

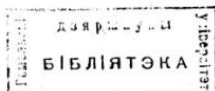
МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ БССР

ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра физиологии человека и животных

О.С.Арутюнова

ТЕКСТЫ ЛЕКЦИЙ
по курсу "Биофизика"
Основы биологической кинетики
Часть I



Гомель 1985

Рецензенты: С.М.Керимова, кандидат биологических наук
Азербайджанского государственного медицин-
ского института им. Н.Нариманова,
И.А.Розенталь, заведующий отделением Гомель-
ской областной больницы Министерства здраво-
охранения БССР

Тексты лекций по биофизике составлены в соответствии с учебной программой. В них изложены вопросы кинетики биологических процессов: классификация химических и ферментативных реакций, кинетические модели простых типов реакций, факторы, влияющие на кинетику реакций; вводится уравнение Михаэлиса-Ментен.

Предназначены для студентов-биологов

А 21005 - 022
И 339 - 85 7 - 85 2001040000

© Гомельский государственный университет (ГГУ), 1985

КИНЕТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Живая клетка, это система, где происходят самые разнообразные реакции. В отличие от неживых систем химические реакции в клетке протекают упорядоченно - в соответствующем месте и в соответствующее время. Например, накопление нуклеиновых кислот происходит в определенных частях клетки в течение определенных фаз роста. Процессы окислительного характера локализованы преимущественно в митохондриях.

Однако реакции, происходящие в клетке, не только упорядочены, они должны происходить достаточно быстро, так как в противном случае рост клетки был бы невозможен из-за тепловой деградации.

Таким образом, в живых системах скорость протекания процессов имеет решающее значение для определения биоэнергетического состояния.

Кинетика изучает закономерности протекания во времени и механизмы химических процессов.

Организм - это открытая система, которая обменивается с окружающей средой и веществом и энергией. Процессы обмена веществ в организме образуют сложную систему сопряженных реакций - последовательных, параллельных, замкнутых в циклы.

Биологические процессы в организме идут по пути с наименьшим расходом свободной энергии. В живом организме скорость протекания реакций зависит главным образом от следующих условий: от наличия катализаторов (ферментов), от ингибиторов и от структурных условий развития реакции.

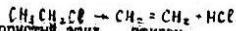
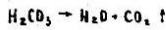
ТИПЫ РЕАКЦИЙ

Химические реакции, происходящие в биологических системах, разделяют по молекулярности, общему (суммарному) порядку. Молекулярность реакции определяется числом частиц, принимающих участие в химических превращениях.

Реакции, в элементарном акте которых участвуют одна, две или три частицы, называются мономолекулярными, бимолекулярными, тримолекулярными.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

К числу мономолекулярных реакций относятся реакции внутримолекулярной перегруппировки - превращение цис - изомера в транс - изомер, или реакции распада:



К числу бимолекулярных реакций можно отнести гидролиз сложного эфира: $CH_3COOCH_3 + OH^- \rightarrow CH_3COO^- + CH_3OH$

К числу тримолекулярных реакций можно отнести реакцию окисления окиси азота до двуокиси: $2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$

Вероятность одновременного столкновения более, чем трех частиц чрезвычайно мала, поэтому реакции, в которых участвует более трех частиц протекают, как правило, не в один акт, а в несколько элементарных стадий - моно-, би-, тримолекулярных.

В живых организмах наиболее распространенными являются моно- и бимолекулярные реакции.

Важнейшей количественной характеристикой химической реакции является скорость.

Скорость химического процесса определяется как возрастание или уменьшение концентрации данного вещества во времени.

Химические реакции происходят при столкновении молекул. Число столкновений при заданных внешних условиях (температура, давление, среда) является функцией концентрации реагирующих веществ. В результате реакции часть молекул исходных веществ расходуется на образование продуктов реакции, концентрация исходных веществ при этом убывает и скорость реакции падает, вот почему моно-, би-, тримолекулярные химические реакции идут с непрерывно убывающей скоростью.

В мономолекулярной реакции типа $A \rightarrow P_1$ скорость накопления продукта P_1 выражается уравнением (1)

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_1 [A] \quad (1)$$

$$[A] = [A_0] e^{-k_1 t} \quad (2)$$

Отсюда

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_1 [A_0] e^{-k_1 t} \quad (3)$$

где $\frac{d[P_1]}{dt}$ - скорость реакции, то есть, изменение концентрации продукта во времени;

$[A_0]$ - начальная концентрация исходного вещества;

$[A]$ - концентрация исходного вещества в момент времени t ;

k_1 - константа скорости реакции (истинное число молекул, реагирующих в единицу времени при концентрации равной 1 моль/л.).

Если скорость реакции зависит от концентрации одного исходного вещества, то реакция называется реакцией первого порядка.

Для бимолекулярной реакции $A + B \rightarrow P_2$: $\frac{d[P_2]}{dt} = k_2 [A] [B]$, (4)

где $[A]$ и $[B]$ - концентрации реагирующих веществ. В этом случае скорость реакции определяется произведением концентрации двух веществ, и такая реакция называется реакцией второго порядка.

К реакциям первого порядка относятся не только мономолекулярные реакции, но также и те, которые протекают в условиях избытка одного из реагирующих веществ, когда его концентрация не лимитирует скорость реакции. Например, скорость реакции гидролитического расщепления сложной молекулы в водной среде, не зависит от концентрации воды, которая всегда присутствует в избытке.

Скорость многих реакций в организме не зависит от концентрации реагирующих веществ и постоянна:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_0 \quad (5)$$

Такие реакции называются реакциями нулевого порядка (ферментативные реакции, идущие в условиях избытка субстрата). Тогда скорость не зависит от концентрации реагирующих веществ, а определяется концентрацией свободных молекул фермента.

Таким образом, порядок реакции характеризует формально-кинетическую зависимость скорости реакции от концентрации реагирующих веществ, а молекулярность — элементарный механизм отдельных стадий более сложного процесса, порядок и молекулярность совпадают только для простых по механизму реакций.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Возможность осуществления жизненных процессов ограничена температурным интервалом от 0 до +70° С (на Земле).

При рассмотрении зависимости скорости биологических реакций от температуры можно установить три температурные точки. Скорость биологических процессов увеличивается с возрастанием температуры до определенного уровня (разного для разных организмов). Это температурный оптимум. Дальнейшее повышение температуры сопровождается замедлением реакции, что объясняется, по-видимому, денатурацией белка и разрушением липидов. Это температурный максимум. Понижение температуры приводит к замедлению или полному прекращению всех процессов — температурный минимум. Установление стационарного состояния возможно только в условиях температурного оптимума.

При повышении температуры скорость химических процессов увеличивается. Зависимость скорости реакции от температуры описывается уравнением Аррениуса

$$k = p \chi e^{-\frac{E_{акт}}{RT}}, \quad (6)$$

где p — стерический фактор,

χ — число столкновений,

e — основание натурального логарифма,

$E_{акт}$ — энергия активации,

R — универсальная газовая постоянная.

Вант-Гофф выразил зависимость скорости реакции от температуры в виде правила: при повышении температуры на 10 градусов скорость химической реакции возрастает в 2-3 раза.

$$Q_{10} = \frac{V_T - 10}{V_T} \quad (7)$$

6

Q_{10} — температурный коэффициент Вант-Гоффа.

Было установлено, что низкие значения коэффициента (1,1-1,3) характерны для физических процессов (например, для процессов диффузии). Более высокие коэффициенты, равные или больше 3, считаются показателем наличия химических реакций.

Для ферментативных процессов Q_{10} имеет величину около 1,7.

По величине Q_{10} биологического процесса можно судить о природе протекающих реакций, а также о разделении процесса на стадии и о механизме этих стадий. Установлено, что процесс возбуждения в нерве имеет $Q_{10} = 1,7$, что характерно для ферментативных реакций. Для проведения же возбуждения от концевых пластинок нерва к мышце получен $Q_{10} = 2,5 - 2,7$, характерный для химических процессов.

