{x} \neq 0$.

Оценка грубых выбросов

n	y_0	n	y_0	n	y_0	n	y_0
3	1,41	9	2,35	15	2,64	25	2,88
4	1,71	10	2,41	16	2,67	30	2,96
5	1,92	11	2,47	17	2,70	40	3,08
6	2,07	12	2,52	18	2,73	50	3,16
7	2,18	13	2,56	19	2,75	100	3,40
8	2,27	14	2,60	20	2,78	500	3,87

Коэффициент вариации позволяет сравнивать вариабельности совокупностей, имеющих различную размерность. Чем больше коэффициент вариации, тем больше относительное рассеяние совокупности.

Выявление выбросов

Вычисленные величины математического ожидания и дисперсии позволяют *выявить выбросы* на основании следующей формулы:

$$v = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s} . \quad (6.4)$$

Если вычисленная величина v превышает значения y_0 , приведенные в табл. 6.1, то значение x_i является выбросом с вероятностью 95%.

Специальные методы математической статистики

На основании вычисленных оценок математического ожидания и дисперсии производится их сравнение. Наиболее часто употребляемым методом является *t-критерий Стьюдента*. Данный метод позволяет сравнивать средние величины выборок, примерно равных по объему при достаточно большом числе наблюдений и нормальном законе распределения оцениваемых величин или эмпирически вычисленных параметров. Выбор конкретного метода вычисления *t*-статистики Стьюдента зависит от соотношения дисперсий сравниваемых параметров (оценки дисперсий сравниваются при помощи *F-критерия Фишера*) и от того, были ли изу-

чаемые параметры измерены на одних и тех же объектах в разных условиях (критерий «до и после», «для связанных совокупностей») или на разных объектах в одних и тех же условиях (критерий «для несвязанных совокупностей»).

t-критерий Стьюдента позволяет установить, с какой вероятностью различие оценок исследуемых параметров, полученных по сравниваемым параметрам, может считаться случайным, т.е. обе выборки происходят из одной генеральной совокупности. Также *t-критерий* позволяет сравнивать теоретическое и эмпирическое значение. В тех случаях, когда *t-критерий Стьюдента* неприменим, используют *непараметрические методы статистики*.

При изучении нескольких параметров может возникнуть необходимость выявить и оценить наличие связей между ними, их силу и направленность. Такая задача решается с помощью *корреляционного и регрессионного анализа*. Наиболее часто в качестве аппарата корреляционного и регрессионного анализа используется *метод наименьших квадратов*. Данный метод позволяет построить эмпирическую зависимость (чаще линейную) между выборками таким образом, чтобы сумма квадратов отклонений выборочных значений от этой эмпирической зависимости была наименьшей.

Литература

1. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М., 1963.
2. Налимов В.В. Применение математической статистики при анализе вещества. М., 1960.
3. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М., 1964.
4. Урбах В.Ю. Математическая статистика для биологов и медиков. М., 1963.
5. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ. М., 1982.
6. Гуревич К.Г., Торопов А.В., Кост Н.В. Журн. Высш. нервн. деят. 1998. №6. С. 1143—1148.
7. Барлетт М.С. Многомерная статистика. М., 1968.
8. Дюран Б., Оддел П. Кластерный анализ. М., 1977.
9. Плохинский Н.А. Биометрия. М., 1970.

6.2. Графический метод определения числа экспонент и их параметров

От теории как таковой может быть только один прок: она заставляет нас поверить во взаимосвязь явлений.

И.В. Гете

В биокинетике достаточно часто возникает задача определения числа экспонент, которые могли бы наилучшим образом описать экспериментальные данные, а также определения параметров этих экспонент. Такая постановка задачи неслучайна и связана с тем, что исходя из теоретических исследований большинство биокинетических зависимостей должно описываться экспонентой или суммой экспонент. Так, в предыдущих главах было показано, что число экспонент соответствует числу промежуточных соединений в реакциях образования продуктов ферментативной реакции, числу камер в фармакокинетических моделях и т.д.

Задача определения числа экспонент и их параметров является не тривиальной математической задачей. Большинство используемых методов не гарантирует единственности ее решения, что связано как с наличием ошибки в определении экспериментальных данных, так и с особенностью поведения экспоненциальной функции. Особенность задачи заключается в том, что разница значений между двумя близлежащими экспонентами не превышает разницы между их показателями:

$$|C \exp[-wt] - C \exp[-(w + \delta)t]| \leq \delta.$$

Поэтому реально показатели экспонент могут быть определены с точностью до порядка, при условии использования специальных методов — с точностью для половины порядка.

В настоящее время предложено достаточно большое количество методов определения числа экспонент и их параметров. В книге рассмотрены только два метода: графический и метод Прони (см. § 6.3). Графический метод является более простым, наглядным и наиболее часто используемым в биокинетике. Во всех рассмотренных в тексте примерах показатели экспонент определялись именно графическим методом. Следует заметить, что точность графического метода невелика.

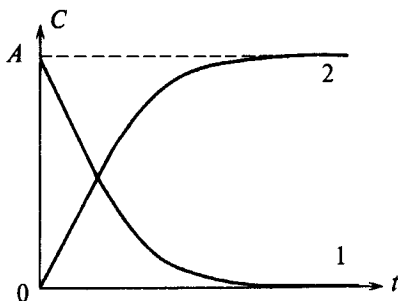


Рис. 6.2. Описание экспериментальных данных одной экспонентой. 1 — случай убывания; 2 — случай возрастания.

Предположим, что экспериментальные данные описываются одной экспонентой (рис. 6.2). Это означает, что они могут быть описаны так:

$$C = A \exp(-Bt), \text{ если } C \text{ убывает;}$$

$$C = A [1 - \exp(-Bt)], \text{ если } C \text{ возрастает.}$$

Величину A принято называть *предэкспоненциальным множителем*, а величину B — *показателем экспоненты*.

Если C с течением времени убывает, то $A = C_0$ и

$$\frac{C}{C_0} = \frac{C}{A} = \exp[-Bt]; \quad \ln \frac{C}{C_0} = -Bt,$$

Таким образом, в случае, если C убывает, параметр B определяется по тангенсу угла наклона в координатах $\{\ln(C/C_0), t\}$ (рис. 6.3).

