

Р.В. Сеницына, Д.Г. Верхов

**Некоторые вопросы химической энзимологии и кинетики  
ферментативного катализа**

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие «Некоторые вопросы химической энзимологии и кинетики ферментативного катализа» предназначено для студентов магистров, обучающихся по направлению «Физика» (профиль «Медицинская физика») на дневном отделении факультета нано- и биомедицинских технологий Саратовского национального исследовательского государственного университета. В течение 1 учебного семестра магистратуры студенты изучают дисциплину «Кинетика ферментативного катализа». Так как резко уменьшилось количество лекционных часов и увеличилось число часов, выделенных для самостоятельной работы, то в 2014 г. было написано первое учебное пособие, посвященное формальной кинетике биохимических процессов (Синицына Р.В. Основы кинетики биохимических процессов [Электронный ресурс] // Р.В. Синицына. Саратов: [б. и], 2014. 42 с. Б. ц. <http://library.sgu.ru> ID-837). В этом учебном пособии даны основы формальной химической кинетики, без которых невозможно в дальнейшем изучение и понимание механизма ферментативных реакций. Рассмотрены основные понятия химической кинетики, кинетические классификации и основные постулаты. Особое внимание уделено закону действующих масс и кинетическим параметрам реакций – порядку по реагенту и константе скорости. Подчеркивается важность знания точных размерностей используемых величин, которые являются основным критерием правильности полученных закономерностей.

Подробно рассмотрено влияние температуры на скорость процесса: правило Вант-Гоффа, уравнение Аррениуса и уравнение Эйринга. Особое внимание уделено таким вопросам, как температурный коэффициент и энергия активации процесса.

Дается квантовохимическое объяснение реакционной способности, основанной на теории переходного состояния. Оценивается время жизни активируемого комплекса, которое рассматривается как своеобразная фундаментальная химическая константа.

Подробно рассматриваются особенности действия ферментов. Сравниваются энергетические профили реакции с химическим катализатором и ферментом.

На основании закономерностей, изложенных в теоретической части, рассмотрен целый ряд примеров решения задач. В пособии также даны задачи для самостоятельного решения с ответами и указаниями.

При написании данного учебного пособия учитывается тот факт, что многие студенты, поступившие в магистратуру, не изучали биохимию, поэтому в содержание пособия пришлось включить главу «Ферменты» и терминологический словарь.

Начинается изложение кинетики ферментативного катализа с получения основной формулы ферментативной кинетики. Дается подробный аналитический и графический анализ этой формулы и методы её линейной трансформации для определения основных кинетических параметров.

Далее в пособии представлены многочисленные примеры выводов начальных скоростей стационарных ферментативных реакций как классическим методом с помощью алгебраических уравнений, так и методом графов.

Уравнения, полученные для двухстадийных ферментативных реакций, в случаях конкурентного и неконкурентного влияния ингибитора (а также и для трехстадийных реакций) анализируются, указываются различные методы определения индивидуальных констант сложных ферментативных реакций и констант ингибирования.

В пособии также рассмотрен диаграммный метод определения начальных скоростей стационарных ферментативных реакций, включающих равновесные стадии. Представлено ингибирование субстратом двухстадийной ферментативной реакции – случай, дающий формулу для скорости, который не подчиняется гиперболической зависимости Михаэлиса-Ментен. Полученная формула позволяет объяснить наблюдающееся иногда в экспериментах прохождение через максимум зависимости начальной скорости от концентрации субстрата при очень больших начальных концентрациях субстрата.

И, наконец, диаграммным методом определяется начальная скорость двухстадийной ферментативной реакции для случая действия обратимого эффектора. Записываются формулы для максимальной скорости процесса, кажущейся константы Михаэлиса, тангенсов угла наклона прямых в обратных двойных координатах Лайнуивера-Берка при различных концентрациях эффектора. Найдены координаты точки пересечения этих прямых, которые зависят только от коэффициентов, влияющих на образование тройного комплекса и на скорость его расщепления.

В пособии рассмотрены основные типы скоростей, отражающих влияние обратимого эффектора на двухстадийную ферментативную реакцию, когда прямые в координатах Лайнуивера-Берка пересекаются на оси ординат, на оси абсцисс и параллельны. Остальные случаи для смешанного влияния обратимого эффектора студентам предлагается рассмотреть самостоятельно, используя при необходимости рекомендуемую литературу.

Так как численные примеры решения и анализа задач подробно рассмотрены при изучении формальной кинетики биохимических реакций, то в заданиях для самостоятельной работы, приведенных в данном пособии, ответы не приводятся. Студентам предлагается самим оценить правильность и точность полученного ответа (проанализировать размерность полученной величины, её порядок, связь с другими величинами, при необходимости решить задачу другим способом).

Студенты должны также научиться самостоятельно ставить задачи и планировать эксперимент. Это, в конечном итоге, основная задача данной дисциплины.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

# Глава 1

## ФЕРМЕНТЫ

### Общая характеристика

Ферменты или энзимы – это уникальные, специфические катализаторы биохимических процессов, присутствующие во всех живых клетках и многократно ускоряющие протекающие в них реакции, не подвергаясь при этом химическим превращениям. Они были открыты при изучении механизмов брожения. Этим объясняется происхождение их названия (фермент - от латинского "дрожжи, закваска", энзим - от греческого "в дрожжах, в закваске"). Живые клетки содержат очень большой набор ферментов, от каталитической активности которых зависит функционирование клеток, поскольку практически каждая из множества разнообразных реакций, протекающих в клетке, требует участия специфического фермента. Ферменты обеспечивают осуществление таких важнейших процессов жизнедеятельности, как реализация наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биомолекул. Изучением химических свойств ферментов и катализируемых ими реакций занимается особая, очень важная область биохимии – энзимология.

Ферменты – это особые глобулярные белки (правда, известна, например, одна ферментативная реакция небелковой природы: молекула РНК катализирует свое собственное разрезание на части). Полимерная цепочка белков, состоящая из нескольких сотен звеньев остатков различных типов почти исключительно  $\alpha$ -аминокислот, имеет компактную форму.

Карбоксильная группа одной молекулы аминокислоты, взаимодействуя с аминогруппой соседней молекулы аминокислоты, образует амид. Отдельные пептидные звенья  $-\text{CO}-\text{NH}-$  отличаются друг от друга только боковыми радикалами R. Эти группы могут содержать свободные амино- или карбоксильные группы, так как некоторые белковые аминокислоты содержат две амино- (лизин) или две карбоксильных (аспарагиновая кислота) группы. Они могут содержать также и амидные группы. Кроме пептидных связей в белках имеются водородные связи между  $>\text{C}=\text{O}$  и  $>\text{N}-\text{H}$ , определяющие их вторичную структуру (спираль). В белках имеет место также взаимодействие  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$ -групп, не принимающих участия в образовании пептидной связи (третичная структура). Подробнее о третичной и четвертичной структуре белков можно прочесть в работах [1, 2].

Вещество, подвергающееся превращению в присутствии фермента, называют субстратом. Субстрат присоединяется к ферменту, который ускоряет разрыв одних химических связей в его молекуле и создание других. Образующийся в результате ферментативной реакции продукт отсоединяется от фермента. В молекуле субстрата могут быть положительно и отрицательно

заряженные группы, поляризованные группы с частичными зарядами, а также гидрофобные зоны. Соответственно, в субстрат-связывающем участке активного центра напротив положительно заряженных групп субстрата будут располагаться отрицательно заряженные группы фермента, напротив отрицательно заряженных – положительно заряженные, а напротив гидрофобных фрагментов субстрата – гидрофобные аминокислотные остатки. Таким образом, связывание фермента с субстратом происходит благодаря ионным и водородным связям, а также благодаря гидрофобному взаимодействию.

### Особенности ферментов

Ферменты имеют ряд свойств, общих с искусственными химическими катализаторами небелковой природы. Это, например, способность катализировать только энергетически возможные реакции путем снижения энергии активации  $E_a$ , направляя реакцию обходным путем через промежуточные реакции, не расходоваться в процессе реакции, ускорять как прямую, так и обратную реакции [3]. Энергией активации называется энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние при данной температуре. Другими словами, это энергия, необходимая для запуска химической реакции, без которой реакция не начинается, несмотря на ее термодинамическую вероятность. Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне.

В то же время белковая природа ферментов обуславливает ряд особенностей, которые коренным образом отличают их от искусственных катализаторов [4, 5].