Зная Q_{10} , можно определить энергию активации реакции:

$$E_{акт} = 0,46 T_1 T_2 \rho_1 Q_{10} \quad (8)$$

Энергии активации большинства биологических процессов того же порядка, что для химических реакций (33,50,75 кДж/моль)

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Итак, скорость химических реакций зависит от концентрации. Кроме того, повышая температуру, мы также увеличиваем скорость реакции.

Сначала сделали вывод о том, что с увеличением температуры увеличивается количество соударений, приводящих к появлению молекул нового вида.

Однако подсчет показал, что если бы каждое соударение приводило к реакции, то скорости реакций должны были бы в $10^2 - 10^5$ раз превышать реально существующие скорости. Поэтому предположили, что для внедрения электронных орбит одной молекулы в электронные орбиты другой молекулы и обобществления электронов, молекулы должны обладать определенной энергией, не ниже некоторого уровня E . Величина $E_{акт}$

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИХ

называется энергией активации.

Молекулы обладают потенциальной и кинетической энергией. Потенциальная энергия представляет собой энергию движущихся по орбитам электронов. Эту энергию можно считать электронной или химической, поскольку она выделяется при химических реакциях. Помимо этого молекулы обладают кинетической энергией теплового хаотического движения, складывающейся из энергии поступательного, колебательного и вращательного движений.

Самопроизвольная химическая реакция связана с понижением уровня потенциальной энергии реагирующих молекул. Если по оси абсцисс отложить время, которое будет характеризовать фазы каждого элементарного акта реакции или расстояние между реагирующими молекулами - координату реакции, а по оси ординат - потенциальную энергию молекул, то уровень E_2 будет соответствовать энергии исходных продуктов реакции, а более низкий уровень E_1 - энергии конечных продуктов (рис.1). В процессе акта реакции электроны реагирующих частиц переходят на более низкий энергетический уровень, в результате чего потенциальная энергия частиц понижается. Однако при сближении реагирующих частиц их потенциальная энергия уменьшается не сразу.

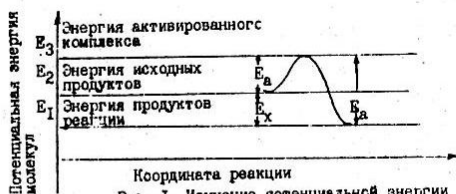


Рис. 1. Изучение потенциальной энергии молекул в процессе химической реакции.

8

E_a - энергия активации прямой реакции;
 E_a' - энергия активации обратной реакции;
 E_x - энергия, выделяющаяся (поглощаемая) при реакции.

Для того чтобы произошла реакция, чтобы произошло образование общих электронных пар реагирующих частиц, их потенциальная энергия должна вначале возрасти, то есть реагирующие частицы должны получить энергию. Это связано с тем, что при сближении частиц их одновременно заряженные электронные оболочки испытывают отталкивание. Энергия, необходимая для преодоления сил отталкивания электронных оболочек при сближении реагирующих частиц, и будет энергией активации. Энергия активации представляет энергетический барьер для частиц, вступающих в реакцию. Обычно активация молекул происходит за счет кинетической энергии их поступательного, колебательного и вращательного движения, но может быть вызвана и поглощением квантов лучистой энергии, что бывает при фотохимических реакциях.

Таким образом, чтобы молекулы могли вступить в реакцию, они должны обладать определенным запасом кинетической энергии. Химическая реакция происходит только в том случае, если молекулы за счет своей кинетической энергии сумеют преодолеть энергетический барьер отталкивания электронных оболочек. Не всякое столкновение реагирующих частиц приводит к химической реакции, а лишь столкновение частиц, обладающих кинетической энергией, которая не меньше энергии активации. Большинство молекул имеет кинетическую энергию, близкую к соответствующей средней энергии системы, но всегда существует какое-то количество молекул, энергия которых значительно превышает среднюю (рис.2)

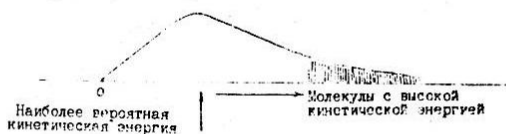


Рис. 2. Распределение молекул по энергии

9

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИИ

Время от времени происходит столкновение двух атомов или молекул, обладавших достаточно высокой энергией, и образуется молекула нового вещества. Таким образом, скорость реакции зависит от концентрации активных молекул. Число активных молекул мало по сравнению с неактивными. Аррениус выразил эту зависимость формулой

$$N_A = N_0 \cdot e^{-\frac{E_{акт}}{RT}}, \quad (9)$$

где N_A — число активных молекул;
 N_0 — общее число молекул;
 e — основание натурального логарифма;
 $E_{акт}$ — энергия активации (к Дж/моль).

При постоянной температуре число активных молекул сохраняется постоянным.

Активные молекулы, с точки зрения кинетической теории, — это быстрые молекулы, обладавшие повышенной энергией движения.

Однако активация сводится не только к повышению скорости движения. Активными молекулами могут быть возбужденные молекулы с электронами, перескочившими на более удаленную орбиту, и, наконец, химически измененные молекулы. Все это в зависимости от природы вещества может быть вызвано температурной активацией, которая наряду с увеличением числа быстро двигающихся молекул может вызвать деформацию их, понижение молекулярной устойчивости и т.д.

Как показали исследования, не все столкновения даже активных молекул приводят к реакции. Это связано с геометрической конфигурацией молекул. Реакция осуществляется лишь в том случае, когда молекулы сталкиваются своими активными центрами, участками, в которых может произойти разрыв старых и образование новых химических связей. Эти участки занимают небольшую часть общей поверхности молекулы, и чем больше размер молекулы, тем меньшая доля всей поверхности будет приходиться на площадь активных центров. Для характеристики эффективности столкновений молекул вводят понятие стерического фактора. Стерический фактор (P) представляет собой

10

вероятность столкновения молекул активными центрами. Для крупных молекул (белка, например) P имеет небольшое значение до 10^{-5} .

ВЛИЯНИЕ КАТАЛИЗАТОРОВ НА СКОРОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Одним из способов повышения вероятности эффективного столкновения могло бы быть помещение компонентов реакции в оптимальные условия, например, в какие-то особые части раствора, или полости особой формы, в которых молекулы обоих реагентов сближались бы друг с другом и при этом достигалось бы уменьшение кинетической энергии, необходимой для эффективного столкновения. Именно такой способ распространен в биологических системах. Полости такой специальной формы были обнаружены в особях белках — ферментах. Большинство биохимических реакций между небольшими молекулами происходит в присутствии ферментов, выступающих в роли катализаторов этих реакций. Каждой реакции соответствует свой фермент, в отсутствие которого реакция не может произойти (по крайней мере, в течение разумного отрезка времени).

Наличие энергии активации и ферментов имеет решающее значение для поддержания жизни: если бы не было энергии активации, все химические реакции немедленно пришли бы в равновесие; при этом живые существа самопроизвольно деградировали бы с переходом в наиболее вероятное, т.е. максимально неупорядоченное состояние с наибольшей энтропией. Ферменты необходимы для регулирования как скорости реакций, так и для последовательности их осуществления.

В живых системах благодаря наличию ферментов-катализаторов могут протекать такие реакции, которые вне живых систем требуют несовместимых с жизнью условий активации. Например, энергия окисления углерода — 4472 ккал — очень высока и происходит при $T = 1173^\circ\text{K}$ ($t = 900^\circ\text{C}$).

Под влиянием биологических катализаторов химические процессы в организме проходят через ряд промежуточных

11

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

этапов, каждый из которых протекает со сравнительно малым перепадом ΔE . Дробление процесса приводит к уменьшению энергии активации его отдельных стадий, химические реакции ускоряются.