Если C с течением времени возрастает, то $A = C_\infty$. Тогда

$$\frac{C}{C_\infty} \equiv \frac{C}{A} = 1 - \exp[-Bt];$$

$$1 - \frac{C}{C_\infty} = \exp[-Bt];$$

$$\ln \left[1 - \frac{C}{C_\infty} \right] = -Bt.$$

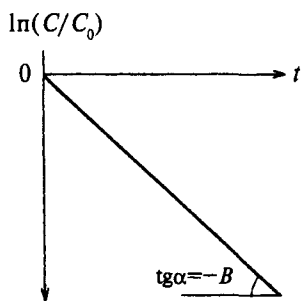


Рис. 6.3. Определение параметров убывающей экспоненциальной зависимости.

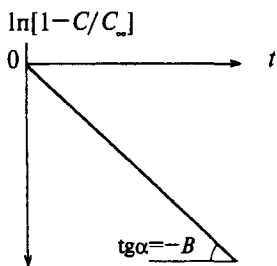


Рис. 6.4. Определение параметров возрастающей экспоненциальной зависимости.

Таким образом, если C возрастает, то параметр B определяется по тангенсу угла наклона в координатах $\{\ln[1 - (C/C_\infty)], t\}$ (рис. 6.4).

Более сложен для графического анализа случай, когда C описывается суммой нескольких экспонент. Рассмотрим случай, когда C является суммой двух экспонент (для n экспонент рассуждения аналогичны).

Если C представимо в виде суммы экспонент, то величину C можно записать следующим образом:

$$C = A_1 \exp(-B_1 t) + A_2 \exp(-B_2 t),$$

если C убывает,

$C = A_1 [1 - \exp(-B_1 t)] + A_2 [1 - \exp(-B_2 t)]$, если C возрастает,

$C = A_1 \exp(-B_1 t) + A_2 [1 - \exp(-B_2 t)]$, если C возрастает
и убывает.

Зависимости $C(t)$ приведены на рис. 6.5. Если C описывается несколькими экспонентами, то в полулогарифмических координатах ($\ln C, t$) наблюдается точка перегиба функции концентрации (см. рис. 6.5).

При графическом методе определения параметров экспонент предполагается, что показатель одной экспоненты намного больше другой. Для определенности будем предполагать, что $B_1 \gg B_2$ (на практике достаточно различий в 7–10 раз); если показатели экспонент отличаются меньше, то велика погрешность их вычисления с помощью графического метода.

Назовем экспоненту с показателем B_1 «быстрой», а экспоненту с показателем B_2 — «медленной». Это означает, что при малых величинах времени наблюдения за величиной C экспонента с показателем B_2 практически не успевает измениться, следовательно, поведение величины C практически полностью описывается поведением экспоненты с показателем B_1 . При больших величинах времени наблюдения за величиной C экспонента с показателем B_1 практически достигает равновесия, следовательно, ее вкладом можно пренебречь, а величина C описывается в основном экспонентой с показателем B_2 .

Следует заметить, что выбор относительно малых и больших времен наблюдения за величиной C во многом условный. Ориентиром может служить точка перегиба в полулогарифмических координатах: меньшие времена наблюдения относительно малы, большие — велики.

Определение параметров экспонент начинают с «медленной» экспоненты. При этом рассматривают процесс при относительно больших величинах времени его протекания, как бы опуская начальные точки. В случае, если экспонента с показателем B_2 убываю-

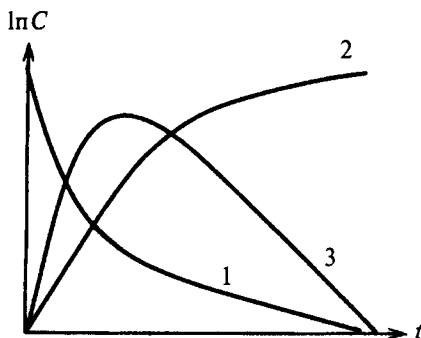


Рис. 6.5. Двухэкспоненциальные зависимости.

1 — случай убывания, 2 — случай возрастания, 3 — случай возрастания и убывания.

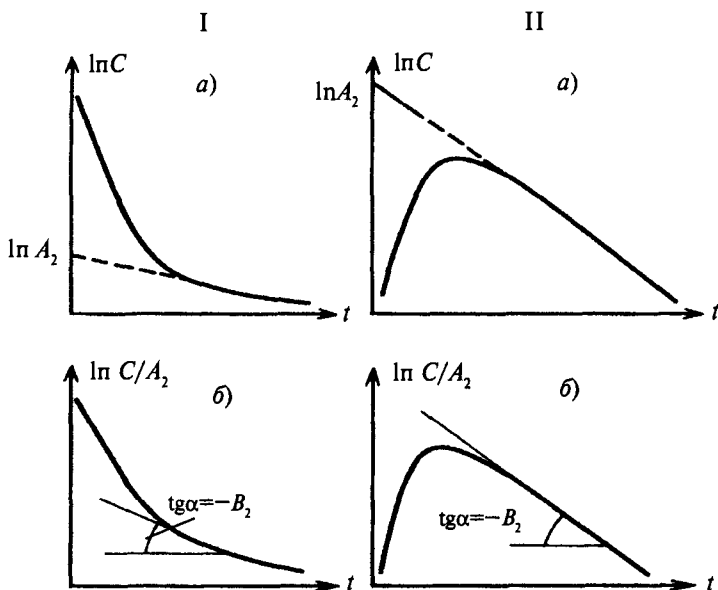


Рис. 6.6. Определение параметров «медленной» экспоненты.

I — убывающая экспоненциальная зависимость; II — возрастающая и убывающая экспоненциальная зависимость. а — определение предэкспоненциального множителя; б — определение показателя экспоненты.

щая, определение параметров «медленной» экспоненты проводится так же, как и для случая одноэкспоненциальной зависимости в полулогарифмических координатах ($\ln C/A_2$, t) (рис. 6.6). После того как параметры «медленной» экспоненты найдены, вычисляют C_m для всех относительно малых времен наблюдения за величиной C . C_m равно значению «медленной» экспоненты при каждом малом времени наблюдения за C ($C_m = A_2 \exp[-B_2 t]$). Затем находят $C_6 = C - C_m$ для каждого из малых времен протекания процесса. Величина C_6 содержит информацию только о «быстрой» экспоненте. Исходя из значений C_6 определяют параметры «быстрой» экспоненты в соответствии с выше рассмотренными методами (рис. 6.7). Заметим, что если величина C возрастает и описывается двумя экспонентами, то для определения параметров этой зависимости вычисляется величина $C' = C_{\max} - C$, где $C_{\max}$ — максимальное значение C . Параметры полученной зависимости C' определяются так же, как и для случая, когда C убывает и описывается двумя экспонентами.