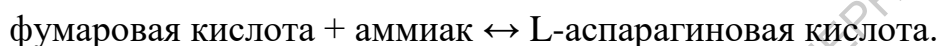
Во-первых, это необыкновенно высокая эффективность действия, значительно превосходящая эффективность обычных катализаторов и проявляющаяся в более высокой каталитической активности фермента. Например, относительная скорость для реакции разложения перекиси водорода  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  при температуре 300 К, идущей с гетерогенным платиновым катализатором, который снижает энергию активации  $E_a$  с 70 кДж/моль до 45 кДж/моль, равна  $2,2 \cdot 10^4$ . Если в качестве катализатора этой реакции использовать фермент каталазу, то энергию активации можно снизить до  $E_a = 7$  кДж/моль. При этом относительная скорость равна  $9,3 \cdot 10^{10}$ ! Таким образом, ферментативные реакции протекают очень быстро. Обычно их скорость составляет несколько тысяч актов в секунду, а иногда доходит до миллиона.

Известны, однако, и медленно работающие ферменты, например, пепсин. Под действием этого катализатора расщепление белков в желудке идет со скоростью всего лишь 10 актов в секунду.

Второй отличительной особенностью ферментов является чрезвычайно высокая специфичность по типу реакции. Определенный фермент катализирует строго определенную реакцию. Например, фермент трансаминаза отщепляет от аминокислоты только аминокетильную группу, а декарбоксилаза – только карбоксильную.

Третьей особенностью ферментов является их высокая субстратная специфичность. Даже если какая-то реакция может идти с разными соединениями, данный фермент будет работать только с одним (или немногими).

Если фермент действует только на один субстрат, то говорят об абсолютной специфичности. Например, фермент аспартаза катализирует реакцию:



Этот фермент не действует ни на какие другие соединения.

Некоторые ферменты катализируют превращение веществ, имеющих общие структурные особенности. Такие ферменты имеют относительную (групповую) специфичность. Например, химотрипсин гидролизует те пептидные связи, которые образованы карбонильной группой ароматических аминокислот.

Если фермент катализирует превращение одного из стереоизомеров субстрата, то говорят о стереохимической специфичности. Например, упомянутая выше аспартаза не действует на малеиновую кислоту или на D-аспарагиновую кислоту.

Стереохимическая специфичность ферментов теснейшим образом связана с одной из основных особенностей живых организмов – их способностью к синтезу оптически активных органических соединений.

Существуют также ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но представленные различными молекулярными формулами. Если это обусловлено генетическими причинами, то говорят об изоферментах. Изоферменты различаются по физико-химическим свойствам и могут быть отделены друг от друга путем электрофореза, хроматографически или другими методами. Для каждого органа характерен определенный набор изоферментов. Поэтому при некоторых заболеваниях, сопровождающихся разрушением клеток или повышением проницаемости мембран, в крови повышается активность тех изоферментов, которые преимущественно содержатся в пораженном органе. Так, например, фермент креатинфосфокиназа существует в виде трех изоферментов, обозначаемых MM, MB и BB. Креатинфосфокиназа MB преимущественно содержится в сердечной мышце. Поэтому при инфаркте миокарда ее активность в плазме крови повышается, что может быть использовано в диагностике этого заболевания. (С проблемами современной энзимодиагностики можно ознакомиться в работе [6]).

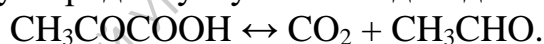
Многие (но не все) ферменты подвергаются регуляции, т.е. в зависимости от нужд клетки и организма их активность может возрастать, а может и уменьшаться.

До середины 60-х годов количество обнаруживаемых в природе ферментов исчислялось сотнями, в настоящее время их несколько десятков тысяч. Можно надеяться, что сейчас нам известны все ферменты, участвующие в основных метаболических процессах. Однако совсем недавно был открыт новый фермент, синтезирующий в человеческом организме оксид азота NO, из давно известной аминокислоты аргинина.

## Строение ферментов

В природе существуют как простые, так и сложные ферменты. Все ферменты разделяются на две большие группы: однокомпонентные, состоящие только из белка и при гидролизе распадающиеся исключительно на аминокислоты (например, пепсин, трипсин, уреазы, папаин, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза), и двухкомпонентные, состоящие из белка, называемого апоферментом, и небелковой части, называемой простетической группой. Апофермент называют также белковым носителем, а простетические группы – активными группами, которые для многих ферментов представляют собой производные витаминов или нуклеотидов.

Например, двухкомпонентным ферментом является пируватдекарбоксилаза, катализирующая расщепление пировиноградной кислоты на двуокись углерода и уксусный альдегид:



В данном случае простетическая группа фермента, тиаминпирофосфат, образована молекулой тиамина (витамина В<sub>1</sub>) и двумя остатками фосфорной кислоты.

Простетические группы, легко отделяющиеся от белковой части фермента, называются коферментами. Активностью обладает только комплекс апофермент + кофермент, называемый холоферментом.

Исключительно высокая специфичность действия ферментов объясняется их белковой природой. Так пиридоксальные ферменты, содержащие один и тот же кофермент (пиридоксальфосфат), могут принадлежать к различным классам и катализировать самые разнообразные реакции. Специфичность их действия зависит от природы апофермента.

Многие ферменты содержат металлы, без которых фермент не обладает активностью. Эти металлы называют кофакторами.

## Основные этапы развития энзимологии

Термин фермент был предложен в начале 17 в. голландским естествоиспытателем Я.Б. Ван-Гельмонтом (1579-1644). Однако он был



виталистом и считал, что жизненные процессы реализуются особыми «духами жизни» («археями»). «Ферментом» он называл неизвестный агент, активно участвующий в процессе спиртового брожения.

Первое научное представление о ферментах было высказано русским химиком К.Г.С. Кирхгофом (1764-1833). В 1811 г. он сообщил о превращении крахмала в сахар, а в 1814 г. открыл ферментативное действие водных вытяжек из проросшего ячменя, расщепляющих крахмал [7]. Можно считать, что эти работы положили начало науке о ферментах как самостоятельному разделу органической химии.

В 1833 г. французскими химиками А. Пайеном и Ж. Персо впервые был выделен из солода препарат фермента амилазы. Их работы послужили толчком для выделения и получения ферментов и способствовали развитию препаративной химии.

В середине 19 в. разгорелась дискуссия о природе брожения между французским микробиологом и химиком Л. Пастером (1822-1895) с одной стороны, и немецким химиком Ю. Либихом (1803-1873), французским химиком П.Э.М. Бертло (1827-1907) и французским физиологом К. Бернаром (1813-1878), с другой.

Опираясь на свои экспериментальные исследования, Л. Пастер развивал представление о том, что брожение вызывается лишь живыми микроорганизмами и что этот процесс неразрывно связан с их жизнедеятельностью.

Сторонники Ю. Либиха развивали представление о химической природе брожения, считая, что оно является следствием образования в клетках микроорганизмов веществ, подобных выделяемой из солода амилазе.

Здесь уместно напомнить, что в то время собственно ферментами называли «организованные ферменты», то есть сами живые организмы. Термин же энзим (от греческого *en* – в, внутри и *zyme* - закваска) был введен В. Кюне в 1876 г. для «неорганизованных ферментов», которые секретируются клетками в желудок или кишечник. Теперь эти термины используются как синонимы.

Спор длился несколько десятилетий.

Открытие аналогии между каталитическими химическими и ферментативными реакциями получило подтверждение в работах П.Э.М. Бертло, Х.Ф. Шенбайна и др. Были также попытки теоретически обосновать каталитический механизм ферментативных реакций [8].

Однако выделить из разрушенных дрожжевых клеток растворимый катализатор, способный вызвать брожение, долго не удавалось.

И только через два года после смерти Л. Пастера (в 1897 г.) Э. Бюхнер опубликовал работу «Спиртовое брожение без дрожжевых клеток», в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. Растирая дрожжи с инфузорной землей, Э. Бюхнер выделил из них

бесклеточный растворимый ферментативный препарат и назвал его зимазой. Открытие Э. Бюхнера поставило точку в долгом споре и имело большое значение для дальнейшего развития энзимологии.