Действие ферментов выражается не только в снижении энергии активации. Предполагают, что при взаимодействии субстрата с ферментом образуется так называемый активированный комплекс, который благодаря пространственным перестройкам обладает максимальной потенциальной энергией, что обеспечивает протекание реакции.

Большинство ферментативных реакций представляет собой многоступенчатый процесс. Здесь суммарный ферментативный процесс разбивается на ряд составляющих его стадий, каждая из которых характеризуется относительно небольшой энергией активации, поэтому многоступенчатый катализ обладает существенными преимуществами по сравнению с одноступенчатой.

$E_{акт.}$ увеличивает количество активированных молекул, что приводит к ускорению реакции.



Реакция разложения перекиси водорода на воду и кислород при отсутствии катализатора имеет энергию активации 75 кДж/моль. При действии фермента каталазы энергия активации снижается до 23 кДж/моль. Под влиянием ферментов энергия



Рис. 3 Энергия активации неферментативной (А) ферментативной одноступенчатой (В) и ферментативной многоступенчатой (В') реакций.

12

E_a - энергия активации

E_k - энергия, выделяющаяся при реакции.

активации реакций снижается значительно больше, чем при действии неорганических катализаторов. Например, энергия активации гидролиза сахарозы при действии кислот равна 107 кДж/моль при действии амидазы - 46 кДж/моль.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Ферментативная кинетика занимается изучением закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ и условий их взаимодействия на скорость ферментативных реакций.

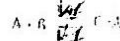
Важным фактором, определяющим скорость ферментативной реакции, является температура. Скорость ферментативной реакции увеличивается с повышением температуры. Однако это повышение происходит лишь до определенного предела, когда начинается разрушение белка, его денатурация.

Поскольку многие ферменты содержат коферменты и металлы, скорость ферментативных реакций зависит от концентрации этих кофакторов.

Наконец, скорость ферментативной реакции зависит от присутствия в данной клетке или растворе различных активаторов или ингибиторов ферментов.

Ферментативные реакции подчиняются закону, согласно которому реакция идет тем быстрее, чем больше концентрация реагирующих веществ.

Предположим, мы имеем реакцию



$v_A = v_B = v_C = v_D$ - скорости прямой и обратной реакции

$$v_A = k_1[A][B] \quad v_B = k_2[C][D]$$

Скорость v_A пропорциональна произведению концентраций веществ А и В, а скорость v_B пропорциональна произведению концентраций веществ С и D.

$k_1 = k_2$ - константы скоростей данных реакций. Эти константы характеризуют химическую природу реагирующих веществ, их способность вступать в данную реакцию. Константы

13

скорости реакции равна скорости реакции при концентрациях реагирующих веществ, равная единице. Если имеет место химическое равновесие, то при этом скорости прямой и обратной реакции равны, и $V_{пр} = V_{обр}$ будет равняться $V_{рав}$ ($V_{пр} = V_{обр}$)

Иначе $K_{рав} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$

Это выражение можно преобразовать так:

$$\frac{K_{пр}}{K_{обр}} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Выражение $\frac{[C][D]}{[A][B]}$ равно $K_{рав}$,

то есть константе равновесия данной реакции (от латинского *equilibrium* - равновесие).

Таким образом, константа равновесия реакции равна произведению концентраций образующихся веществ, деленному на произведение концентраций исходных веществ в состоянии равновесия.

Иначе говоря, $\frac{K_{пр}}{K_{обр}} = K_{рав}$

Среди химических процессов, катализируемых ферментами, основное значение имеют три типа реакций: реакции нулевого порядка, реакции первого порядка и реакции второго порядка.

При реакции нулевого порядка скорость реакции постоянна, если мы обозначим через x концентрацию продукта, образующегося в результате реакции, а через t - время, то можем написать следующее уравнение:

$$K_0 = \frac{dx}{dt} = \frac{A_0 - x}{A_0}$$

Этим уравнением выражается константа скорости реакции нулевого порядка.



Реакция нулевого порядка.

Ферментативные реакции первого порядка характеризуются тем, что скорость реакции в каждый данный момент времени пропорциональна имеющейся в наличии концентрации субстрата, то есть $\frac{dx}{dt} = k[A]$,

где A - начальная концентрация субстрата;

x - концентрация превращенной части субстрата.

Таким образом, $(A - x)$ - это концентрация исходного

вещества в каждый данный момент по мере протекания реакции. Кривая показывает, что в первый промежуток времени, когда



Реакция второго порядка

глубина превращения мала, реакция является реакцией нулевого порядка, а затем скорость реакции начинает снижаться и в конце концов кинетическая кривая приближается к линии, параллельной оси абсцисс.

Ферментативные реакции второго порядка характеризуются тем, что их скорость пропорциональна произведению концентраций реагирующих веществ: $V = k[A][B]$

Все ферментативные реакции в самом начале своего протекания (когда присутствует избыток субстрата и образовалось мало продуктов реакции) являются реакциями нулевого порядка, и только потом они приобретают характер реакций первого или второго порядка. Именно поэтому для определения удельной активности того или иного ферментного препарата используют данные, полученные в начальный период реакции - т.е. первые несколько секунд или минут.

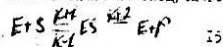
Влияние на скорость ферментативной реакции концентрации фермента и субстрата

При условии избытка субстрата скорость ферментативной реакции зависит прежде всего от концентрации фермента.

Таким образом, мы можем написать, что $V = k[E]$, где $[E]$ - концентрация фермента.

В 1902 году В. Анри при изучении реакции ферментативного гидролиза сахарозы предположил, что β - фруктофуранозиды вступают в соединение со своим субстратом, затем это соединение распадается, фермент остается в первоначальном виде, а субстрат-сахароза оказывается расщепленной на глюкозу и фруктозу. Это предположение об образовании промежуточного соединения фермент-субстрат было в 1913 году развито Л. Михаэлисом и его сотрудницей М. Ментен.

Сми исходя из следующего уравнения:



Подлагая, что комплекс (фермент-субстратный) $[ES]$ может диссоциировать, можем написать, что $K_4 = \frac{[E][S]}{[ES]}$, то есть константа диссоциации этого комплекса равна отношению констант скоростей обратной и прямой реакций.

Если константа диссоциации комплексов фермент-субстрат K_4 велика, то велико значение K_{-1} и мало значение K_{+1} . Отсюда следует, что комплекс очень легко распадается на исходные вещества и реакция идет медленно. Наоборот, если константа K_{+1} велика и K_{-1} мала, то K_4 будет мала и ферментативная реакция будет идти быстро.

Исходя из закона действующих масс, можем написать следующее уравнение: $[S] \cdot ([E_0] - [ES]) = K_4 [ES]$

$[E_0]$ - это общая концентрация фермента в начале данной ферментативной реакции.

$[ES]$ - концентрация фермент-субстратного комплекса. Выражение $[E_0] - [ES]$ - представляет собой концентрацию свободного фермента за вычетом концентрации фермента, связанного с субстратом.

После алгебраического преобразования получаем

$$[ES] = \frac{[E_0] \cdot [S]}{K_4 + [S]}$$

Чем больше выражение $[ES]$, тем больше скорость ферментативной реакции.

Максимальная скорость данной ферментативной реакции достигается тогда, когда концентрация соединения фермент-субстрата равна общей концентрации фермента, то есть $[ES] = [E_0]$. Следовательно, скорость будет максимальной при условии, что весь фермент войдет в соединение с субстратом и будет им полностью насыщен.

Таким образом, можно написать следующую зависимость:

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES]}{[E_0]}$$

Но мы знаем, что

$$\frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{[S]}{K_4 + [S]}$$

и таким образом, получаем

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_4 + [S]}$$

или иначе $v = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_4 + [S]}$

Обычно v_{max} обозначают буквой V . Тогда последнее выражение будет иметь вид

$$v = V \cdot \frac{[S]}{K_4 + [S]}$$

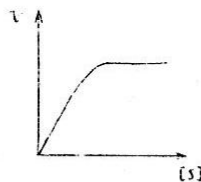
уравнение Михаэлиса-Ментен.