Следует заметить, что графический метод анализа предпола-

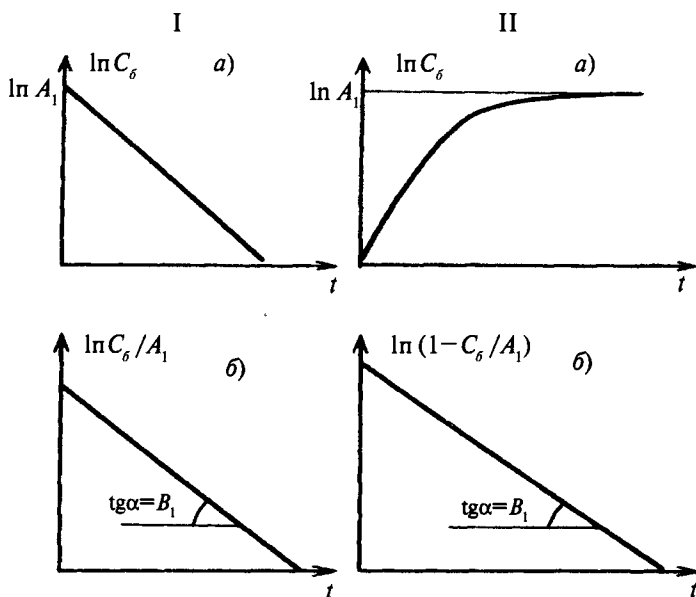


Рис. 6.7. Определение параметров «быстрой» экспоненты.

I — убывающая экспоненциальная зависимость, II — возрастающая и убывающая экспоненциальная зависимость. а — определение предэкспоненциального множителя, б — определение показателя экспоненты.

гает наличие не менее пяти экспериментальных точек на каждую экспоненту.

Литература

Бронштейн И.Н., Семендяев К.А. Справочник по математике. М., 1986.

6.3. Использование метода Прони для определения числа экспонент и их параметров

Он стал поэтом. Для математика у него не хватало воображения.

К. Гаусс

Наиболее часто в биокинетических исследованиях для определения числа экспонент и их параметров используется графический метод. В настоящее время во многих стандартных статистических про-

граммах данная процедура автоматизирована за счет применения регрессионных методов анализа. Однако данный метод применим лишь при наличии большого числа экспериментальных данных (не менее 4–5 точек на экспоненту) и при условии, что показатели экспонент отличаются более чем на полпорядка. Последнее условие затрудняет использование графического метода, так как достаточно часто в биокинетических экспериментах показатели экспонент не отличаются существенным образом.

Данных недостатков лишен метод Прони, предложенный в 1975 г. Метод представляет собой простую процедуру определения значений параметров линейной комбинации экспоненциальных функций. Основным достоинством метода является возможность определения не только показателей экспонент, но и получения формализованных критериев выбора числа экспонент. Кроме того, модификация метода Прони, предложенная в 1983 г. Кумаресаком и др., позволяет легко определять параметры экспонент даже при наличии зашумленных экспериментальных данных.

При анализе экспериментальных данных методом Прони предполагается, что

$$y_n = x_n + w_n, \quad (6.5)$$

где y_n — n -е значение экспериментальных данных, $n = \overline{1, N}$; x_n — экспоненциальный сигнал; w_n — шум при определении n -го экспериментального значения. Экспоненциальный сигнал x_n представим в виде

$$x_n = \sum_{k=1}^M a_k (\exp[s_k])^k; \\ N > 2M.$$

Таким образом, для определения числа экспонент и их параметров методом Прони достаточно 2–3 точек для каждой экспоненты.

Алгоритм метода Прони может быть сведен к трем этапам:

1. Используя метод наименьших квадратов, минимизируется ошибка аппроксимации путем подбора коэффициентов $\hat{b}_k$:

$$A = \sum_{n=M+1}^N \left[\sum_{k=1}^M \hat{b}_k y_{n-k} + y_n \right]^2.$$

Если M заранее неизвестно, то сначала M берется равным 1. Обозначим ошибку аппроксимации в этом случае E_1 . Затем возьмем M , равное 2, и обозначим ошибку аппроксимации E_2 и т.д. Если на j -м шаге $|E_j - E_{j-1}| < \epsilon$, где ϵ — заданная заранее точность вы-

числений (точность определения экспериментальных данных), то $M = j-1$.

2. После того как получены M значений $\hat{b}_k$, находят корни полинома:

$$\hat{B}(z) = \sum_{k=0}^M \hat{b}_k z^{-k} = \prod_{k=1}^M [1 - \exp[\hat{s}_k] z^{-1}], \quad \hat{b}_0 = 1.$$

Зная корни полинома, определяют показатели экспонент $\hat{s}_k$.

3. Предэкспоненциальные множители находят путем минимизации суммарной ошибки методом наименьших квадратов:

$$E = \sum_{n=1}^N \left(y_n - \sum_{k=1}^M \hat{a}_k [\exp[\hat{s}_k]]^k \right)^2.$$

Литература

1. Кумаресак Р., Тафтс Д.У., Шарф Л.Л. ТИИЭР. 1984. Т. 72. С. 97–100.
2. Ланзон К. Практические методы прикладного анализа. М., 1961.
3. Hildebrand F.B. Introduction to numerical analysis. N.Y., 1956.
4. de Prony R.-J. Ecole Polytechnique, 1975. P. 24–76.
5. Rife D.C., Boorstyn R.R. Bell Syst. Tech. J., 1976. P. 1389–1410.
6. Тафтс Д.У., Кумарисак Р. ТИИЭР, 1982. Т. 70. С. 77–94.
7. Лесин В.В., Лисовец Ю.П. Основы методов оптимизации. М., 1995.
8. Плис А.И., Сливина Н.А. Лабораторный практикум по высшей математике. М., 1994.

6.4. Решение дифференциальных уравнений методом неопределенных коэффициентов

И терпентин на что-нибудь полезен!

К. Прутков

При построении биокинетических моделей практически всегда возникает необходимость решать дифференциальные уравнения. Решение произвольного дифференциального уравнения может быть найдено только численными методами, рассмотрение которых выходит за рамки настоящей книги.

