

УДК 577.3

БИОХИМИЯ

А. П. БРЕСТКИН, К. В. ЛАПИЦКИЙ, В. А. САМОКИШ, О. И. СМИРНОВ

**К ОПРЕДЕЛЕНИЮ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
ДВУХСТАДИЙНЫХ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ РЕАКЦИЙ**

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 12 VIII 1974)

Наиболее важными кинетическими параметрами для реакций, протекающих по механизму



являются константа равновесия $K_p = k_{-1}/k_1$ и константа скорости реакции k_2 . При условии течения псевдомомолекулярной реакции, т. е. при

$$[A] \ll [B], \quad (2)$$

изменения текущих концентраций веществ в реакции описываются системой дифференциальных уравнений

$$\begin{aligned} d[A]/dt &= -k_1[A][B] + k_{-1}[AB], \\ d[AB]/dt &= k_1[A][B] - (k_{-1} + k_2)[AB] \end{aligned} \quad (3)$$

и уравнением связи

$$[A]_0 = [A] + [AB] + [P]. \quad (4)$$

Тогда выражения для текущих концентраций реагентов в любой момент времени представляют собой сумму двух экспоненциальных членов

$$[A] = C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t}, \quad (5)$$

$$[AB] = C_3 e^{-\lambda_1 t} + C_4 e^{-\lambda_2 t},$$

где

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= 1/2(k_1[B] + k_{-1} + k_2 - \alpha), \quad \lambda_2 = 1/2(k_2[B] + k_{-1} + k_2 + \alpha), \\ C_1 &= 1 - C_2 = 1/2\alpha(k_1[B] - k_{-1} - k_2 - \alpha), \quad C_3 = -C_4 = k_1[B]/\alpha, \\ \alpha &= \sqrt{(k_1[B] + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1k_2[B]}. \end{aligned} \quad (6)$$

В настоящей работе схема (1) будет рассматриваться применительно к реакциям ферментов холинэстераз с фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ). Эти реакции широко исследованы в отношении многих рядов ФОИ (¹, ²). В изученных случаях, как правило, А — фермент, В — ФОИ, АВ — промежуточный комплекс Михаэлиса и Р — стабильный фосфорилированный фермент. В качестве характеристики реакций рассматриваемого класса обычно используется величина

$$K_{II} = K_I/[B], \quad (7)$$

где

$$K_I = 1/[A] \cdot d[A]/dt, \quad (8)$$

вычисляемая по формуле

$$K_{II} = 1/[B] t \cdot \ln [A]_0/[A]_t, \quad (9)$$

$[A]_0$ и $[A]_t$ — начальная и текущая концентрации реагента А и t — время.

Величина K_{II} является характеристической константой только при $[B] \rightarrow 0$. Тогда из (5), (6) следует

$$K_{II} = k_1 k_2 / k_{-1} + k_2. \quad (10)$$

В общем же случае K_{II} зависит от времени и $[B]$ согласно (5) и поэтому не является параметром, подходящим для корреляций структура — функция или анализа термодинамических аспектов. Ранее (3) было показано, что зависимость K_{II} от времени может быть использована для определения констант скоростей элементарных стадий схемы (1). Однако эта зависимость в обычных экспериментальных временных интервалах (порядка нескольких минут) реализуется очень редко.

В литературе описан ряд методов определения K_p для обсуждаемой схемы (1) при условии (2) через соотношение

$$K_p / [B] = [A] / [AB] = C. \quad (11)$$

Для экспериментального определения отношения C могут быть использованы три метода: 1) метод измерения зависимости удельной скорости реакции K_1 от концентрации реагента, находящегося в избытке (4, 5); 2) метод конкурирующей реакции X с A, определяющий отношение C либо по замедлению скорости изучаемой реакции, либо по начальному падению свободной концентрации вещества A (6-8); 3) непосредственное измерение $[A] / [AB]$, если имеется возможность прямо наблюдать за изменением концентраций вещества A и промежуточного комплекса AB.

Необходимо отметить, однако, что уравнение (11), в общем случае, несправедливо для рассматриваемого механизма из-за того, что даже при $t \rightarrow \infty$

$$C = \frac{[A]}{[AB]} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{C_1 e^{-k_1 t} + C_2 e^{-k_2 t}}{C_3 e^{-k_1 t} + C_4 e^{-k_2 t}} = \frac{2k_{-1}}{k_1 [B] - k_{-1} - k_2 + \alpha}, \quad (12)$$

т. е. C является нелинейной функцией от $1/[B]$.

Величина $C \rightarrow K_p$, если предположить, что $k_{-1} \rightarrow \infty$, а не $k_2 \rightarrow 0$, как предполагается в работах, использующих (11) для определения (4-7).