Н.Н. Чернов напоминает нам [9] имя первой женщины биохимика Марии Михайловны Манассеиной (1843-1911). За 25 лет до Э. Бюхнера она на немецком и русском языках опубликовала результаты своих экспериментальных исследований, доказывающих образование спирта в суспензии убитых клеток. Британский исследователь Джон Лагнадо в работе [10] сообщает, что отыскал в Британском музее статью М.М. Манассеиной от 1872 г., которая содержит детальный анализ экспериментов, проведенных ею во время стажировки в Политехническом институте г. Вены у профессора Ю. Вайснера. Эта статья завершается выводом о том, что живые клетки совсем не обязательны для алкогольного брожения. Сама Манассеина полностью осознавала фундаментальность своей работы. Эту статью заметил Ю. Либих и пригласил автора продолжить исследования в его лаборатории в Гессене. К сожалению, М.М. Манассеина по семейным обстоятельствам должна была вернуться в Санкт-Петербург, где впоследствии прославилась своими работами по высшей нервной деятельности.

Э. Бюхнер прекрасно знал о работах М.М. Манассеиной, но никогда на них не ссылаясь. В 1907 г. он был удостоен Нобелевской премии «За проведенную научно-исследовательскую работу по биологической химии и открытие внеклеточной ферментации», а имя М.М. Манассеиной на ее родине не упоминается ни в энциклопедиях, ни в справочниках.

Начиная с 1897 г. ведется постоянная работа по выделению и очистке ферментов. Это касается, в первую очередь, ферментов, действующих вне вырабатывающих их клеток, например, пищеварительных ферментов.

Надо заметить, что такая работа велась и раньше. Так русский биохимик А.Я. Данилевский (1838-1923) впервые предложил и разработал адсорбционный метод разделения ферментов поджелудочной железы и разделил трипсин и амилазу еще в 1862 г. Он же позднее предложил теорию строения белковой молекулы.

Однако широко адсорбционный метод начал применяться только в XX в. В первую очередь, здесь следует отметить работы Р. Вильштеттера (1872-1942) и сотрудников. Этот известный немецкий химик и биохимик (Нобелевская премия 1915 г. за работу, посвященную химическому строению алкалоидов, кровяных пигментов и хлорофилла), применяя в своих исследованиях адсорбционный метод, внес существенный вклад в энзимологию. Но его работы имели и отрицательное значение. Дело в том, что, изучая свойства отдельных ферментов, он сделал принципиально неправильный вывод о том, что ферменты не принадлежат ни к одному из известных классов органических соединений.

Безусловно, выдающимся успехом в выяснении химической природы ферментов следует считать работы американских биохимиков Дж.Б. Самнера и Дж.Х. Нортропа.

Впервые в 1926 г. Дж.Б. Самнер выделил в кристаллическом виде из семян канавалии фермент уреазу. Это был первый фермент, полученный практически в чистом виде. Дж.Х. Нортроп с сотрудниками впервые выделил в кристаллическом виде протеолитические ферменты: пепсин (1930 г.), трипсин (1932 г.) и другие. Работы этих выдающихся ученых указали путь получения высокоочищенных кристаллических препаратов ферментов и вместе с тем неопровержимо доказали белковую природу ферментов.

В 1946 г. Дж.Б. Самнер, Дж.Х. Нортроп и вирусолог У.М. Стэнли за работы в области энзимологии и вирусологии были удостоены Нобелевской премии по химии.

Другим важным условием прогресса в изучении ферментов было дальнейшее углубление знаний о кофакторах ферментов. В начале 30-х годов были получены в чистом виде органические коферменты ферментативных процессов биологического окисления (коферменты гидрогеназ и желтых окислительных ферментов).

Здесь, прежде всего, следует отметить работы немецкого биохимика и физиолога О.Г. Варбурга, который за открытие природы и функций двухатомных ферментов в 1931 г. был удостоен Нобелевской премии в области физиологии и медицины. Работы О.Г. Варбурга расширили представление о механизме окислительно-восстановительных процессов в живой клетке.

В 1937 г. были удостоены Нобелевской премии швейцарский химик-органик и биохимик П. Каррер и английский химик-органик У.Н. Хоуорс. П. Каррер установил строение и синтезировал ряд биологически активных природных соединений, в том числе витаминов А, В<sub>1</sub>, Е, К и их коферментные формы.

А в 1938 г. за работы по каротиноидам и витаминам получил Нобелевскую премию немецкий биохимик Р. Кун.

В середине XX в. благодаря развитию методов физико-химического анализа и методов белковой химии расшифрована структура многих ферментов. Так американские биохимики С. Мур, У. Стайн и К. Анфинсен, применяя хроматографические методы химического анализа (автоматическую аппаратуру для хроматографического разделения и количественного определения аминокислот), в 1956 г. показали, что фермент рибонуклеаза из поджелудочной железы быка представляет собой полипептидную цепочку, состоящую из 124 аминокислотных остатков, соединенных в 4-х местах дисульфидными связями. Таким образом, впервые появилась возможность создания полной модели фермента. За основополагающий вклад в химию ферментов эти ученые в 1972 году были удостоены Нобелевской премии.

С помощью рентгеноструктурного анализа расшифрована вторичная и третичная структура ряда ферментов. Так в 1965 г. английский ученый Д. Филлипс методом рентгеноструктурного анализа установил трехмерную структуру лизоцима. Было показано, что многие ферменты обладают также и четвертичной структурой, то есть их молекула состоит из нескольких идентичных или различных по свойству и структуре белковых субъединиц.

Работы по изучению строения ферментов развивались по трем направлениям: изучение строения белковой части, исследования простетических групп, изучение способов присоединения коферментов к белку и принципа их функционирования [11]. Уделялось также внимание изучению кофакторов.

### Классификация ферментов

Бурные темпы развития энзимологии повлекли за собой возникновение определенных затруднений в систематизации информации, что затрудняло обмен опытом в этой области. Поэтому Международным биохимическим союзом была создана Комиссия по ферментам, которая в период с 1957 по 1961 г. разработала рациональные предложения по упорядочению состояния систематики и номенклатуры ферментов, энзимологической терминологии и символики. Предложенная классификация и номенклатура были утверждены на заседании Генеральной ассамблеи Международного биохимического союза, которое состоялось в 1961 г. в Москве.

Ферменты подразделяют на 6 классов.

Таблица 1

Классификация ферментов

Номер класса	Название	Общая характеристика
1	Оксиредуктазы	Катализируют реакции окисления и восстановления.
2	Трансферазы	Ускоряют перенос целых групп и молекулярных остатков из одних соединений в другие.
3	Гидролазы	Катализируют гидролиз, а иногда и синтез органических соединений при участии молекул воды.
4	Лиазы	Ускоряют негидролитичные реакции распада органических веществ с отщеплением воды, углекислого газа и аммиака. В результате действия ферментов образуются двойные связи.
5	Изомеразы	Катализируют превращения органических соединений в их изомеры.
6	Лигаза	Ускоряют синтез сложных органических соединений из более простых.

Шифр каждого фермента содержит четыре числа, разделенных точками. Первая цифра указывает класс, вторая – подкласс, третья – подподкласс, четвертая – порядковый номер в данном подподклассе.

Название и номер подкласса характеризуют химическую природу субстрата и той группы атомов в его молекуле, которая изменяется под действием соответствующего фермента. Название и номер подподкласса, как правило, уточняют химическую природу этой группы атомов в молекуле субстрата.

Например, фермент аргиназа, расщепляющий аргинин на орнитин и мочевины, имеет шифр 3.5.3.1, то есть относится к классу гидролаз, подклассу ферментов, действующих на непептидные С-N-связи, и подподклассу ферментов, расщепляющих эти связи в линейных (не циклических) соединениях.

Кроме шифра, классификация и номенклатура ферментов включает также систематические и тривиальные (рабочие) названия. Систематическое название состоит из двух частей. Первая часть представляет собой название субстрата, вторая часть с окончанием «аза» указывает на катализируемую ферментом реакцию. В качестве тривиальных названий ферментов в большинстве случаев сохранены общепринятые традиционные названия. Например, фермент, расщепляющий гидролитическим путем мочевины на аммиак и гидроксид углерода (относится к классу гидролаз, шифр 3.5.1.5), имеет систематическое название «мочевина-амидогидролаза», а тривиальное – «уреаза». Систематическому названию L-аргинин-амидогидролаза соответствует рабочее – аргиназа [12, 13].

Так как ферменты в тканях присутствуют в ничтожно малых количествах, то непосредственно определяют не концентрацию фермента, а его активность, о которой судят по скорости ферментативной реакции.