Между тем в биокинетике достаточно часто встречаются линейные дифференциальные уравнения или же уравнения, сводимые к линейным за счет введения дополнительных предположений. Так, дифферен-

циальное уравнение закона действующих масс бимолекулярной реакции является нелинейным. Но если одно из веществ взять в избытке к другому, то концентрацию первого вещества можно считать постоянной, и тогда дифференциальное уравнение закона действующих масс для этой системы будет линейным.

Для решения линейных дифференциальных уравнений предложены стандартные методы. Наиболее часто используемыми являются метод неопределенных коэффициентов (вариации постоянных) и метод операторных преобразований. Ниже рассматривается метод неопределенных коэффициентов, а в следующем параграфе метод преобразований Лапласа как один из операторных методов.

Пусть линейное дифференциальное уравнение записывается в следующем виде:

$$a_1 \frac{dy}{dt} + a_2 \frac{d^2 y}{dx^2} + \dots + a_n \frac{d^n y}{dx^n} = f(x).$$

Решим уравнение

$$a_1 \frac{dy}{dt} + a_2 \frac{d^2 y}{dx^2} + \dots + a_n \frac{d^n y}{dx^n} = 0.$$

Данное уравнение является уравнением с разделяющимися переменными. Его решение записывается следующим образом:

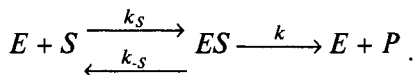
$$y = C_1 \exp[-b_1 x] + C_2 \exp[-b_2 x] + \dots + C_n \exp[-b_n x],$$

где b_n — корни уравнения $a_1 b + a_2 b^2 + \dots + a_n b^n = 0$, а C_n — константы. (Если b_n — кратные корни, то для корня второй кратности $y = C_1 \exp[-bx] + C_2 x \exp[-bx]$.)

Полученное решение подставляется в исходное дифференциальное уравнение. При этом величины C принимают за новые переменные.

Пример 6.1. Получить дифференциальное уравнение для фермент-субстратного взаимодействия.

Взаимодействие фермента с субстратом записывается следующей кинетической схемой:



Дифференциальное уравнение закона действующих масс для этой схемы выглядит так:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_S[E][S] - (k_{-S} + k)[ES].$$

Предположение об избытке концентрации субстрата по отноше-

нию к ферменту превращает данное дифференциальное уравнение в линейное. При этом $[E] = [E_0] - [ES]$. Тогда дифференциальное уравнение закона действующих масс запишется следующим образом:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_S[E_0][S] - (k_S[S] + k_{-S} + k)[ES] .$$

Решим полученное уравнение методом неопределенных коэффициентов. Тогда

$$\frac{d[ES]}{dt} = -(k_S[S] + k_{-S} + k)[ES] ; \quad [ES] = C \exp[-bt] ,$$

где $b = -(k_S[S] + k_{-S} + k)$.

Подставим полученное решение в исходное дифференциальное уравнение:

$$\begin{aligned} \frac{d(C \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t])}{dt} = \\ = k_S[E_0][S] - (k_S[S] + k_{-S} + k)C \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t] \end{aligned}$$

Следовательно,

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t] - C(k_S[S] + \\ + k_{-S} + k) \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t] = \\ = k_S[E_0][S] - (k_S[S] + k_{-S} + k)C \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t] . \end{aligned}$$

Сократим одинаковые члены в левой и правой части этого уравнения:

$$\frac{dC}{dt} \exp[-(k_S[S] + k_{-S} + k)t] = k_S[E_0][S] ,$$

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} &= k_S[E_0][S] \exp[(k_S[S] + k_{-S} + k)t] , \\ C &= \frac{k_S[E_0][S] \exp[(k_S[S] + k_{-S} + k)t]}{k_S[S] + k_{-S} + k} + D , \end{aligned}$$

где D — новая константа, определяемая исходя из начальных условий.

Литература

Бронштейн И.Н., Семендяев К.А. Справочник по математике. М., 1986.

6.5. Применение преобразований Лапласа для решения линейных дифференциальных уравнений

Мы ищем лишь удобства вычислений,
А в сущности не знаем ничего.

М. Волошин

Преобразования Лапласа позволяют сводить решение линейных дифференциальных уравнений к решению линейных алгебраических уравнений. Данный метод в значительной мере сокращает объем вычислений. Однако он неприменим для решения нелинейных дифференциальных уравнений.

Для решения линейного дифференциального уравнения методом преобразований Лапласа находят отображение действительных функций на комплексную плоскость по формуле, называемой прямым преобразованием Лапласа:

$$F(s) = L[f(t)] = \int_0^{+\infty} f(t)e^{-st} dt, \quad (6.6)$$

где $F(s)$ — комплексное изображение действительной функции $f(t)$.

Заметим, что переменная s является аналогом времени на комплексной плоскости.

После того как в комплексной плоскости решена система линейных алгебраических уравнений, возвращаются к плоскости оригиналов, используя обратные преобразования Лапласа:

$$f(t) = L^{-1}[F(s)] = \frac{1}{2\pi i} \int_{t-i\infty}^{t+i\infty} F(s)e^{st} ds. \quad (6.7)$$

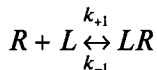
Заметим, что для большинства функций преобразования Лапласа известны и занесены в специальные таблицы. Поэтому на практике редко используют формулы (6.6) и (6.7), применяя вместо них формулы, приведенные в табл. 6.2 и 6.3. Кроме того, отметим следующее важное свойство преобразований Лапласа (табл. 6.2, свойство

п. 4). На комплексной плоскости дифференциалу $\frac{d}{dt} f(t)$ соответствует многочлен $sF(s) - f_0$, где f_0 — начальные условия задачи Коши для исходного дифференциального уравнения. Таким обра-

зом, в отличие от метода неопределенных коэффициентов, преобразования Лапласа позволяют находить не семейство решений дифференциального уравнения, а конкретное решение задачи Коши.

Пример 6.2. Получить с помощью преобразований Лапласа решение дифференциального уравнения для схемы лиганд-рецепторного взаимодействия (3.2).