Из этого уравнения следует, что если концентрация субстрата велика, по сравнению с K_4 (например, при гидролизе сахарозы J^+ - фруктофуранозидазой K_4 составляет 0,0167 M), то в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен скорость реакции будет равна максимальной ($v = V$), поскольку добавление очень небольшой величины (K_4) к концентрации субстрата практически не изменит ее значение.

Если концентрация субстрата $[S]$ мала, то добавление ее к константе диссоциации K_4 почти не изменит ее, и мы можем написать следующее уравнение:

$$v = V \cdot \frac{[S]}{K_4}$$

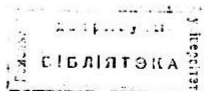
Это уже типичная реакция первого порядка, т.е. в данном случае скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата в каждый данный момент.



Если по оси абсцисс отложена концентрация субстрата, а по оси ординат - величина v , т.е. скорость реакции расщепления сахарозы. Из графика видно, что при низких концентрациях субстрата мы имеем дело с реакцией первого порядка, а при очень высоких его концентрациях - с реакцией нулевого порядка, когда скорость реакции

становится постоянной величиной равной максимальной скорости реакции.

Для большего удобства уравнение Михаэлиса-Ментен было преобразовано Лайнувером и Берком по методу двойных обратных величин, то есть на основании того принципа, что если имеется равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные



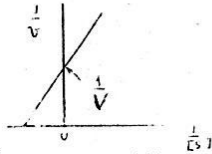
РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

величины также будут равны.

В таком случае уравнение Михаэлиса-Ментен будет выглядеть следующим образом:

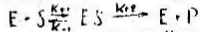
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \frac{K_m + [S]}{[S]} \quad \text{или} \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right)$$

$$\text{или} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$



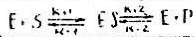
уравнение Михаэлиса-Ментен, преобразованное по методу двойных обратных величин, то есть уравнение Лайнуивера-Берка.

Уравнение Михаэлиса-Ментен правильно только лишь при самых коротких сроках действия фермента, то есть тогда, когда имеется избыток субстрата и образовалось мало продуктов реакции, когда величина P в этом уравнении очень мала:



Имея по такому уравнению Михаэлиса-Ментен носит несколько ограниченный характер, поскольку оно учитывает первый период процесса и не учитывает его второй стадии, то есть влияния образующегося продукта реакции и его взаимодействия с ферментом.

Таким образом, более правильно течение ферментативного процесса можно написать в следующем виде:



Холдейн и Бригге предложили улучшенное выражение уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$v = V \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

K_m — константа Михаэлиса, которая имеет очень большое значение в энзимологии и является важной характеристикой данного фермента. В классическом уравнении Михаэлиса-Ментен фигурирует K_s , то есть константа диссоциации соединения фермент-субстрат.

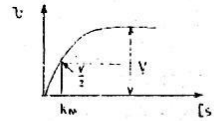
Константа Михаэлиса K_m может быть выражена следующим образом:

$$K_m = \frac{K_1 + K_2}{K_1}, \quad \text{так как } K_s = \frac{K_1}{K_1}, \quad \text{то } K_m = K_s + \frac{K_2}{K_1}$$

K_1 — константа Михаэлиса выражает в молях на литр.

Если $v = \frac{1}{2} V$, то $[S] = K_m$.

Отсюда следует, константа Михаэлиса равна той концентрации субстрата, выраженной в молях на литр, при которой наблюдается скорость реакции, равная половине максимальной.

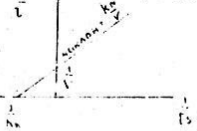


Константа Михаэлиса может быть представлена графически. Пользуясь подобными графиками, можно найти значение K_m для того или иного фермента. Для построения графика мы должны определить скорость реакции v при различных значениях концентрации субстрата.

В конечном итоге мы установим значение максимальной скорости реакции V , когда увеличение концентрации субстрата уже не будет влиять на скорость реакции, а затем найдем K_m . Константу Михаэлиса нужно определять за возможно более короткий первоначальный промежуток времени и пользоваться достаточно очищенным ферментным препаратом, так как содержащиеся в нем примеси могут сильно влиять на величину K_m .

Уравнение Михаэлиса-Ментен, обратное по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка, имеет следующий вид:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$



Наклон полученной прямой равен величине $\frac{K_m}{V}$, а отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, это $\frac{1}{V}$. Если мы продолжим полученную прямую за ось орди-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

нет, то она отсекает от оси абсцисс отрезок, который равен обратной величине константы Михаэлиса.

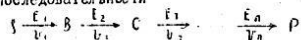
Графический способ нахождения константы Михаэлиса по методу двойных обратных величин широко применяется в настоящее время в энзимологии.

СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

В организме нет ни одного вещества, которое не участвовало бы в общем цикле реакций. Весь цикл представляет собой открытую систему, в которую все время поступает вещества из внешней среды, претерпевает в ней различные химические превращения и затем удаляется в виде конечных продуктов обмена во внешнюю среду. Регуляция биохимических процессов в клетке осуществляется с помощью прямой и обратной связи. Основное назначение механизмов регуляции — поддержание концентрации различных веществ в клетках на уровне, определяемом потребностями клеток. Большинство биохимических реакций катализируется ферментами, поэтому механизмы регуляции скоростей заключаются в изменении активности, а также концентрации ферментов.

Система взаимосвязанных ферментов, катализирующих различные стадии в какой-либо последовательности метаболических реакций называется полиферментной системой.

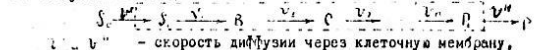
Если в полиферментной системе концентрации всех компонентов (ферментов, субстрата, промежуточных и конечных продуктов) с течением времени остается постоянной, то про такую систему можно сказать, что она находится в стационарном состоянии. Отличие стационарного состояния от состояния равновесия состоит в том, что в первом случае через систему проходит постоянный стационарный поток вещества; такое состояние характеризуется постоянным потоком энергии. В случае простой линейной последовательности



стационарное состояние означает, что $v_1 = v_2 = v_3 = v_n$ и [S], [B], [C], [P] остаются постоянными.

Постоянство концентрации субстрата и конечного продукта может быть обеспечено за счет диффузии S в систему и диффузии P из нее, в таком случае соответствующие скорости диффузии равны скоростям ферментативных реакций.

Поведение этой системы внутри клетки может быть определено следующей схемой:

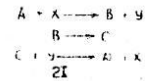


причем $v_1 = v_2 = v_3 = v_4 = v_5 = v_6 = v_7 = v_8 = v_9 = v_{10}$. В такой ситуации имеем дело с открытой системой: вещества входят в эту систему и выходят из нее. В замкнутой системе не происходит обмена с веществами окружающей среды, и в этом случае истинное стационарное состояние невозможно.

В однородной системе ферменты распределены гомогенно, тогда как в неоднородной системе они могут быть агрегированы или локализованы в некоторых участках или структурах. Наконец, если скорость протекающего в системе процесса зависит в первую очередь от скорости одной из реакций, то такая стадия в полиферментной системе называется лимитирующей реакцией.

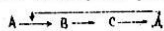
Наиболее важные полиферментные системы можно классифицировать следующим образом:

1. Однолинейные цепи: $A \rightarrow B \rightarrow \dots \rightarrow P$
2. Разветвленные цепи:
 - А. конвергентные $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$
 - Б. дивергентные $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$
3. Полилинейные цепи (шунты) $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$
4. Распределительные системы $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$
5. Циклические системы $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A$
6. Регенеративные цепи (вещество регенерируется в ходе реакции)

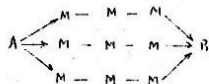


РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

7. Саморегулирующиеся системы (системы с обратной связью, когда D влияет на скорость реакций $A \rightarrow B$).