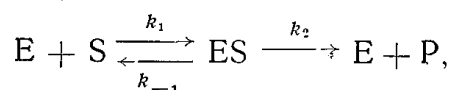
Рекомендована международная единица активности фермента (М.Е.). Одна международная единица соответствует тому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в оптимальных для этого фермента условиях. Единицей активности в системе СИ является катал (кат) и его производные (мкат и др.). Один катал – это количество фермента, которое необходимо для каталитического превращения одного моля субстрата за 1 сек.

### **Механизм действия ферментов**

Остановимся кратко на представлениях о механизме действия ферментов. Для объяснения механизма действия было предложено много теорий. Все они исходят из экспериментально установленного факта, что биокатализаторы не могут сделать возможным протекание процессов, запрещенных с точки зрения термодинамики, они увеличивают скорость разрешенных процессов, снижая энергию активации. Таким образом,

ферменты сокращают время достижения состояния подвижного равновесия, при этом в равной мере возрастает скорость как прямой, так и обратной реакции.

К фундаментальным представлениям о ферментативном катализе относится положение о многоступенчатом характере превращения веществ под действием белкового катализатора. Механизм действия простого и сложного ферментов одинаков, так как активные центры в их молекулах выполняют сходные функции. Механизм действия фермента можно представить в виде следующей схемы:



где  $E$  – фермент,  $S$  – субстрат,  $P$  – продукт.

В процессе реакции различают несколько стадий:

- Присоединение молекулы субстрата к ферменту, образование фермент-субстратного комплекса, где фермент и субстрат могут быть связаны ионной, ковалентной или иной связью. Образование комплекса  $ES$  происходит практически мгновенно.
- Субстрат под воздействием связанного с ним фермента видоизменяется и становится более доступным для соответствующей химической реакции.
- Происходит химическая реакция, в результате которой образуется комплекс продукта реакции с ферментом.
- Процесс высвобождения продукта реакции из комплекса.

В механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется тонкой структурой активного центра и уникальной структурой всей молекулы фермента, обеспечивающими его высокую каталитическую активность и специфичность действия. Впервые гипотезу о том, что в основе ферментативных реакций лежит обратимое взаимодействие субстрата с ферментом (с образованием комплекса) высказали в начале XX в. А. Браун и затем В. Анри. Доказали это Л. Михаэлис и М. Ментен, а позже Г.Э. Бриггс и Дж.Б.С. Холдейн.

Начало современным представлениям о механизме действия ферментов было положено работой немецких ученых Л. Михаэлиса и М. Ментен, опубликованной в 1913 г. Согласно теории Михаэлиса-Ментен, первым этапом любого ферментативного процесса является реакция между ферментом  $E$  и субстратом  $S$ , приводящая к образованию (с константой скорости  $k_1$ ) промежуточного фермент-субстратного комплекса  $ES$ , который может диссоциировать на фермент и субстрат с константой скорости  $k_{-1}$  и подвергаться практически необратимому расщеплению на исходный фермент и продукт  $P$  – с константой скорости  $k_2$ . При постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума, когда дальнейшее увеличение количества

субстрата практически не оказывает влияния на скорость ферментативной реакции. В таких случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен, то есть все молекулы фермента связаны с субстратом. Ограничивающим скорость реакции фактором в этом случае становится концентрация фермента. При определенной концентрации субстрата (разной для различных ферментов), когда все молекулы фермента включены в фермент-субстратный комплекс, скорость реакции становится максимальной. Она достигается при полном насыщении активных центров фермента молекулами субстрата. Если начальная концентрация субстрата много больше начальной концентрации фермента  $[S]_0 \gg [E]_0$ , то концентрация комплекса  $[ES] = const$  и начальная скорость двухстадийной ферментативной реакции  $v_0$  описывается уравнением:

$$v_0 = k_2 [ES] = \frac{k_2 [E]_b [S]_b}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_b} = \frac{V [S]_b}{K_M + [S]_b} \quad (1)$$

где  $V$  – максимальная скорость реакции, достигаемая при полном насыщении фермента субстратом, а соотношение констант  $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M$  было названо в

честь Л. Михаэлиса константой Михаэлиса. Из этого уравнения видно, что константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимально возможной.

Следует отметить, что сначала константой Михаэлиса называли константу диссоциации фермент-субстратного комплекса  $K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$ ,

а выражение для начальной скорости реакции, когда расходом субстрата можно пренебречь ( $[S]_0 \gg [E]_0$ ,  $[S] = [S]_0$ ), записывали следующим образом:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_b [S]_b}{K_s + [S]_b} \quad (2)$$

Если  $k_2 \ll k_1$ , то  $K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s$ . Константа субстрата  $K_s$ , которая служит мерой сродства субстрата к ферменту, обратно пропорциональна константе равновесия  $K_{равн} = \frac{[ES]}{[E][S]}$  реакции  $E + S \leftrightarrow ES$ . Таким образом, чем меньше  $K_s$ , тем больше сродство фермента к субстрату.

В том случае, когда определяемые из опыта константы  $k_2$  и  $K_s$  или  $K_M$  являются эффективными величинами (зависящими от pH среды, присутствия

в системе ингибиторов или активаторов, наличия дополнительных стадий и т.д.) их называют соответственно «каталитической константой» ( $k_{кат}$ ) и «кажущейся константой» Михаэлиса ( $K_{M(каж)}$ ).

$$v_0 = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K_{M(каж)} + [S]_0} \quad (3)$$

Уравнение (3) называют уравнением Михаэлиса-Ментен. Оно иллюстрирует гиперболическую зависимость скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата (рис. 1) и линейную зависимость – от концентрации фермента (рис. 2).

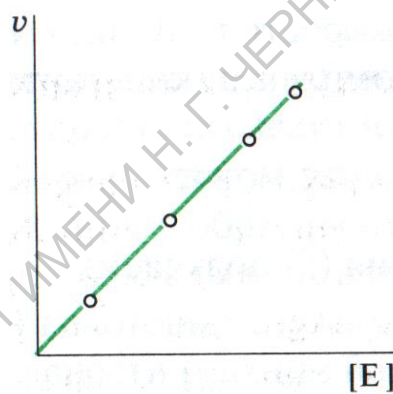
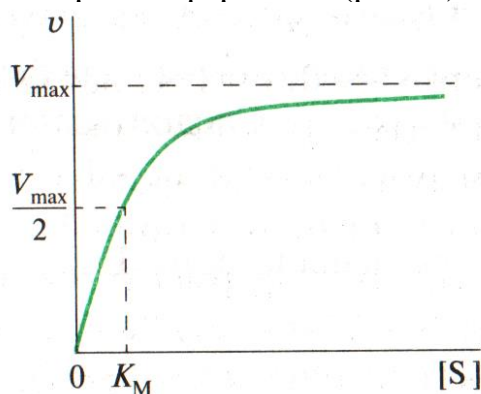


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (при  $[E]_0 = \text{const}$ )      Рис. 2. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента (при  $[S]_0 = \text{const}$ )

Кинетические параметры ( $k_{кат}$  и  $K_{M(каж)}$ ) обычно определяют, проводя линеаризацию экспериментальных данных, чаще всего в координатах Лайнуивера-Берка ( $1/v_0$ ,  $1/[S]_0$ ).

В 50-х годах прошлого века проблема механизма действия ферментов исследовалась по двум направлениям: создание общих теорий ферментативного действия и изучение деталей строения отдельных активных центров.

Интересна судьба теории цепных реакций, которые были применены для объяснений ферментативных, а именно окислительных процессов. Разработанные механизмы можно подразделить на две группы. Первая группа гипотез стремилась объяснить цепные механизмы реакций для оксидаз и дегидрогеназ. Вторая группа гипотез допускала осуществление всего процесса в пределах ферментативного комплекса и поэтому не связывала процесс с передачей цепи лишь посредством свободных радикалов. В результате было выяснено, что использование цепных механизмов не применимо для объяснения ферментативных процессов, так как не объясняет специфичность действия ферментов и его обратимость.



В 60-х годах XX в. были опубликованы ряд монографий по кинетике ферментативных процессов. Первая монография вышла в 1958 г. на английском языке, ее авторами были М. Диксон и Э. Уэбб. Книга М. Диксона и Э. Уэбба [14] – это курс общей энзимологии, ибо в ней описываются общие для всех ферментов свойства, закономерности каталитического действия и т.д. Также большой интерес представляет монография П. Ашмора [15], в которой охватываются механизм действия катализаторов и кинетика каталитических реакций.