В простейшем случае лиганд-рецепторное взаимодействие (см. § 3.1) описывается схемой



и дифференциальным уравнением

$$\begin{aligned} \frac{d[LR]}{dt} &= k_{+1}[R_0][L] - k_{+1}[L][LR] - k_{-1}[LR], \\ [LR]_{(0)} &= 0. \end{aligned}$$

Возьмем преобразования Лапласа от левой и правой части этого уравнения:

$$\begin{aligned} L\left[\frac{d[LR]}{dt}\right] &= s[LR]_{(s)} - [LR]_{(0)}; \\ L[k_{+1}[R_0][L] - k_{+1}[L][LR] - k_{-1}[LR]] &= \\ &= L[k_{+1}[R_0][L_0]] - L[k_{+1}[L][LR]] - L[k_{-1}[LR]] = \\ &= k_{+1}[R_0][L]L[1] - k_{+1}[L]L[LR] - k_{-1}L[LR] = \\ &= k_{+1}[R_0][L]\frac{1}{s} - k_{+1}[L][LR]_{(s)} - k_{-1}[LR]_{(s)}. \end{aligned}$$

Приравняв левые и правые части отображения дифференциального уравнения на комплексной плоскости, получим

$$s[LR] - 0 = \frac{k_{+1}[L][R_0]}{s} - k_{+1}[L][LR] - k_{-1}[LR],$$

или

$$[LR] = \frac{k_{+1}[L][R_0]}{s(s + k_{+1} + k_{-1})}.$$

Возвращаясь к действительной плоскости, можно получить

$$[LR] = \frac{k_{+1}[R_0][L]}{k_{+1}[L] + k_{-1}} (1 - \exp[-(k_{+1}[L] + k_{-1})t]).$$

Данное уравнение полностью совпадает с уравнением (3.1), полученным в гл. 3 методом неопределенных коэффициентов.

Основные свойства преобразований Лапласа

п/п	Название	Формула
1.	Теорема о сложении	$L\left[\int_0^{\infty} u(t-\tau)v(\tau)dt\right] = L[u(t)]L[v(t)]$
2.	Теорема о свертке	$L\left[\int_0^{\infty} u(t-\tau)v(\tau)dt\right] = L[u(t)]L[v(t)]$
3.	Теорема об интегрировании	$L\left[\int_0^t f(t)dt\right] = \frac{1}{s} L[f(s)]$
4.	Теорема о дифференцировании	$L[f^{(n)}(t)] = s^n F(s) - s^{n-1}f_0 - \dots - sf_0^{(n-2)} - f_0^{(n-1)},$ $F(s) = L[f(t)]$
5.	Теорема о запаздывании	$L[f(t-b)] = \exp[-bt]L[f(t)]$
6.	Теорема о подобии	$L[f(at)] = \frac{1}{a} F\left(\frac{s}{a}\right),$ $a > 0, F(s) = L\{f(t)\}$
7.	Теорема о смещении	$L[\exp[-bt]f(t)] = F(s+b),$ $F(s) = L[f(t)]$
8.	Теорема об умножении	$L[t^n f(t)] = (-1)^n F^{(n)}(s),$ $F(s) = L[f(t)]$
9.	Теорема о делении	$L\left[\frac{1}{t} f(t)\right] = \int_s^{+\infty} F(q)dq,$ $F(s) = L[f(t)]$

Основные преобразования Лапласа

$L[f(t)]$	$f(t)$
$1/s$	1
$1/(s+a)$	$\exp[-at]$
$1/s^2$	t
$1/[s(s+a)]$	$1/a \times (1 - \exp[-at])$
$1/(s+a)^2$	$t \exp[-at]$
$1/(s^2 + a^2)$	$1/a \times \sin[at]$

Литература

Бронштейн И.Н., Семендяев К.А. Справочник по математике. М., 1986.

6.6. Теорема Тихонова

Мало быть Магелланом. Надо, чтоб еще где-то был Магелланов пролив.

Ф. Кривин

Теорема Тихонова является строгой математической формулировкой метода квазистационарных приближений, рассмотренного в ферментативной кинетике (см. гл. 2). Данная теорема позволяет выявить в системе дифференциальных уравнений так называемые «быстрые» уравнения, т.е. те уравнения, которые описывают поведение переменных, быстро достигающих стационарного состояния. Теорема Тихонова позволяет заменить эти дифференциальные уравнения алгебраическими, что существенным образом упрощает решение систем дифференциальных уравнений.

Ниже приведена формально-математическая формулировка теоремы Тихонова без ее доказательства.

Рассмотрим систему дифференциальных уравнений

$$\frac{dx_i}{dt} = f(x_1, \dots, x_n), i = \overline{1, n}. \quad (6.8)$$

Приведем ее с помощью линейных преобразований к безразмерному виду и перепишем следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dx_i}{dt} = f(x_1, \dots, x_n) \\ \varepsilon \frac{dx_j}{dt} = f(x_1, \dots, x_n). \end{cases} \quad (6.9)$$

где ε — малый параметр.

Система (6.8) называется *полной*. Система (6.9) называется *вырожденной*, если в ней дифференциальные уравнения, содержащие малый параметр, заменены алгебраическими уравнениями

$$\begin{cases} \frac{dx_i}{dt} = f(x_1, \dots, x_n) \\ 0 = f(x_1, \dots, x_n) \end{cases} \quad (6.10)$$

Теорема Тихонова. Решение вырожденной системы дифференциальных уравнений (6.10) стремится к решению полной системы дифференциальных уравнений (6.8) при $\varepsilon \rightarrow 0$, если:

а) система алгебраических уравнений присоединенной системы имеет изолированный корень;

б) этот корень является устойчивым стационарным состоянием;

в) начальное состояние системы находится в области притяжения этого корня;

г) выполнены условия теоремы Коши, т.е. правые части дифференциальных уравнений, входящих в систему (6.8), непрерывны вместе со всеми производными.