8. Сетеподобные системы (перенос электронов от A к B через решетку ионов металла):



СВОНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Биологам становится все яснее, что все виды пластического синтеза и энергетического обмена в растительных и животных организмах осуществляются дискретным путем, в котором огромную роль играет одноэлектронная передача энергии и образование высокореакционных парамагнитных частиц с одиночными или неспаренными электронами, — свободных радикалов.

С в о б о д н ы й р а д и к а л — это молекула или ее часть, имеющая неспаренный электрон на молекулярной или внешней атомной орбите.

Неспаренные электроны играют очень важную роль в любой химической или биологической системе благодаря тому, что обычно обладают высокой энергией и, следовательно, активностью.

Между числом неспаренных электронов с некомпенсированными магнитными моментами и понятием "свободная валентность" атома или радикала / т.е. числом присоединяемых им одновалентных атомов, например водорода или фтора, имеется прямое тождество.

Вещества, содержащие неспаренные электроны, можно подразделить на две группы. В веществах, относящихся к первой группе, неспаренные электроны связаны либо со всей молекулой, либо по крайней мере с большей ее частью. Эти неспаренные электроны перемещаются по сильно делокализованным молекулярным орбиталям и обуславливают разнообразную активность атомных

группировок, входящих в состав молекулы. В этом и состоит специфика свонорадикальных реакций. Поэтому изучение этих делокализованных неспаренных электронов исключительно важно для понимания механизмов таких процессов, как радиационное повреждение биологической ткани или образование различных промежуточных молекулярных форм в ферментном или каком-либо другом каталитическом процессе.

Ко второй группе веществ, содержащих неспаренные электроны, относятся те, в которых неспаренный электрон связан только с одним каким-либо атомом, а не перемещается по делокализованной молекулярной орбитали, охватывающей многие атомы. Такие неспаренные электроны обычно связаны с атомами переходной группы — железом, кобальтом или никелем, и их число в атоме, также как и энергия, широко изменяется с изменением валентности того атома, которому они принадлежат.

Хотя большинство веществ, содержащих неспаренные электроны, можно отнести к одной из указанных основных групп, существует много других специфических соединений, которые следует отметить отдельно. Большой интерес представляет неспаренные электроны, связанные с полупроводниковыми механизмами, им уделяется особое внимание, поскольку предполагают, что белки представляют собой системы с энергетическими уровнями, характерными для полупроводников, и высказано предположение, что именно этим определяется лицирированная активность некоторых белков. Неспаренные электроны, участвующие в процессе фотосинтеза, вряд ли связаны со свободными радикалами, но безусловно связаны со всей молекулярной системой в целом.

Различает свободные радикалы, обладающие одним неспаренным электроном — **м о н о р а д и к а л ы**, $\dot{O}H$ / свободный гидроксил/, $\dot{C}H_3$ / свободный метил/. Точкой обычно обозначается обусловленное неспаренным электроном наличие свободной валентности. В некоторых случаях соединение может иметь два неспаренных электрона с параллельными спинами — **б и р а д и к а л**: $\dot{O}-\dot{O}$

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

Свободные радикалы могут быть нейтральными и заряженными, в последнем случае они называются ионо-радикалами. Анион или катион-радикалы образуются в процессах одно-электронного окисления и восстановления.

Наряду с активными в обычных условиях свободными радикалами известны органические радикалы, стабильные при комнатной температуре. Для этих радикалов характерно наличие в их составе ароматических колец: например трифенилметил, который был первым открытым органическим свободным радикалом.



Трифенилметил

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

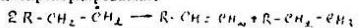
1. Реакции замещения: $\dot{R}_1 + R_2 - R_1 \rightarrow R_1 - R_2 + \dot{R}_2$

2. Реакции присоединения и распада: $\dot{R} + A_1 = A_2 \rightarrow R - A_1 - \dot{A}_2$

3. Реакции изомеризации: $CH_3 - \dot{C}H_2 - \dot{C}H_2 \rightarrow \dot{C}H_3 - \dot{C}H - \dot{C}H_2$

4. Реакции рекомбинации: $\dot{R}_1 + \dot{R}_2 \rightarrow R_1 - R_2$

5. Реакции диспропорционирования:



Частным случаем реакций присоединения являются реакции полимеризации: $\dot{R} + M_1 + A_2 \rightarrow R - A_1 \cdot \dot{A}_2 \cdot A_3 \cdot A_4 \rightarrow R - A_1 - A_2 - A_3 - A_4 \dots$

Роль радикалов как промежуточных частиц особенно велика в радикальных цепных неразветвленных реакциях / процессы полимеризации / и разветвленных реакциях / процессы окисления /, в гетерогенном катализе, реакциях горения и взрыва, в важнейших

промышленных процессах пиролиза и крекинга.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Обнаружение и регистрация свободных радикалов осуществляются химическими и физическими методами исследования.

Благодаря работам советского ученого, академика Н.Н.Семенова, создавшего в конце 20-х годов теории цепных реакций, стала понятна роль свободных радикалов в цепных процессах. В 1956 году акад. Н.Н.Семенов стал лауреатом Нобелевской премии по химии за изучение механизмов цепных реакций.

В основе стандартных химических методов обнаружения свободных радикалов лежат чрезвычайно высокие химические реакционная способность и идентификация конечных продуктов, образующихся в результате реакций радикалов.

Популярен предложенный метод "зеркал" для изучения радикалов в газовой фазе. Этот метод основан на применении металлических зеркал, нанесенных на внутреннюю поверхность стеклянной трубки. Свободные радикалы реагируют с металлической пленкой, давая таким образом прямое доказательство своего присутствия. Природа радикалов устанавливается с помощью анализа образующихся конечных продуктов. Для определения радикалов в конденсированной фазе используются другие методы регистрации радикалов, например исследование цепных реакций полимеризации, протекающих в присутствии свободных радикалов, образующихся из катализаторов.

В основе физического метода лежит обнаружение магнитного момента неспаренных электронов, то есть прямое измерение магнитной восприимчивости образца. Для обнаружения свободных радикалов используют и ряд других физических методов / метод Флэш-фотолиза, масс-спектрометрические исследования, методы абсорбционной спектроскопии в УФ, оптической или ИК областях и др. /

В 1944 году советским ученым Е.К.Завойским был предложен метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

А. МЕТОД ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Метод ЭПР относится к методам магнитной радиоспектроскопии, при этом исследуется поглощение электромагнитной энергии радиоволн сверхчастотного диапазона в веществах, помещенных в магнитное поле определенной напряженности. Резонансное поглощение определяется магнитными свойствами вещества, то есть магнитными свойствами электронов и ядер атомов. Магнитные моменты тесным образом связаны с природой валентной химической связи, так как химическую связь образуют два электрона, магнитные моменты которых имеют противоположное направление. При разрыве химической связи возникает обычно свободные радикалы, имеющие неспаренный электрон с нескомпенсированным магнитным моментом.

Движение электрона по некоторой замкнутой орбите вокруг атомного ядра создает орбитальный магнитный момент, а собственный магнетизм электрона, не зависящий от орбитального движения, носит название спинового магнитного момента частицы / от англ. *Spin* - вращаться/. Спиновые и орбитальные моменты атомов или целых молекул могут так или иначе взаимодействовать - взаимно компенсироваться и не проявляться, или наоборот, суммироваться друг о другом и давать результирующий магнитный момент частицы. Обычно, когда атомы или молекулы обладают собственными магнитными моментами и парамагнитная намагниченность / намагниченность параллельно внешнему магнитному полю / превышает диамагнитную / намагниченность навстречу полю /, тогда в эксперименте мы замечаем только парамагнетизм.