Одной из первых была книга В.А. Яковлева [16], написанная на основе курса по ферментативной кинетике, прочитанного в Московском государственном университете по материалам научных исследований, выполненных совместно с учеными из Ленинграда. В книге [16] в сжатой форме излагаются теоретические основы кинетики ферментативного катализа и анализируются возможности и пути практического использования кинетического метода в изучении механизма действия ферментов.

Большой вклад в исследование механизма действия ферментов и его структуры внесли И.В. Березин [17, 18], А.А. Клёсов [17-19], К. Мартинек [20], М.В. Волькенштейн [21], Ч. Уолтер [22] и другие. Особо следует отметить И.В. Березина. Им созданы и развиты методы анализа ингибирования ферментативных реакций, развиты кинетические модели полиферментных реакций, процессы электронного транспорта, методы иммобилизации ферментов. Заложены основные методы иммуноферментного анализа, биолюминесцентного анализа, а также создания светорегулируемых ферментов (бессеребряной ферментной фотографии) [23].

Подробно история развития отечественной энзимологии изложена в обзоре [24].

В свое время было предложено несколько вариантов "узнавания" фермента субстратом. Первоначально была принята идея Э. Фишера о том, что субстрат и фермент подходят друг к другу, как ключ к замку [5]. Д. Кошланд [25] выдвинул идею индуцированного соответствия фермента и субстрата, согласно которой субстрат вызывает изменение конформации активного центра фермента [11, 21, 25-27]. Высказывалась также идея о том, что при связывании фермента и субстрата возникает принудительная деформация субстрата, что приводит к изменению положения электронной плотности [28, 29]. М.В. Волькенштейн предложил "капельную" модель фермента [30]. Были выдвинуты концепции, предполагающие, что белок в растворе имеет несколько конформаций и субстрат выбирает одну активную конформацию. Описанный механизм был назван конформационной адаптацией [31] и флуктуационным соответствием [32]. Рассмотрение всех концепций ферментативного катализа подробно дано в обзорной статье Е.М. Попова [33].

Исследование зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата является обязательным элементом изучения любого фермента, так как оно позволяет оценить основные черты механизма катализируемой им реакции и получить количественную кинетическую характеристику процесса.

Исследование кинетики ферментативных реакций в стационарном режиме – один из наиболее распространенных способов изучения механизма действия фермента [14, 16, 22, 34]. При исследовании реальных ферментативных систем условие стационарности выполняется приблизительно. Для того чтобы можно было применить принцип стационарности, достаточно, чтобы скорость изменения концентрации промежуточного соединения была много меньше скорости изменения в растворе концентрации субстрата и продукта. Для реакций, протекающих более сложными путями, чем механизм Михаэлиса-Ментен [35], для выполнения стационарности необходимы дополнительные условия, определяемые соотношением констант скоростей индивидуальных стадий.

Полную информацию о детальном механизме ферментативных реакций с участием ряда промежуточных соединений дает изучение процесса в нестационарном режиме. Необходимо отметить, что формально-кинетическому анализу стационарной кинетики ферментативных реакций посвящено достаточно много обзоров и монографий [14, 16, 22, 34] в то время как отсутствует полное и последовательное изложение данных нестационарной ферментативной кинетики.

Предстационарный и релаксационный режимы исследования ферментативных реакций [16, 17, 22, 35-37] представляют собой наиболее часто используемые и хорошо разработанные способы исследования механизмов реакций в нестационарном режиме.

Исследование нестационарной кинетики ферментативных реакций связано с использованием экспериментальных методов исследования кинетики "быстрых" реакций в растворе, так как период протекания нестационарной ферментативной реакции достаточно мал.

Использование совокупности разных физико-химических методов для обоснования кинетической модели приводит одновременно к результатам, дающим вместе с тем и важнейшую информацию о механизме процесса. Эти же данные способствуют одновременно уточнению самой модели. Возникает вопрос: чем отличается кинетическая модель от механизма реакций?

Согласно [38] *кинетическая модель* – количественная характеристика скорости каталитического процесса в виде ее математического описания по разным реализуемым в данных условиях направлениям, обоснованная определенными стационарными схемами, учитывающая существенные сопутствующие эффекты, в том числе влияние реакционной системы на катализатор. *Механизм реакции* – всесторонняя качественная характеристика ее внутренних закономерностей, отражающая последовательность

элементарных стадий, их сопряжение, природу промежуточных соединений с учетом побочных взаимодействий в данных условиях.

Итак, в кинетической модели главное – количественное описание скорости процесса, а в механизме реакции – качественное описание природы промежуточных соединений и их взаимосвязи.

### **Факторы, определяющие активность ферментов**

Известно, что скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, может быть увеличена, либо уменьшена с помощью различных воздействий. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции (её повышение) оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Так, например, соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока. Часто активаторами выступают ионы двухвалентных и реже одновалентных металлов. В отсутствие металлов многие ферменты становятся вообще неактивными.

Снижение скорости ферментативных реакций принято называть торможением, или ингибированием. По характеру действия ингибиторы могут быть обратимыми и необратимыми. В основе этого деления лежит прочность соединения ингибитора с ферментом. Обратимое ингибирование достигает состояния равновесия, положение которого определяется константой ингибирования, характеризующей сродство фермента к ингибитору. Другой способ деления ингибиторов основывается на характере места их связывания. Одни из них связываются с ферментом в активном центре, а другие – в удаленном от активного центра месте. Необратимые ингибиторы могут прочно связываться и блокировать функциональные группы активного центра фермента. При этом они необратимо, часто ковалентно, присоединяются к ферменту и необратимо изменяют его нативную конформацию. Ингибиторы такого рода называются специфическими и могут быть полезны при изучении строения активного центра и природы ферментативного катализа.

Большое значение для регуляции действия ферментов *in vivo* имеют изменения их активности при связывании специфических реагентов функциональными группами, находящимися вне активного центра белковой молекулы. Такое взаимодействие приводит к изменению конформации ферментов и его активности. Оно может быть конкурентным и неконкурентным [11, 14, 15, 34, 39-41].

Ингибиторный анализ не может ограничиваться качественной оценкой действия или не действия вещества на активность фермента. Обязательный элемент анализа – количественная оценка реакционной способности ингибитора, которая может быть дана с помощью кинетических параметров.

По механизму взаимодействия с ферментами ингибиторы делятся на две большие группы. Ингибиторы, снижающие активность фермента в

результате взаимодействия с теми же самыми центрами фермента, что и субстраты, называются *конкурентными*. Ингибиторы, которые снижают активность фермента вследствие реакции с другими функциональными группами, носят название *неконкурентные*. В первом случае ингибитор образует неактивное соединение только со свободным ферментом. Во втором случае (неконкурентное ингибирование) ингибитор взаимодействует со всеми формами ферментов.

На практике нередко встречаются случаи смешанного торможения, когда один и тот же ингибитор может реагировать со свободным ферментом в разных точках, а также с фермент-субстратным комплексом на разных стадиях его превращения [14, 17, 34, 39, 41]. Существуют и такие виды ингибирования как бесконкурентное и псевдоингибирование [34, 39, 41].

Псевдоингибирование ферментов не нашло широкого признания в энзимологии [14, 18, 34, 42, 43], хотя в практике накопилось достаточно экспериментальных данных, подтверждающих его существование. Псевдоингибирование интересно тем, что, несмотря на соотношение начальных скоростей реакций  $v_i < v_0$ , типичное для ингибирования и выполнимое на всем интервале обратных концентраций расщепляемого субстрата, прямая ингибируемой реакции пересекает прямую исходной реакции в первом квадранте координат Лайнуивера-Берка.

Отнесение данного типа ингибирования к псевдоингибированию обусловлено тем, что присутствие таких ингибиторов приводит не к уменьшению, а к увеличению максимальных скоростей реакций, что более типично для активации. Однако к активируемым реакциям этот тип не подходит, поскольку первичный эффект, проявляющийся в уменьшении начальной скорости ( $v_i < v_0$ ) – признак ингибирования, а не активации.

Исследованию активации ферментов, разработке практических и теоретических аспектов этого эффекта в литературе уделялось значительно меньше внимания, чем ингибированию. В книгах [34, 39, 44, 45] рассмотрена активация ферментов другими соединениями.