Литература

Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическая биофизика. М., 1984.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. Введение в химическую кинетику	7
§ 1.1. Кинетический эксперимент	7
История химической кинетики (7). Современные представления о механизме химической реакции (9). Биокинетика (12). Кинетический эксперимент (13). Параметры кинетического эксперимента (15). Кинетические кривые. Основные участки кинетических кривых (16). Интегральные и дифференциальные кинетические кривые (18). Скорость химической реакции (20). Закон действующих масс (21). Константа скорости химической реакции (22). Порядок химической реакции (23). Обратимые химические реакции (24).	
§ 1.2. Определение константы скорости и порядка реакции	26
Универсальный метод определения порядка и константы скорости химической реакции (30). Определение порядка реакции по начальным скоростям (32). Определение константы скорости реакции первого порядка (34). Время полупревращения (35). Определение константы скорости произвольного порядка (36). Метод Гуттенгейма (37). Определение порядка обратимых реакций (40). Заключение (41).	
§ 1.3. Кинетика сложных реакций	43
Кинетика последовательных реакций (43). Кинетика параллельных реакций (46).	
§ 1.4. Влияние различных факторов на скорость химической реакции	49
Влияние температуры на скорость химических реакций (49). Зависимость константы скорости химической реакции от температуры (51). Теория абсолютных скоростей реакции (52). Определение термодинамических параметров переходного состояния (55). Изокинетические зависимости (58). Влияние pH на скорость химических реакций (60). Определение параметров pH-зависимостей (65).	
§ 1.5. Регистрация, ошибки и первичная обработка данных в кинетическом эксперименте	68
Основные виды ошибок кинетического эксперимента (69). Непрерывные и дискретные кинетические кривые (73). Применение вычислительной техники в кинетическом эксперименте (76).	

§ 1.6. Краткое содержание главы	77
§ 1.7. Логика кинетического исследования	78
Экспериментальное изучение (79). Кинетические модели (кинетические схемы) (80). Дискриминация моделей и сопоставление с экспериментальными данными (82). Определение численных значений параметров кинетической модели (83). Молекулярная модель (83).	
Глава 2. Ферментативный катализ	85
§ 2.1. Кинетические схемы и механизм ферментативной реакции	85
Фермент-субстратный комплекс. Последовательный и параллельный маршрут реакции. Возможно ли различить эти схемы? (86). Насколько схема Михаэлиса единственна? (91). Определение параметров V_m и K_m из экспериментальных данных (92). Метод графов при анализе кинетических схем (93). Определение концентраций активных центров (96). Скоростопределяющие стадии (97).	
§ 2.2. Типичные зависимости начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата	100
Ингибирование и активация избытком субстрата. Кривые с максимумом (101). Разностный метод определения параметров K_m и K_s^i (105). Аллостерические эффекты. Уравнение Хилла. Модель Моно-Уаймена-Шанжэ (108).	
§ 2.3. Многосубстратные реакции	117
Механизм образования тройного комплекса (120). Необратимая стадия между реакциями взаимодействия с субстратами (пинг-понг-механизм) (120). Сравнение механизма образования тройного комплекса и пинг-понг-механизма (121). Основные схемы многосубстратных реакций (123). Заключение (125). Дискриминация механизмов многосубстратных реакций (126).	
§ 2.4. Нестационарная кинетика ферментативных реакций.	
Лабильные промежуточные соединения в механизме катализа. Методы «быстрой» кинетики	138
Ацилферменты в механизме катализа сериновыми протеазами (139). Определение кинетических параметров (147). Структура и реакционная способность ацилферментных производных α -химотрипсина (150). Молекулярная модель катализа α -химотрипсином (158). Предстационарная кинетика многостадийной ферментативной реакции (159). Экспериментальные методы исследования нестационарной кинетики (162). Нестационарная кинетика ферментативных реакций при переменной концентрации субстрата. Кинетические закономерности реакции с участием одного промежуточного соединения (165). Каталаза и пероксидаза (170).	
§ 2.5. Релаксационная кинетика ферментативных реакций	172
«Химическая релаксация» при комплексообразовании фермента с субстратом или эффектором (172). Кинетика комплексообразования с одним промежуточным соединением (174). Релаксационная кинетика многостадийной фермент-субстратной реакции (177). Экспериментальные методы исследования релаксационной кинетики (178). Аспаратаминотрансфераза, рибонуклеаза (181).	

§ 2.6. Влияние температуры и pH на скорость ферментативных реакций

185

Влияние температуры на скорость ферментативных реакций (186). Зависимость кинетических и равновесных параметров ферментативных реакций от температуры (186). Изучение термодинамики конформационных изменений активных центров ферментов (189). Влияние pH на скорость ферментативных реакций (191). pH-зависимость двусубстратной ферментативной реакции (192). Определение параметров pH-зависимости ферментативной реакции в случае ионизации субстрата (194).

§ 2.7. Ингибирование ферментативных реакций

197

Необратимое ингибирование (198). Аспирин — медленный необратимый ингибитор (инактиватор) PGH-синтазы (198). Обратимое ингибирование. Индометацин и вольтарен — медленные, обратимые ингибиторы PGH-синтазы (200). Обратимое ингибирование односубстратных реакций (203). Бруфен, напроксен, бутадиион, анальгин — быстрые, обратимые ингибиторы PGH-синтазы (205). Обратимое ингибирование многосубстратных ферментативных реакций (208). Нестероидные противовоспалительные препараты — конкурентные вытеснители арахидоновой кислоты из активного центра PGH-синтазы (212). Классификация нестероидных противовоспалительных соединений — ингибиторов PGH-синтазы (213). Двухкомпонентное ингибирование. Взаимозависимые и взаимонезависимые ингибиторы (215). Двухкомпонентное ингибирование для случая одновременного влияния обратимого и необратимого ингибитора (221). Двухкомпонентное ингибирование — инаktivация в открытой системе, в режиме «расхода» ингибитора и инаktivатора (224).

§ 2.8. Инаktivация ферментов

230

Схемы инаktivации, описываемые экспоненциальной функцией (230). pH-зависимость инаktivации (234). Схемы инаktivации, описываемые суммой двух экспонент (237). Диссоциативный механизм инаktivации ферментов (241). Инаktivация фермента в процессе реакции. Кинетическое описание и дискриминация механизмов (244). Мономолекулярная инаktivация свободной формы фермента (246). Мономолекулярная инаktivация фермента, протекающая через фермент-субстратный комплекс (251). Бимолекулярная инаktivация при взаимодействии фермента с субстратом (256). Бимолекулярная инаktivация при взаимодействии фермента с продуктом реакции (257). Дискриминация механизмов инаktivации и определение кинетических характеристик реакции (259). Кинетика и механизм инаktivации эндопероксидпроstagландинсинтазы — лимитирующего фермента синтеза простагландинов (265). Регуляторная роль инаktivации фермента в процессе реакции (269). Инаktivация ферментных систем (272).

§ 2.9. Полиферментные системы.