Любое движение электрона как элементарного электрического заряда вызывает появление магнитного поля в окружающем пространстве. Магнитный момент образуется за счет спинового момента. Магнитные свойства вещества зависят в основном от спинового магнетизма, если в изучаемом веществе валентности насыщены и имеется четное число электронов, то и спиновые магнитные моменты взаимно скомпенсированы и магнитные свойства этого вещества как бы не обнаруживаются.

Если же вещество обладает нечетным числом электронов, электроны неспарены, не скомпенсированы, "свободны", то такое вещество обладает ярко выраженными магнитными свойствами. Вещества такого рода называют парамагнитными, а частицы-атомы, молекулы или еще более сложные комплексы, содержащие неспаренные электроны-парамагнитными частицами.

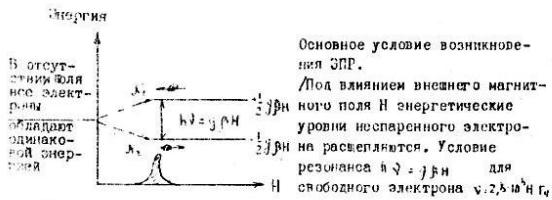
К числу парамагнитных частиц, встречающихся в биологии и биохимии, относятся свободные радикалы семихинонного типа, гидроксила, кислорода и ионы цитонов металлов переходной валентности.

Метод ЭПР позволяет обнаружить и характеризовать неспаренные электроны в исследуемом веществе, благодаря тому, что электрон обладает магнитным моментом, связанным со спином.

Спины неспаренных электронов ориентированы случайно, и все эти электроны обладают одинаковой энергией. Но если к образцу приложить внешнее магнитное поле, то возникнет обобщенная координатная ось, вокруг которой все электроны начнут ориентироваться таким образом, что M_z , то есть проекция спина на эту ось будет равна либо $+1/2$ либо $-1/2$. По закону квантования разрешены только такие квантовые состояния, для которых квантовые числа различаются на единицу. Следовательно, для одиночных неспаренных электронов эти два состояния $M_z = +1/2$ и $M_z = -1/2$ являются единственно возможными.

При наложении внешнего магнитного поля неспаренные электроны разделяются на две группы: в одной из них спины будут ориентированы параллельно направлению поля, в другой - антипараллельно. Электроны этих двух групп будут обладать и разной энергией, так как при ориентации магнитного момента параллельно магнитному полю энергия электрона уменьшится, а при ориентации его в обратном направлении возрастет. Итак, если к веществу, содержащему неспаренные электроны приложить внешнее магнитное поле, то электроны разбиваются на две группы, обладающие разной энергией, то есть происходит расщепление энергетических уровней /эффект Зеемана/. На этом основан метод ЭПР.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ



Он состоит в том, что изучаемый образец помещают в сильное однородное магнитное поле и одновременно подают электромагнитное излучение такой частоты, чтобы $h\nu$, то есть квант энергии излучения, бы равен разности между энергетическими уровнями обеих групп - так называемая резонансная частота:

$$h\nu = \gamma\hbar H, \quad (1)$$

- где γ - фактор спектроскопического расщепления.
- \hbar - магнетон Бора /характеризует соотношение между угловым и магнитным моментами, равен $\frac{e\hbar}{4\pi m_e c}$, где e - заряд $1,6 \cdot 10^{-10}$ кулон и масса электрона $9,1 \cdot 10^{-28}$ г.,
- h - постоянная Планка, c - скорость света - 300 000 км/с
- H - напряженность постоянного магнитного поля.

За счет энергии излучения неспаренные электроны, находясь на более низком энергетическом уровне, переходят на верхний уровень с одинаковым изменением направления спина. Это поглощение энергии электронами при переходе на верхний уровень может быть обнаружено по уменьшению мощности электромагнитного излучения, проходящего через систему, и зарегистрировано.

Если в уравнении (1) подставить численные значения констант и предположить, что электрон обладает только спиновым угловым моментом, то резонансная частота электромагнитного излучения будет равна

$$\nu = 2,8 \cdot 10^6 H \text{ Гс}, \quad (2)$$

т.е. напряженность магнитного поля в эрстедах $1/3$. Следовательно, для магнитного поля, создаваемого обычным электромагнитом, максимальная напряженность которого составляет около 10 Эр (30

резонансная частота равна примерно 28 000 МГц, то есть находится в микроволновом диапазоне.

Под действием электромагнитного излучения электроны, находящиеся на нижнем уровне, поглощают энергию и переходят на верхний уровень, а электроны, находящиеся на верхнем уровне, переходят на нижний уровень и при этом излучают квант электромагнитной энергии. Этот второй процесс называется "индуцированной эмиссией", и его можно рассматривать как процесс, прямо противоположный процессу поглощения. В свое время Зинштейн показал, что коэффициенты поглощения и индуцированной эмиссии равны между собой и, следовательно, если бы на двух энергетических уровнях находилось одинаковое количество электронов, то число электронов, перемещающихся вниз и излучающих энергию, было бы равно числу электронов, перемещающихся вверх и поглощающих энергию, так что в итоге поглощение было бы равно нулю. То обстоятельство, что поглощение микроволн все же имеет место, объясняется только тем, что в обычных условиях на нижнем энергетическом уровне всегда находится несколько больше неспаренных электронов, чем на верхнем, и поэтому поглощение обычно перевешивает индуцированную эмиссию (которая тем не менее также имеет место). Таким образом, разница в заселенности этих двух уровней определяет интенсивность реально наблюдаемого сигнала ЭПР и, следовательно, является одним из самых важных параметров, определяющих рабочую чувствительность спектрометра.

Распределение электронов между двумя энергетическими уровнями описывается выражением Ландауэ-Больцмана:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{h\nu}{kT}}, \quad (3)$$

где N_1 и N_2 - число электронов на верхнем и нижнем уровнях соответственно; k - константа Больцмана. Это уравнение означает, что разница между N_1 и N_2 будет тем больше /меньше, тем меньше / больше будет $h\nu$, а следовательно /больше / меньше уравнение (3) и напряженность приложенного магнитного поля H . Поэтому ЭПР-спектрометры всегда должны работать при возможно более высоких значениях напряженности магнитного поля и микроволновой частоты. На практике большинство спектрометров работает либо на частоте 9000 МГц, соответствующей

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИИ

длине волны 3,2 см /X-диапазон/, либо на частоте 36 000 МГц, соответствующей длине волны 8 мм /Q-диапазон/. Использование этих волновых диапазонов имеет то преимущество, что они применяются в радиолокации и соответствующая микроволновая техника очень хорошо разработана. Напряженность магнитного поля, соответствующая значению $\gamma = 2$ для свободного электрона, на этих двух частотах будет равна соответственно 3 300 и 13000 Э.

Из уравнения /3/ видно, что разность заселенности уровней больше при низких температурах. Поэтому низкие температуры более благоприятны для наблюдения ЭПР.

С помощью метода ЭПР можно проводить анализ системы на наличие неспаренных электронов в исследуемом веществе, количественный анализ концентрации неспаренных электронов путем сравнения сигнала ЭПР от испытуемого вещества с величиной сигнала от стандарта, в котором содержание неспаренных электронов точно известно (дифенилпикрилгидразил).

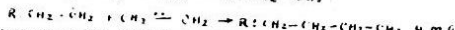
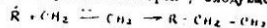
Метод ЭПР позволяет на основании анализа ширины и формы сигнала делать важные заключения о взаимодействии электронов с решеткой твердого тела или с частями жидкости в растворе. По ширине линии ЭПР можно оценить степень обмена, делокализации и подвижности электронов между многими центрами. Анализ сверхтонкой структуры спектров ЭПР позволяет в ряде случаев решать вопросы, связанные со строением свободных радикалов.

Применение ЭПР для изучения биологических объектов ограничено тем, что в биологических объектах имеется значительное количество воды, которая имеет высокую диэлектрическую постоянную и вызывает поглощение радиоволн сантиметрового диапазона, что уменьшает чувствительность метода, поэтому образцы предварительно высушивают или замораживают.