На активность фермента также влияет рН среды и температура [11, 14, 15, 18, 34]. Причины влияния рН на скорость ферментативной реакции состоят в том, что белковая молекула фермента является амфотерным полиэлектролитом, каталитический эффект которого зависит от степени ионизации функциональных групп, определяющих структуру и реакционную способность активного центра фермента. В связи с этим исследования рН-зависимости скорости ферментативных реакций играют важную роль в идентификации ионогенных групп ферментов, участвующих в каталитическом процессе. Ферменты обычно наиболее активны при значениях рН среды, близких к нейтральным (6,0-8,0). Изменение оптимального для данного фермента значения рН среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности.

С другой стороны, при изменении рН может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса.

Температура может по-разному влиять на активность фермента. При определенных (оптимальных) значениях температура может влиять на скорость образования фермент-субстратного комплекса, вызывая увеличение скорости реакции. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом фермента. Различные ферменты имеют собственные температурные оптимумы. При повышении температуры ферменты теряют свою активность, так как при высоких температурах белки подвергаются денатурации: они теряют свою природную конформацию и уже не могут выполнять свои биологические функции, поскольку происходит перестройка белковой цепи, сопровождающаяся потерей каталитической активности. При низких температурах (0 °С и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, однако их активность падает почти до нуля.

Исследование температурной зависимости позволяет определить термодинамические характеристики реакций ферментативного катализа (вычисление энергии активации, энтальпии, свободной энергии) [34].

### **Использование ферментов**

Практическому использованию ферментов до 70-х годов XX в. мешала их низкая устойчивость и дороговизна. Усовершенствование методов очистки ферментов значительно снизило их стоимость и повысило доступность. Однако основные успехи, позволившие широко использовать ферменты, связаны с получением иммобилизованных ферментов [46, 47]. Идея «пришить» фермент к матрице появилась еще в конце 40-х годов, а была реализована только в начале семидесятых. Основная технологическая проблема заключалась в поиске подходящих матриц (как правило, это полимерные молекулы). Фермент присоединяется к ним химическим путем (ковалентными связями), однако в ряде случаев соединение происходит за счет электрических или гидрофобных связей. Иногда можно просто инкапсулировать фермент внутрь полимерного микроконтейнера, липидного бислойного пузырька (липосомы) или обволакивающего гелеобразного соединения [48, 49]. Матрица может быть как растворимой в воде, так и нерастворимой. Нерастворимые носители позволили использовать ферменты в технологических процессах. Можно иммобилизовать целые клетки [50, 51]. Например, в производстве этилового спирта в настоящее время широко используются иммобилизованные клетки дрожжей.

В настоящее время энзимология – это обширная область знания с многочисленными ответвлениями в другие науки. Она тесно связана с биохимией, бактериологией и микробиологией, генетикой, ботаникой, а также фармакологией, физиологией и медициной.

Ферменты довольно широко используются в различных областях деятельности человека. Осознание ключевой роли ферментов в протекании всех клеточных процессов привело к широкому их применению в медицине. Так, во многих клиниках проводят измерение активности различных форм ферментов лактатдегидрогеназы и трансаминазы – их соотношение изменяется при таких болезнях как инфаркт миокарда, поражения печени, мышечные дистрофии. Фермент стрептокиназу врачи применяют для рассасывания тромбов; ферменты трипсин и коллагеназа используются для рассасывания рубцов [52]. В биотехнологии ферменты применяются еще шире. Амилаза, расщепляющая крахмал, используется в пивоваренной, хлебопекарной (облегчает переработку крахмала дрожжами), текстильной и кожевенной промышленности (умягчает сырье). Различные протеазы, расщепляющие белки, применяют в пищевой (делают старое мясо более мягким, сворачивают молоко в сыроварении) и кожевенной промышленности. В пищевой промышленности используются инвертаза (расщепляет сахарозу), глюкоизомераза (изомеризует глюкозу в более сладкую фруктозу), трансглутаминаза (сшивает белки, улучшая структуру продукта), липазы (расщепляют липиды, применяются для получения более ценных пищевых жиров), пектинметилэстераза (осветляет фруктовые соки).

Достижения энзимологии находят все большее применение в медицине, в частности в профилактике, диагностике и лечении болезней. Успешно развивается новое направление энзимологии – медицинская энзимология, которая имеет свои цели и задачи, специфические методологические подходы и методы исследования. Медицинская энзимология развивается по трем главным направлениям, в частности в области энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии.

Область исследований энзимопатологии является теоретической, фундаментальной частью изучения патологии. Она призвана изучать молекулярные основы развития патологического процесса, основанные на данных нарушения механизмов регуляции активности или синтеза индивидуального фермента или группы ферментов. Обладая высокой каталитической активностью и выраженной органотропностью, ферменты могут быть использованы в качестве самых тонких и избирательных инструментов для направленного воздействия на патологический процесс. Считается, что развитие болезни чаще всего связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием способности синтезировать один единственный фермент в организме больного [53]. Иногда болезни называют также энзимопатиями. Так, галактоземия – наследственное заболевание, при котором наблюдается ненормально высокая концентрация галактозы в крови. Болезнь развивается в результате наследственного дефекта синтеза фермента галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, катализирующего превращение галактозы в глюкозу.

Второе направление медицинской энзимологии – энзимодиагностика. Она заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека. Энзимодиагностика развивается по двум направлениям: использование ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения нормальных или аномальных химических веществ в сыворотке крови, моче, желудочном соке и др., а также обнаружение и количественное определение самих ферментов в биологических жидкостях при патологии. Для диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей широко применяются отдельные ферментные тесты, выгодно отличающиеся от других химических диагностических тестов, используемых в клинической практике, высокой чувствительностью и специфичностью.

Третье направление медицинской энзимологии – энзимотерапия. Это использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов) действия ферментов в качестве лекарственных средств [54-56]. Работы в этом направлении практически не выходят за рамки эксперимента. Исключение составляют некоторые протеиназы: пепсин, трипсин, химотрипсин и их смеси (абомин, химопсин), которые применяют для лечения ряда болезней пищеварительного тракта. Помимо протеиназ, ряд других ферментов, в частности РНКазы, ДНКазы, гиалуронидаза, коллагеназы, эластазы, отдельно или в смеси с протеиназами используются при ожогах, для обработки ран, воспалительных очагов, устранения отеков, гематом, кавернозных процессов при туберкулезе легких. Ферменты применяются также для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, растворения сгустков крови.

## Глава 2

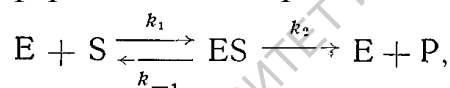
### НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

#### Основная формула ферментативной кинетики и методы её линейной трансформации

Решение основных проблем кинетики ферментативных процессов связано с анализом предлагаемых кинетических схем, получением соответствующих уравнений для скоростей реакций и сравнением полученных зависимостей с экспериментальными данными.

Существует классический метод расчета скоростей сложных процессов, основанный на применении постулатов формальной химической кинетики. Этот метод был применен к нахождению скорости двухстадийной ферментативной реакции ещё во времена Л. Михаэлиса и М. Ментен.

Одним из наиболее распространенных способов изучения механизма действия ферментов является исследование кинетики ферментативных реакций в стационарном режиме. Получим уравнение (1) для начальной скорости двухстадийной ферментативной реакции



первая стадия которой обратима (константа прямой реакции  $k_1$ , обратной –  $k_{-1}$ ), а вторая стадия образования продукта имеет константу  $k_2$ .

Будем считать фермент-субстратный комплекс ES активным промежуточным соединением, концентрация которого в стационарном состоянии постоянна. Применяя постулаты химической кинетики простых (I и II постулаты) [57] и сложных процессов (принцип лимитирующей стадии, суперпозиции, квазистационарных концентраций, микроскопической обратимости), получим:

$$v_0 = k_2[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

Для случая, когда  $[S]_0 \gg [E]_0$ , что является обычным условием изучения кинетики ферментативных реакций, уравнения материального баланса по ферменту и субстрату будут иметь вид:

$$[E]_0 = [E] + [ES];$$

$$[S]_0 = [S].$$

Комбинируя эти уравнения с условием постоянства комплекса ES, получим:

$$k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 = (k_{-1} + k_2)[ES], \text{ откуда}$$



$$[ES] = \frac{[E]_b[S]_b}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]_b} = \frac{[E][S]_b}{K_M + [S]_b}, \text{ а}$$

$$v_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_b[S]_b}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]_b} = \frac{V[S]_b}{K_M + [S]_b} \quad (1)$$

Из (1) видно, что зависимость  $v_0$  от  $[E]_0$  при  $[S]_0 = \text{const}$  представляет собой прямую, проходящую через начало координат (рис. 2), тангенс угла которой равен  $\frac{k_2[S]_b}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]_b}$ . Зависимость начальной скорости от начальной

концентрации субстрата при постоянной начальной концентрации фермента не такая простая. Она имеет вид гиперболы. Увеличение концентрации субстрата сопровождается сначала значительным, а затем всё более ослабевающим возрастанием  $v_0$  (рис. 1), которое после некоторого предела практически полностью прекращается. Это подтверждается многочисленными экспериментами.