Сопряженные ферментные реакции

280

§ 2.10. Кинетика действия ферментов в открытых системах

289

Основные принципы описания кинетики каталитических реакций в открытых по субстрату системах (291). Реактор идеального вытеснения (294). Проточный реактор с перемешиванием (298). Кинетические закономерности в нестационарных режимах. Импульсное введение субстрата (300). Кинетические закономерности при непрерывной подаче субстрата (303). Ста-

ционарная кинетика (306). Осложняющие эффекты (307). Сравнение эффективности действия проточных реакторов (308). Регуляция полиферментных открытых систем (311). Конкурентный и неконкурентный ингибиторы (313). Ингибирование продуктом (системы с отрицательной обратной связью) (317). Кинетические закономерности регуляции фермента в открытой системе с субстратзависимой инактивацией в процессе реакции (317). Системы с субстратнезависимым линейным оттоком фермента (325). Системы с субстратзависимым оттоком фермента (субстратиндуцируемая инактивация фермента в процессе реакции) (327).

§ 2.11. Краткое содержание главы 331

Глава 3. Молекулярная рецепция 335

§ 3.1. Основные понятия 335

История развития представлений о механизмах действия лекарственных веществ (335). Современные представления о механизме лиганд-рецепторного взаимодействия (338). Химическое строение рецепторов и лигандов (340). Агонисты и антагонисты (341). Принцип структурной комплиментарности (341). Механизм лиганд-рецепторного взаимодействия (342). Определение кинетических параметров связывания лигандов с рецепторами (345). Кинетика диссоциации лиганд-рецепторных комплексов (348). Определение концентрации рецепторов и их аффинности (351).

§ 3.2. Молекулярные механизмы проведения и усиления рецепторного сигнала 354

Основные теории рецепции (354). Вторичные мессенджеры (356). Классификация рецепторов по их сопряжению со вторичными мессенджерами (357). Строение и функционирование G-белок сопряженных рецепторов (358). Механизмы проведения и усиления рецепторного сигнала (363). Инактивация рецепторного сигнала (365). Основные свойства рецепторных систем проведения и усиления сигнала (368).

§ 3.3. Дискриминация моделей и определение параметров рецепторного связывания 370

Взаимодействие соизмеримых концентраций лиганда и рецептора (372). Концентрация лиганда много меньше концентрации рецепторов (375). Изменение суммарной концентрации лиганда или рецептора (376). Дискриминация процессов изменения концентрации лиганда и рецептора (381). Диффузия лиганда (384). Кинетика ассоциации лиганда с рецептором при наличии нескольких типов связывающих мест (385). Связывание нескольких молекул лиганда с одной молекулой рецептора. Кооперативное лиганд-рецепторное взаимодействие (390). Дискриминация моделей рецепторного связывания (394). Метод преобразования координат Хилла (395). Метод преобразования координат Бьеррума (396). Заключение (399).

§ 3.4. Взаимодействие нескольких лигандов с одним центром связывания 404

Неконкурентное связывание лигандов (406). Метод двойных обратных координат (407). Бесконкурентное связывание лигандов (409). Антагонизм (410). Конкурентное связывание лигандов (411). Конкурентное связывание лигандов. Кинетика процесса образования (413). Время установления равновесия в системе в случае конкуренции двух лигандов за один тип рецепто-

ров (419). Равновесное связывание в случае конкуренции двух лигандов за один тип рецепторов (419). Определение кинетических констант конкурентными методами (423). Определение равновесных констант конкурентными методами (424). Конкурентные методы анализа (429). Чувствительность конкурентных методов анализа (431). Специфичность и кросс-реактивность при конкурентном анализе (434).

§ 3.5. Влияние различных факторов на связывание лигандов с рецепторами

437

Влияние ионов металлов на рецепторное связывание (438). Влияние ионов щелочно-земельных и переходных металлов на рецепцию [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина (439). Определение механизма влияния ионов металлов на процессы комплексообразования [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с рецепторами (442). Влияние pH на параметры рецепторного связывания (445). Механизм влияния ионов металлов на процесс комплексообразования [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с μ -опиоидными рецепторами (446). Механизм влияния ионов металлов на процесс взаимодействия [D-Ala-2, D-Leu-5]-энкефалина с δ -опиоидными рецепторами (449). Ионы цинка как ингибиторы связывания [D-Ala-2,D-Leu-5]-энкефалина с δ -опиоидными рецепторами (452). Механизм регуляции двух- и трехвалентными ионами металлов связывания морфина с опиоидными рецепторами (453). О природе катионсвязывающих групп опиоидных рецепторов (455). Влияние температуры на лиганд-рецепторное взаимодействие (458). Зависимость свойств рецепторов от температуры (459).

§ 3.6. Радиорецепторный метод

460

История развития радиорецепторного метода (461). Основные преимущества и недостатки радиорецепторного метода (462). Принцип радиорецепторного метода (463). Схема радиорецепторного метода (464). Закономерности влияния неспецифического связывания на специфическое (465). Некоторые предварительные замечания (466). Радиорецепторный метод. Количественный анализ (467). Чувствительность радиорецепторного анализа (468). Радиорецепторный метод. Качественный анализ (472). Использование лиофилизированных мембран в радиорецепторном анализе опиоидных пептидов (472). Радиорецепторный метод. Практические вопросы и ответы (473).

§ 3.7. Применение метода имитационного моделирования для определения концентрации рецепторов и их аффинности

476

Взаимодействие одного лиганда с N местами связывания (476). Метод имитационного моделирования (477).

§ 3.8. Краткое содержание главы

480

Критерии выбора модели лиганд-рецепторного взаимодействия (481). Основные методы преобразования координат (482).

§ 3.9. Вероятностное описание системы «лиганд-рецептор»

486

Вероятностное описание кинетики диссоциации лиганд-рецепторных комплексов (486). Кинетика ассоциации (488).

§ 3.10. Феномен колебаний рецепторного связывания

491

Модель вынужденных колебаний рецепторного связывания (492).