Таким образом, по-видимому, нельзя определить константу равновесия, не определяя констант скоростей элементарных стадий реакции.

Используя зависимость K_1 от $[B]$ или C от $[B]$, определенную любым из перечисленных выше способов, можно вычислить все константы скоростей элементарных стадий реакции (1) и истинную величину константы равновесия. Расчет элементарных констант по зависимости K_1 от $[B]$, например, основан на решении системы

$$K_{1i} = 1/2 [k_1 [B]_i + k_{-1} + k_2 - \sqrt{(k_1 [B]_i + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1 k_2 [B]_i}]. \quad (13)$$

Эти уравнения получаются как предельная форма (5) при $t \rightarrow \infty$ или путем интегрирования системы (3) при условии

$$[A] = C [AB]. \quad (14)$$

Таким путем может быть получено и выражение (12) для C .

Использование зависимости K_1 от $[B]$ или C от $[B]$ для определения констант скоростей элементарных стадий реакции предполагает анализ этих зависимостей в широких интервалах изменения $[B]$, когда в ходе реакции достигается значительное накопление промежуточного комплекса. Кроме того, необходимо проводить измерения при достаточно больших временах взаимодействия реагентов, т. е. тогда, когда их текущие концентрации будут описываться одним экспоненциальным членом из точного решения (5), вследствие падения члена с большим показателем. В этом случае в координатах $\ln [A]$ или $\ln [P]$ от времени взаимодействия экспериментальная прямая, экстраполированная к нулевому моменту времени, будет отсекают на оси ординат отрезок, знак величины которого зависит от параметра, по которому наблюдают за скоростью течения реакции.

Надо отметить, что для определения величины наблюдаемой константы скорости первого порядка K_1 часто приходится пользоваться конкурирующей тестирующей реакцией. В литературе (см., например, (6)) описаны методы определения зависимости K_1 от $[B]$ или C от $[B]$ в присутствии значительных концентраций тестирующих веществ (по отношению к насыщению реагента А). Однако значительные концентрации тестирующего вещества являются нежелательными из-за возможности образования тройных комплексов с АВ. В данной работе предлагается метод определения зависимости K_1 от $[B]$ в присутствии малой, не насыщающей реагент А концентрации тестирующего вещества.

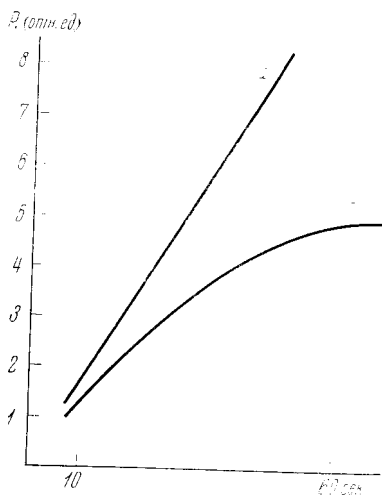


Рис. 1. График функции накопления продукта гидролиза субстрата. P — интенсивность флуоресценции раствора. a — контрольный опыт в отсутствие ингибитора, b — с ингибитором

В целом предлагаемый метод определения характеристических параметров для схемы (1), т. е. K_p и k_2 , может быть проиллюстрирован на примере взаимодействия фермента бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) из сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) с необратимыми ФОИ.

Рассматривается тот интервал времени, в котором уже соблюдается соотношение $[A]/[AB]=const$. Тогда наблюдаемая удельная скорость реакции описывается соотношением

$$[A] = \frac{1}{1+C} [A]_0 e^{-K_1 t} \quad (15)$$

Поскольку в изучаемой системе нет возможности непосредственно следить за изменениями концентраций реагентов, приходится применять метод конкурирующей реакции. Тестирующим веществом служит субстрат (S) фермента. Наблюдаемая скорость накопления продукта (v) дается уравнением Михаэлиса — Ментен

$$v = \frac{a_c [S]}{K_M + [S]} \cdot [A], \quad (16)$$

где a_c — активность каталитического центра фермента, K_M — константа Михаэлиса для исследуемого субстрата. Если выполняется условие

$$[S] \ll K_M, \quad (17)$$

то из (16) получим

$$v = \frac{a_c [S]}{K_M} \cdot [A]. \quad (18)$$

При незначительной конверсии субстрата за время измерения, т. е. при выполнении условия

$$d[S]/[S] dt \simeq 0, \quad (19)$$

из уравнений (15) и (18) получаем для наблюдаемой скорости накопления продукта гидролиза субстрата

$$v = L e^{-K_1 t}, \quad (20)$$

где

$$L = a_c [A]_0 [S] / (1+C) K_M = const. \quad (21)$$

Для накопления продукта гидролиза субстрата ($p_s(t)$) при одновременной

реакции фермента с ФОИ имеем $P_s(t) = P_{\infty s}(1 - e^{-K_I t})$. Обработка кривой накопления продукта $P_s(t)$ с помощью дифференциального метода с упрощением Рудакова (9) дает величину наблюдаемой K_I для используемой