При малых концентрациях субстрата, когда  $[S]_0 \ll K_M$  начальная скорость  $v_0 = \frac{k_2[E]_b}{K_M}[S]_b$  представляет собой прямую с тангенсом угла наклона  $\frac{k_2[E]_b}{K_M}$ .

$$\text{Если } [S]_0 = K_M, \text{ то } v_0 = \frac{k_2[E]_b[S]_b}{[S]_b + [S]_b} = \frac{V[S]_b}{[S]_b + [S]_b} = \frac{k_2[E]_b}{2} = \frac{V}{2}.$$

Таким образом,  $K_M$  может быть приблизительно определена даже с использованием гиперболической зависимости, как концентрация субстрата при начальной скорости ферментативной реакции равной половине максимальной. Ясно, что размерность  $K_M$  равно размерности концентрации. Максимальная скорость  $V$  может быть определена как предел  $v_0$  при больших концентрациях субстрата. Скорость  $V$  постоянна для каждого фермента и характеризует эффективность его действия.

Более точно  $K_M$  и  $V$  обычно находят, используя линеаризацию зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Видно, что уравнение (1) является частным случаем формулы (3) при  $k_{\text{кат}} = k_2$  и  $K_{M(\text{каж})} = (k_{-1} + k_2)/k_1$ . Таким образом, константа Михаэлиса даже в двухстадийной ферментативной реакции в общем случае является кинетической, а не равновесной, переходя в константу  $K_S$  лишь в частном

случае. Поэтому константы  $k_{\text{кат}}$  и  $K_{\text{M(каж)}}$  обычно называют кинетическими параметрами ферментативных реакций. При выводе формулы (1) допущен ряд упрощений. Как показывают эксперименты, процессу распада фермент-субстратных комплексов на продукты реакции и свободный фермент может предшествовать не одна, а несколько стадий его превращения. В системе кроме S и E могут присутствовать другие компоненты. Следовательно, вычисленные значения  $K_{\text{M}}$  будут величинами кажущимися. Их также находят, применяя один из методов линейной трансформации уравнения для скорости (3).

Таблица 2

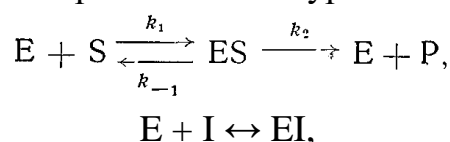
Способы линейной трансформации уравнения  $v = \frac{V[S]}{K_{\text{M}} + [S]}$  в линейное уравнение  $y = ax + b$

y	x	a	b
$1/v$	$1/[S]$	$K_{\text{M}}/V$	$1/V$
$[S]/v$	$[S]$	$1/V$	$K_{\text{M}}/V$
$v$	$v/[S]$	$-K_{\text{M}}$	$V$
$v/[S]$	$v$	$-(1/K_{\text{M}})$	$V/K_{\text{M}}$
$1/[S]$	$1/v$	$V/K_{\text{M}}$	$-(1/K_{\text{M}})$
$[S]$	$[S]/v$	$V$	$-K_{\text{M}}$

Классический метод вычисления скоростей ферментативных реакций сводится, как видно из предыдущих расчетов, к совместному решению нескольких алгебраических уравнений. Сначала для лимитирующей стадии, используя I и II постулаты химической кинетики, записывается формула для начальной скорости ферментативной реакции. Это скорость образования продукта из промежуточного комплекса. Затем, применяя принципы суперпозиции и квазистационарных концентраций, записывают алгебраическое уравнение для концентрации промежуточного комплекса. И, наконец, используя уравнения материального баланса для  $[E]_0$  и  $[S]_0$ , а также, если необходимо, принцип микроскопической обратимости для других компонентов, входящих в уравнение для промежуточного комплекса, находят выражение для скорости ферментативной реакции.

### Конкурентное ингибирование

Вычислим формулу для скорости двухстадийной ферментативной реакции в случае действия обратимого конкурентного ингибитора.



считая сродство субстрата и ингибитора к ферменту одинаковым. Это случай полного конкурентного ингибирования.

$$v = k_2[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$[S]_0 \gg [E]_0; [S]_0 = [S]; [E]_0 = [E] + [ES] + [EI]; [EI] = [E][I]/K_i$$

$$k_1 \frac{[E]_0 - [ES]}{1 + \frac{[I]}{K_i}} [S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S] / \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] / \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} = \frac{[E]_0[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$$v_i = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} = \frac{V[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (4)$$

Уравнение (4) является частным случаем уравнения (3) при  $k_{кат} = k_2$  и  $K_{M(каж)} = K_M \cdot (1 + [I]/K_i)$ . Прямые ингибированной и неингибированной реакций в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка ( $1/v$ ,  $1/[S]$ ) пересекаются на оси ординат, так как максимальные скорости исходной и ингибированной реакций равны ( $k_{кат} = k_2$ ).

Прямые для ингибированных реакций при различных концентрациях ингибитора лежат выше прямой, соответствующей  $[I] = 0$ . Они отсекают на оси абсцисс величины, равные  $(-1/K_{M(каж)})$ , которые меньше  $(-1/K_M)$  в  $(1 + [I]/K_i)$  раз.

Для того, чтобы вычислить величину константы ингибирования фермента  $K_i$  достаточно двух экспериментальных кривых с  $[I] = 0$  и  $[I] \neq 0$ .

Определяя  $K_{M(каж)}/K_M = (1 + [I]/K_i)$ , находим  $K_i = \frac{[I]}{\frac{K_{M(каж)}}{K_M} - 1}$ .

На практике, однако, обычно используют более точный графический метод определения  $K_i$ , используя экспериментальные данные для нескольких концентраций  $[I]$ . Прямые в координатах  $(K_{M(каж)}/K_M; [I])$  имеют тангенс угла наклона  $1/K_i$ .

Константу ингибитора также можно найти, определяя абсциссу ( $-K_i$ ) и ординату ( $1/V$ ) точки пересечения прямых в координатах Диксона ( $1/v_i$ ;  $[I]$ ) при различных начальных концентрациях субстрата. Прямые пересекаются в левом верхнем квадранте. Абсцисса точки пересечения  $[I]=-K_i$ , ордината  $1/v_i=1/V$ .

Так как ингибиторы данного типа взаимодействуют с тем же самым местом активного центра фермента, с которым взаимодействует и субстрат, этот тип ингибирования оказался в энзимологии наиболее информативным. Используя метод конкурентного ингибирования, можно, например, получить ценную информацию о механизме образования соответствующих фермент-субстратных комплексов и природе функциональных групп активного центра.

### Неконкурентное ингибирование

Аналогично можно найти скорость ингибированной двухстадийной ферментативной реакции в случае действия обратимого неконкурентного ингибитора (ингибитор может реагировать не только с ферментом, но и с фермент-субстратным комплексом, образуя тройной комплекс ESI, который далее не распадается).

$$v = k_2[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

$$[S]_0 \gg [E]_0; [S]_0 = [S]; [E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]; [EI] = [E][I]/K_i; [ESI] = [ES][I]/K_i$$

$$[E] = \frac{[E]_0 - [ES] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$k_1 \frac{[E]_0 [S]}{1 + \frac{[I]}{K_i}} - k_1 [ES][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \text{ откуда}$$

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S] / \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

$$v_i = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{[I]}{K_i})}{K_M + [S]} = \frac{k_{кам}[E]_b[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

В отличие от конкурентных ингибиторов присутствие в фермент-субстратной системе неконкурентных ингибиторов ведет к уменьшению максимальной скорости реакции в  $(1 + [I]/K_i)$  раз и не влияет на связывание субстрата с ферментом, то есть не затрудняет образование ESI-комплексов.