Метод ЭПР не дает сведений о короткоживущих свободных радикалах $10^{-2} - 10^{-5}$ с, поэтому были разработаны методы привитой сополимеризации и химиллюминесценции.

МЕТОД ПРИВИТОЙ СОПОЛИМЕРИЗАЦИИ

Свободные радикалы часто связываются отличными катализаторами полимеризации ненасыщенных соединений. Путем измерения скорости полимеризации можно определить количество присутствующих свободных радикалов в системе. Полимеризация ненасыщенного соединения основана на том, что радикал захватывает один электрон из электронной пары двойной (или тройной) углерод-углеродной связи, при этом образуется новый радикал, в свою очередь отбирающий электрон у следующей молекулы и т.д.



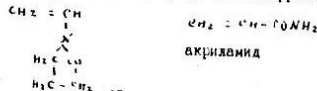
В конечном итоге процесс полимеризации заканчивается или соединением двух радикалов, или замыканием кольца в молекулу, или присоединением постороннего соединения.

Свободнорадикальные состояния присущи не только низкомолекулярным веществам, но и высокомолекулярным соединениям. Если полимеризация ненасыщенного соединения индуцирована свободнорадикальными состояниями макромолекул, то образуются так называемые привитые сополимеры.

В модельных опытах были получены привитые сополимеры крахмала со стиролом, желатин и геллалин с акрилонитрилом, льняного масла и олеиновой кислоты с акриламидом и т.д. При этом длина ветвей блок-или привитых сополимеров соизмерима с длиной молекул соответствующего гомополимера. Последнее позволило определить количество "активных центров" (свободных радикалов).

Предположение об образовании привитых систем основывается, с одной стороны, на увеличении веса и, с другой - на исчезновении сигнала ЭПР биологических объектов, облученных и обработанных раствором мономера.

При работе с биологическими объектами обычно используют водорастворимые мономеры винилового ряда (винилпирролидон, акриламид).



винилпирролидон

ЭП

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

Обнаружение привитых сополимеров в биологических объектах осуществляется несколькими методами:

1. Микроскопический метод. Этот способ применяется для определения привитых сополимеров в биологических объектах, находящихся в состоянии "митотического покоя" - семена, дрожжевые клетки в питательной среде.

Прививку синтетических полимеров на биологических объектах, инициированную, например, инициирующим излучением, осуществляли двойным способом: либо облучением системы объект-мономер, либо обработкой мономером предварительно облученных объектов. Оба процесса проводили в присутствии кислорода воздуха, поэтому условия проведения прививки в том или ином случае отличались.

В первом случае объекты и мономер помещали в стеклянные бочки, в которых их и облучали (в присутствии кислорода воздуха), или в ампулы, где откачивали воздух (в отсутствие кислорода воздуха). Процесс прививки осуществлялся в течение суток после облучения. По окончании процесса объекты механически (центрифугированием) отделяли от окружающего раствора, который представлял собой смесь мономера и образовавшегося из него гомополимера. После этого объекты тщательно промывали дистиллированной водой для удаления непрореагировавшего мономера и образовавшегося в небольших количествах гомополимера, высушивали до постоянного веса и взвешивали для определения степени прививки.

2. Радиометрический метод. Непривитый способ непригоден для определения привитых сополимеров в нормально и сильно метаболизирующих биологических объектах. Непрерывающиеся процессы синтеза и распада природных веществ в организме делают невозможным определение сополимеров весовым способом. Последнее возможно только с применением мономеров, меченых радиоактивным изотопом. Для этого был синтезирован мономер-акриламид, меченый по радиоактивному углероду.

В биологических экспериментах обнаружение радиоактивных индикаторов осуществляют с помощью двух методов радиометрического и гистозторадиграфического.

С помощью радиометрического метода определяют общее количество радиоактивного индикатора, распределенного в том или

ином органе или ткани.

Для изучения привитой сополимеризации акриламида в тканях облученных живых или животных-опухоленосителях, последние внутрибрюшинно вводили по $0,5 \text{ см}^3$ 0,2-процентного водного раствора акриламида - C^{14} . После декапитации животных исследуемые ткани извлекали, гомогенизировали и отмывали от непрореагировавшего мономера в течение 3 ч в физиологическом растворе при температуре 5°C . Небольшое количество гомогената (до 100 мг) высушивали до постоянного веса на мизанях-подложках для распределения активности.

3. Гистозторадиграфический метод. Этот способ является наиболее важным, ибо дает представление о накоплении радиоактивного вещества группами клеток и даже отдельными клетками. После того как локализация меченого вещества определена, можно измерить его количественно. Метод обладает многими положительными качествами: высокочувствителен по сравнению с другими методами, высокочувствителен (можно определить весьма малое количество вещества, а также изотопы с большим периодом полураспада), не требует дорогого и сложного оборудования, прост, надежен и легко может сочетаться с другими методами: гистохимическим, цитологическим, рентгеновской и ультрамикроструктурной микроскопией. К недостаткам этого метода следует отнести: длительность (экспозиция препаратов на фотопластинках), проскобур и подсчет достаточно большого числа следов частиц, последующая статистическая обработка результатов. Однако мономер позволяет легко определить локализацию мономера в клетках и показать природные компоненты тканей, непосредственно участвующих в процессах сополимеризации.

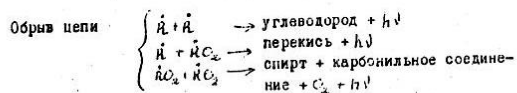
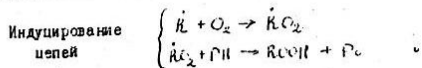
МЕТОД ХЕМИЛАМИНЕСЦЕНЦИИ

Информация об образовании свободных радикалов, их природе и реакциях в системе дает исследование хемилуминесценции живых клеток.

Хемилуминесценция сопровождает окислительные реакции цепного типа, развивающиеся по радикальному механизму. Хемилуминесценция (возбуждение свечения) происходит за счет энергии, высвобождающейся при рекомбинации свободных радикалов, а интенсивность свечения пропорциональна скорости реком-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИИ

бинирования. Механизм реакции состоит из следующих элементарных процессов:



Максимальное свечение наблюдается при рекомбинации радикалов типа $\dot{R}O_2$.

Регистрация свечения осуществляется при помощи специального приемника излучения-фотоэлектронного умножителя (ФЭУ).

Спонтанная хемилюминесценция делится на 3 основных вида: митогенетическое излучение, биолюминесценция, или экзотическая люминесценция, и сверхслабое свечение.

Митогенетическое излучение - это ультрафиолетовое излучение (190-320 нм), субстратом которого служат белки и углеводы. По мнению А.Г.Гурвича (1923), это излучение стимулирует клеточное деление.

Биолюминесценция - воспринимаемое глазом свечение (420-710 нм), присущее многим организмам (бактериям, светлячкам, некоторым рыбам, грибам и простейшим). Во всех случаях биолюминесценция является результатом ферментативного окисления особых веществ-люциферин, молекулы которых при окислении способны переходить в возбужденное состояние. Люциферин светлячков по своей природе близок к рибофлавиону, а люциферин бактерий - к флавин-мононуклеотиду.

Сверхслабое свечение, обнаруженное в 1961 году Е.Н.Тарусовым и соавторами, - это излучение живых организмов, тканей, клеток, их гомогенатов и некоторых биосубстратов в видимой и инфракрасной области спектра (360-800 нм). Это свечение сопровождается окислительными экзотермическими реакциями испного типа. Это реакции неферментативного окисления липидов, которые непрерывно протекают в норме во всех тканях и являются одним

из показателей гомеостаза. Свободнорадикальное окисление оказывает катаболическое действие на организмы. Оно определяется, во-первых, конкуренцией свободнорадикального окисления с ферментативным окислением-дыханием. Продукты свободнорадикального окисления - альдегиды, кетоны, перекиси, радикалы - могут оказывать деструктивное влияние на все системные структуры клетки.