Таблица 1

Значения констант скоростей первого порядка $\sqrt{K_I}$ для реакции О-этил-S-β-(фенилметиламино)этил/метилтиофосфата (G) с бутирилхондэстеразой

[G] · 10 ⁶ M	K_I · 10 ³ сек ⁻¹	[G] · 10 ⁶ M	K_I · 10 ³ сек ⁻¹
1	1,10 ± 0,09	10	6,98 ± 0,10
	1,23 ± 0,03		7,30 ± 0,11
2	1,78 ± 0,03	20	12,43 ± 0,14
	1,81 ± 0,03		12,04 ± 0,36
	1,74 ± 0,07		11,82 ± 0,38
5	4,51 ± 0,09	50	20,58 ± 0,49
	4,62 ± 0,13		20,62 ± 0,68

концентрации ингибитора. Необходимость выполнения условий (17) и (19) диктует выбор чувствительного метода определения продукта гидролиза субстрата. Поэтому в качестве субстрата выбран α-нафтилацетат, что позволило применить чувствительную флуориметрическую аппаратуру (10) для определения скорости накопления продукта гидролиза — α-нафтола. Концентрация субстрата, используемая для

определения K_I , равнялась $2 \cdot 10^{-5}$ M при значении K_M , равном $3 \cdot 10^{-4}$ M. Контроль за степенью конверсии субстрата осуществлялся в холостом опыте. Линейность накопления продукта гидролиза субстрата за время эксперимента указывает на незначительную степень конверсии субстрата. Реакция ФОИ с ферментом проводилась в фосфатном буфере 0,006 M при pH 7,5 и при постоянной температуре 25°. Величины наблюдаемых K_I , определяемых в эксперименте, менялись от $1 \cdot 10^{-3}$ сек⁻¹ до $2 \cdot 10^{-2}$ сек⁻¹. Измеренные величины K_I для реакции БУХЭ с О-этил-S-β-(фенилметиламино)этил/метилтиофосфатом представлены в табл. 1. Статистическая обработка данных проводилась на ЭВМ «Наирп-3».

На рис. 1 представлены экспериментальные графики функции $P_s(t)$ в холостом контрольном и в опытном вариантах.

Определенные из системы (13) методом наименьших квадратов константы скоростей элементарных стадий для изученной реакции имеют следующие значения: $k_1 = (1,5 \pm 0,15) \cdot 10^3$ M⁻¹сек⁻¹, $k_{-1} = (0,012 \pm 0,006)$ сек⁻¹, $k_2 = (0,021 \pm 0,007)$ сек⁻¹ и $K_p = (8 \pm 4) \cdot 10^{-6}$ M. Как видно, соотношение элементарных констант таково, что k_{-1} оказывается значительно меньше k_2 .

Этот результат не согласуется с широко распространенным представлением о противоположном соотношении этих констант, т. е. констант скоростей распада промежуточного соединения на исходные и конечные реагенты. Тем не менее, обсуждаемый результат хорошо согласуется с прямыми экспериментальными данными (11) по определению времен десорбции малых молекул с макромолекул ферментов.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
27 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Д. О'Брайен, Токсичные эфиры кислот фосфора, М., 1964. R. D. O'Brien, Toxic Phosphorous Esters, N. Y.—London, 1960. ² М. Г. Кабачник, А. П. Бресткин et al., Pharm. Rev., v. 22, № 3, 335 (1970). ³ А. П. Бресткин, И. Л. Брук, А. А. Сагал, ДАН, т. 167, № 6, 1381 (1966). ⁴ Л. П. Гаммет, Основы физической органической химии, М., 1972. L. P. Hammet, Physical Organic Chemistry, 1970. ⁵ G. N. Wilkinson, Biochem., J., v. 80, 324 (1961). ⁶ G. J. Hart, R. D. O'Brien, Biochemistry, v. 12, № 15, 2940 (1973). ⁷ E. Reiner, W. Aldridge, Biochem. J., v. 105, 171 (1967). ⁸ J. H. Davies, W. R. Campbell, C. W. Kearns, Biochem. J., v. 117, 221 (1970). ⁹ Е. С. Рудаков, Кинетика и катализ, т. 1, 177 (1960). ¹⁰ М. Н. Умецкая, Биохимия, т. 35, 739 (1970). ¹¹ P. W. Taylor, R. W. King, A. S. W. Burgen, Biochemistry, v. 9, № 13, 2638 (1970).