Глава 4. Введение в фармакокинетику	497
§ 4.1. Математические модели фармакокинетики	497
Фармакокинетика (497). История фармакокинетики (498). Основные понятия фармакокинетики (498). Однокамерные фармакокинетические модели (502). Время полувыведения лекарственного вещества (504). Однокамерные фармакокинетические модели с всасыванием (505). Двухкамерные фармакокинетические модели (507). Двухкамерные фармакокинетические модели с всасыванием (513). Нелинейные фармакокинетические модели (515). Перфузионные фармакокинетические модели (517).	
§ 4.2. Фармакокинетическая оптимизация лечения	519
Основные задачи фармакокинетической оптимизации лечения (519). Определение индивидуальных фармакокинетических параметров (521). Фармакокинетическая оптимизация лечения (522).	
§ 4.3. Краткое содержание главы	525
§ 4.4. Фармакокинетика морфина и нейропептидов энкефалинового ряда в организме животных и человека	527
Фармакокинетика морфина в плазме крови собак (527). Фармакокинетика Tug-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg в плазме крови собаки и человека (530).	
§ 4.5. Кинетический анализ аналгетического эффекта опиатов	535
Закономерности формирования аналгетического эффекта при введении опиатов (535). Влияние ионов металлов на аналгетический эффект морфина (537).	
Глава 5. Клеточный рост	541
§ 5.1. Кинетические особенности роста клеточной культуры	541
История изучения процессов роста клеточных популяций (541). Клеточный цикл (542). Типичная кривая роста клеточной культуры (543).	
§ 5.2. Экспоненциальная фаза роста клеточных культур	546
Определение параметров роста клеточной культуры (546). Многосубстратные процессы (548). Ингибирование и активация клеточного роста (552). Влияние pH на кинетику клеточного роста (555).	
§ 5.3. Интегральная форма уравнения роста клеточной популяции	557
Замедление скорости роста клеточной культуры при большой плотности популяции (557). Интегральная форма уравнения роста клеточной культуры в условиях лимитирования по субстрату (558). Приближенный анализ интегральной кривой роста клеточной популяции (561). Разностный метод анализа полных кинетических кривых роста клеточных популяций (565).	
§ 5.4. Ингибирование роста популяции избытком субстрата и продуктами ферментации	568
Ингибирование избытком субстрата (568). Кинетические модели роста с ингибированием субстратом (569). Определение параметров роста клеточной популяции при субстратном ингибировании (573). Анализ полной кинетической кривой роста клеточной популяции при субстратном ингиби-	

ровании (575). Ингибирование роста клеточных популяций продуктами ферментации (575). Простейшая кинетическая схема ингибирования роста клеточных популяций продуктами их жизнедеятельности (575). Определение механизма ингибирования из вида кинетической кривой роста клеточной популяции (584).

§ 5.5. Периоды индукции на кинетических кривых роста 589

Трансформация пресубстрата в субстрат (590). Адаптационный процесс (591). Расходуемый ингибитор роста (592). Дискриминация механизмов и определение кинетических параметров (594).

§ 5.6. Остановка роста, апоптоз и гибель клеток 598

История изучения процессов клеточной гибели (599). Ограничения роста соматических клеток в культуре. Апоптоз, теломеры и теломераза (600). Зависимость скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата и параметров клеточного цикла. Старение клетки в процессе роста (600). Многостадийность клеточного цикла (603). Старение клетки в процессе роста (605). Кинетические модели апоптоза (611).

§ 5.7. Культивирование генно-инженерных штаммов микроорганизмов. Кинетика репликации плазмид 621

Переходные процессы при периодическом культивировании (621). Потеря плазмид в процессе роста клеточной популяции (630).

§ 5.8. Культивирование клеток в режиме хемостата 635

Неосложненный рост (636). Определение параметров роста культуры из данных по стационарным состояниям компонентов процесса (640). Ингибирование субстратом (642). Ингибирование продуктом (644). Ингибирование ионами водорода (647).

§ 5.9. Компьютерное моделирование кинетики роста клеточных популяций. Уравнения роста в безразмерных переменных 649

Численное интегрирование уравнения скорости роста клеточной популяции (651). Уравнение скорости роста в безразмерных переменных (652). Метод двойного зеркального отражения (654). Ингибирование субстратом (655). Ингибирование продуктом (656). Рост культуры при наличии процесса лизиса клеток (657).

§ 5.10. Популяции, взаимодействующие по принципу хищник-жертва. Модель Лотки-Вольтерры 659

Численное решение системы уравнений (662). Периодические колебания численности хищника и жертвы в рамках модели Лотки-Вольтерры (662). Средняя численность популяций (663).

§ 5.11. Компьютерные модели кинетики роста клеточных популяций. Ассоциации микроорганизмов 665

Ассоциации двух микроорганизмов (665). Ассоциации трех микроорганизмов (669). Симбиотрофная метангенерирующая ассоциация (672).

§ 5.12. Общие законы развития популяций 678

§ 5.13. Краткое содержание главы 684

Глава 6. Некоторые математические методы биокинетики	688
§ 6.1. Элементы математической статистики	688
Введение в биометрию (688). Введение в теорию погрешностей (690). Нормальный закон распределения (691). Выявление выбросов (693). Специальные методы математической статистики (693).	
§ 6.2. Графический метод определения числа экспонент и их параметров	695
§ 6.3. Использование метода Прони для определения числа экспонент и их параметров	699
§ 6.4. Решение дифференциальных уравнений методом неопределенных коэффициентов	701
§ 6.5. Применение преобразований Лапласа для решения линейных дифференциальных уравнений	704
§ 6.6. Теорема Тихонова	707

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Издательско-торговый дом «ГРАНД»,

Издательство «ФАИР»

приглашают к сотрудничеству

авторов,

профессиональных переводчиков книг

и книготорговые организации

тел. / факс:

(095) 170 - 93 - 67

(095) 170 - 96 - 45

Почтовый адрес:

109428, Москва, ул. Зарайская, д. 47, к. 2

e-mail: *grandpub@dol.ru*

web: *http://www.grandpub.ru*

**Варфоломеев Сергей Дмитриевич,
Гуревич Константин Георгиевич**

БИОКИНЕТИКА

Практический курс

Обложка А. В. Матросова

Оригинал-макет подготовлен при участии
издательства «Аспект-Пресс»

ЛР 065864 от 30 апреля 1998 г.

Подписано в печать 20.11.98.

Формат 60 × 90¹/₁₆. Бумага офсетная.

Гарнитура «Таймс». Печать офсетная.

Усл. печ. л. 45. Тираж 5000 экз.

Заказ 1411.

Издательство «ФАИР-ПРЕСС»

109462, Москва, Волжский 6-р, квартал 113а, корп. 7

Для писем: 109428, Москва, ул. Зарайская, д. 47, к. 2

Отпечатано в полном соответствии

с качеством предоставленных диапозитивов

в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».

143200, г. Можайск, ул. Мира, 93