В организме свободнорадикальное окисление тормозится системой тканевых антиоксидантов, в которую входят аскорбиновая кислота, витамин Е, сульфгидрильные соединения, каротиноиды, токоферолы и фосфолипиды. Развитие цепного и свободнорадикального окисления в тканях может быть патогенетической основой некоторых заболеваний. При этом сверхслабое свечение тканей может служить диагностическим тестом. Изменение интенсивности свечения может дать дополнительную информацию о нарушении первичных физико-химических процессов в организме.

В последнее время были проведены исследования свечения плазмы и сыворотки крови в условиях стресса и при различных заболеваниях. При стрессе интенсивность свечения плазмы крови увеличивается, что указывает на усиление в крови свободнорадикального окисления, а продукты окисления усиливают деструктивные процессы в клетках. За повышенную энергетическую готовность организм расплачивается временным усилением деструктивных процессов.

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ- АКТИВНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНАВЛИВАТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В БИОСИСТЕМАХ

В биологических системах радикалы образуются чаще всего при реакциях окисления, под влиянием ионизирующего излучения, высокочастотных электромагнитных полей и т.д.

Неспаренные электроны свободных радикалов обуславливают их высокую химическую активность, благодаря чему они легко соединяются между собой или разрывают молекулярные комплексы других веществ, образуя цепные реакции.

Геоокисление - основной источник энергии для самых различных биологических процессов. В этих процессах огромное зна-

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

значение имеют сопряженные реакции переноса электронов при участии разнообразных ферментативных систем. Михаэлисом было выдвинута гипотеза о ступенчатом окислении, согласно которой лигандирование ряда веществ протекает по следующему механизму: $AH_2 \rightarrow AH + H \rightarrow A + 2H$. Сравнительно устойчивые радикалы типа AH , появляющиеся в качестве промежуточных продуктов в ходе ступенчатого окисления, Михаэлис назвал семихинонами. Возникновение свободных радикалов семихинонной природы было показано после открытия метода ЭПР. Этим методом было установлено, что все активно метаболизирующие ткани растительного и животного происхождения содержат свободные радикалы в концентрации $10^{-7} - 10^{-8}$ М на 1 г. сухого веса ткани. Изучение ферментативного окисления показало, что наличие сигнала ЭПР связано с ферментативной активностью. Время появления сигнала пропорционально времени, за которое окисляется данное количество субстрата. Причем сигнал ЭПР возникает только при наличии трех компонентов системы: фермента, субстрата и кислорода.

Было обнаружено интересное соответствие между концентрацией неспаренных электронов в биологическом материале и уровнем обменных процессов. Так, например, концентрация неспаренных электронов в обесцвеченных листьях ячменя приблизительно в 5 раз меньше, чем в нормальных зеленых листьях. При освещении флуоресцентным светом в течение суток количество неспаренных электронов постепенно возрастает до нормальной величины и за это же время возвращается нормальная окраска листьев.

Установлена зависимость между величиной электрического потенциала и концентрацией свободных радикалов.

Экспериментальные данные позволяют предположить участие свободных радикалов в процессах канцерогенеза. Канцерогенная активность некоторых крупных кольцевых структур обусловлена их способностью образовывать свободные радикалы с веществами, вызывающими окисление.

Свободные радикалы не только участвуют в механизме канцерогенеза, но играют также ведущую роль в процессе роста и развития спорофитов. Отмечена параллель между бурным ростом

опухоли и цепными разветвленными реакциями, которые возбуждаются свободными радикалами. Это послужило основанием для исследования противоопухолевого действия ингибиторов цепных процессов (акцепторов свободных радикалов). Была установлена противоопухолевая активность соединений этого рода, потеря опухолевыми клетками способности к перевивке при обработке препаратами $in vitro$. В опухолевых клетках при взаимодействии с ингибиторами подавляется активность окислительно-восстановительных ферментов и процессов гликолиза, уменьшается содержание рибонуклеиновой кислоты и поддается биосинтезу белка. Были проведены опыты по изучению содержания свободных радикалов в табачном дыме. В замороженной струе папиросного дыма была обнаружена высокая концентрация как активных, так и стабильных свободных радикалов, предполагается, что и те и другие могут действовать в качестве канцерогенных агентов.

Результаты опыта по изучению физических и химических процессов, протекающих в живых клетках при воздействии на них излучений большой энергии, позволяют предположить, что большая часть биологических повреждений, вызываемых воздействием ионизирующей радиации, обусловлена образованием свободных радикалов.

Природа возникающих неспаренных электронов в ферментативных реакциях еще полностью не выяснена. Ожидать появления неспаренных электронов в белках при комнатной температуре за счет перехода белковой молекулы в возбужденное (триплетное) состояние трудно, ибо энергия такого возбуждения достаточно велика. Было высказано предположение, что наблюдаемые в нативных ферментативных системах сигналы ЭПР принадлежат неспаренным электронам, появившимся при ступенчатом, как предполагал Михаэлис, окислении низкомолекулярных субстратов и неспаренные электроны в значительной степени делокализованы по белковой структуре фермента. Исходя из такого предположения белковые компоненты ферментативных систем могут рассматриваться как своего рода "примесные" полупроводники, в которых роль примеси может играть низкомолекулярный субстрат. Высказывалось предположение, что упорядоченная сетка водородных связей в нативных белковых структурах может привести к

возникновении так называемой "зоны проводимости". В чистых белках эта зона при обычных температурах не заполняется, так как лежит примерно на 3 эВ выше основной валентной зоны. Очевидно, сами белки "проводимость" (подпроводниковыми свойствами) не обладают. При образовании комплекса с субстратом и ступенчатом окислении или восстановлении возникающий в ходе реакции неспаренный электрон субстрате при соблюдении пространственных и энергетических условий может попасть в "зону проводимости". В этом случае неспаренный электрон оказывается делокализованным по системе водородных и пептидных связей и мигрирует по этой структуре до тех пор, пока не встретится с каким-либо акцептором и не произойдет окислительно-восстановительная реакция между двумя пространственно разделенными соединениями. Такой механизм должен привести к значительным скоростям ферментативных реакций.

Изучение ферментативных реакций окисления позволило обнаружить несколько типов свободных радикалов, образующихся в ходе окислительно-восстановительных реакций. Во-первых, свободные радикалы, возникающие при присоединении молекул субстрата к металлофлавопротеину. Во-вторых, радикалы донора водорода. Подобного рода радикалы обнаруживаются при действии пероксидазы на перекись водорода в присутствии разных доноров водорода. В-третьих, группа свободных радикалов, возникающих за счет взаимодействия фермента с молекулами воды и кислорода и реагирующих с субстратом.

Литература

- Биофизика. / Б.Н.Тарусов, О.Р.Кольс и др. М.: Высшая школа, 1968.
- Инграм Л. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М.: Мир, 1972.
- Козлов Ю.П. Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах. М.: МГУ, 1970.
- Кретович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1974.
- Лекции по биофизике / П.О.Мекаров и др.. Л.:ЛГУ, 1968.
- Пасынский Л.Г. Биофизическая химия. М.: Высшая школа, 1963.
- Петяев М.Н. Биофизические подходы к диагностике злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1972.
- Рубин А.Б. и др. Кинетика биологических процессов. М.: МГУ, 1977.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ

О.С.Арутюнова

Тексты лекций по курсу "Биофизика"
Основы биологической кинетики
Часть I

Редактор Е.Ф. Зайцева

Подписано к печати 7.05.1985 г. АЗ 42337.

Формат 60x84 1/16. Бумага писчая № 1. Печать офсетная.

Усл.п.л. 2,3. Уч.-изд.л. 2,0. Тираж 100. Заказ 204. Цена 7 к.

Отпечатано на ротапринтере ИТУ, г. Гомель, ул.Советская, 104.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИИ

СКОРИНЫ