Прямые в координатах Лайнуивера-Берка пересекаются на оси абсцисс. Константа Михаэлиса определяется из абсциссы точки пересечения  $(1/K_{M(каж)} = -1/S)$ . Константу ингибитора можно найти из тангенса угла наклона прямых  $v/v_i = 1 + [I]/K_i$ , который в координатах  $(v/v_i; [I])$  равен  $1/K_i$ . Видно, что, если  $v/v_i = 2$ ,  $K_i = I_{50}$ . Таким образом, константа ингибитора равно концентрации ингибитора при скорости ингибированной реакции в 2 раза меньшей исходной.

Можно использовать график прямых в координатах Диксона  $(1/v_i; [I])$  при разных концентрациях субстрата. Координаты точки пересечения прямых, пересекающихся на оси абсцисс, для различных концентраций субстрата равны  $(0; -K_i)$ .

Полное неконкурентное ингибирование наблюдается, когда ESI-комплексы не распадаются с образованием продуктов реакции. Если же тройные комплексы распадаются, но со скоростью, меньшей, чем скорость распада комплексов ES, наблюдается частичное неконкурентное ингибирование. Скорость реакции в случае полного неконкурентного ингибирования (5) определяется скоростью распада ES-комплекса. В случае частичного неконкурентного ингибирования скорость определяется суммой скоростей распада обоих комплексов. Если при взаимодействии ингибитора с ферментом и с фермент-субстратным комплексом константы ингибитора различны ( $K_i \neq K_i'$ ) будет наблюдаться, так называемое, смешанное

ингибирование, скорость которого равна  $v_i = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{[I]}{K_i'})}{(1 + \frac{[I]}{K_i}) \frac{K_M}{(1 + \frac{[I]}{K_i'})} + [S]}$ .

## Трехстадийные ферментативные реакции

Классическим методом довольно легко можно получить выражения для начальных скоростей трехстадийной ферментативной реакции в случае стационарного процесса

$$v_0 = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{k_2}{k_3})}{K_M / (1 + \frac{k_2}{k_3}) + [S]} \quad (6)$$

и для случая равновесия  $E + S \leftrightarrow ES$

$$v_0 = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{k_2}{k_3})}{K_S / (1 + \frac{k_2}{k_3}) + [S]} \quad (7)$$

Для конкурентного ингибирования будем иметь соответственно

$$v_0^i = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{k_2}{k_3})}{K_M(1 + \frac{[I]}{K_i}) / (1 + \frac{k_2}{k_3}) + [S]} \quad (8)$$

$$v_0^i = \frac{k_2[E]_b[S] / (1 + \frac{k_2}{k_3})}{K_S(1 + \frac{[I]}{K_i}) / (1 + \frac{k_2}{k_3}) + [S]} \quad (9)$$

Для неконкурентного влияния ингибитора на активность фермента выражения для начальных скоростей трехстадийных ферментативных реакций будут соответственно иметь вид

$$v_0^i = \frac{k_2[E]_b[S] / \left(1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i}\right)}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) / \left(1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (10)$$

$$v_0^i = \frac{k_2[E]_b[S] / \left(1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i}\right)}{K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) / \left(1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (11)$$

Формулы (6)-(11) также являются частными случаями (3) при различных  $k_{кат}$  и  $K_{M(каж)}$ , которые могут быть найдены путем линеаризации уравнения (3).

Для нахождения других констант можно использовать не только сами кинетические константы ( $k_{кат}$ ,  $K_{M(каж)}$ ), но и их различные сочетания.

Например, зависимость  $\frac{1}{k_{кат}^i} = \frac{1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i}}{k_2}$  из формулы (11) можно использовать для нахождения  $k_2$ , если известно  $K_i$  из тангенса угла наклона, и далее для определения  $k_3$  использовать отрезок на оси ординат  $\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3}$ .

Если использовать  $\frac{K_{M(каж)}^i}{k_{кат}^i} = \frac{K_S(1 + [I]/K_i)}{k_2} = \frac{K_S}{k_2} + \frac{K_S}{k_2 K_i} [I]$ , то можно найти  $K_i$  по отрезку, отсекаемому прямой на оси [I].

Хорошие результаты дает также использование координат Диксона ( $1/v_i$ ; [I]), а также зависимость отношения скоростей к концентрации ингибитора ( $v/v_i$ ; [I]).

### Нахождение скоростей стационарных ферментативных реакций методом графов

Для сложных процессов с большим числом промежуточных соединений и кинетических констант решение соответствующей системы алгебраических уравнений становится чрезвычайно громоздким даже для стационарного случая. Особенно резко это проявляется, если молекула фермента имеет несколько активных центров по отношению к субстратам, ингибиторам или активаторам.

Бурное развитие молекулярной биологии в 1950-1960 годы пробудило интерес энзимологов к различным отклонениям от кинетики Михаэлиса-Ментен, уравнения которой интерпретируют гиперболическую зависимость скорости от концентрации субстрата.

Схемы ферментативных реакций продолжали усложняться, и требовался новый подход для их анализа и систематизации. Такой подход был найден в теории графов, которая позволяет выявить связь между структурой и поведением сложной системы.

Следует отметить, что учение о графах возникло в рассуждениях Леонарда Эйлера (1707-1783) о Кёнигсбергских мостах ещё в 1730-е годы. Большой вклад в теорию графов был сделан Г.Р. Кирхгофом (1824-1887). Методы теории графов, нашедшие особенно широкое применение для анализа сложных электрических систем, оказались ещё более полезными в кинетике сложных ферментативных реакций. И первым, кто применил эту теорию в ферментативной кинетике, был Б.Н. Гольдштейн, работавший когда-то в области теоретической электротехники [58-60].

В то же время советский физико-химик М.И. Тёмкин применил теорию графов к проблемам химической кинетики [61, 62].

Только с привлечением терминологии и методов теории графов структурная кинетика приобрела способность к решению разнообразных задач теории сложных реакций, образованных множеством связанных элементарных стадий. Применение метода графов, предложенного Б.Н. Гольдштейном в ранних работах, к анализу стационарных ферментативных реакций стало широко использоваться многими авторами, и изложено в ряде монографий [21, 43, 63-66].

Со временем Б.Н. Гольдштейн расширил и усовершенствовал теорию графов [60], достигнув результатов, получивших признание в мировой литературе по энзимологии [66].

Теория графов характеризуется геометрическим подходом к изучению систем. Граф – система линий, соединяющих заданные точки. Линии графа обычно называют ветвями, которые соединяют вершины графа. В графе можно изображать как прямолинейные, так и криволинейные ветви, произвольно располагая вершины на его плоскости. Если ветви графа пересекаются только в вершинах, такой граф называется плоским. Графы химических реакций обычно плоские.

В графическом представлении схема ферментативной реакции заменяется графом, вершинами которого являются ферментлигандные комплексы и свободный фермент, а ветвями – переходы из одного состояния в другое.

Путь графа – это непрерывная последовательность ветвей в каком-либо одном направлении, причем ни одна из вершин не должна встречаться более одного раза. Цикл – замкнутый путь, который начинается и оканчивается в



одной и той же вершине. Граф любой химической реакции является связным, так как каждую его вершину можно соединить с любой другой.

Каждой ветви графа соответствует определенное численное значение. В ферментативной кинетике – это константа скорости данного превращения для мономолекулярной реакции (например,  $k_2$ ) и произведение константы на соответствующую концентрацию для бимолекулярной реакции (например,  $k_1[S]$ ). Величина пути графа равна произведению величин всех ветвей этого пути.

Базовое дерево – это совокупность ветвей, направленных к вершине, выбранной в качестве базовой, и проходящих через все другие вершины графа. Величина базового дерева представляет собой произведение величин этих ветвей.

Базовый определитель графа находится путем суммирования величин всех базовых деревьев, направленных к данной базе. Используя основные свойства графов, можно существенно облегчить задачу. Так, учитывая, что параллельные ветви графа складываются, можно уменьшить число базовых деревьев, а используя свойство симметрии графа, можно сливать некоторые его ветви.

Общая формула для скорости стационарной ферментативной реакции записывается следующим образом:

$$v = \frac{\sum_r k_r D_r}{\sum_{j=1}^n D_j} [E], \quad (12)$$

где  $k_r$  – константа скорости стадии, приводящей к образованию продукта;

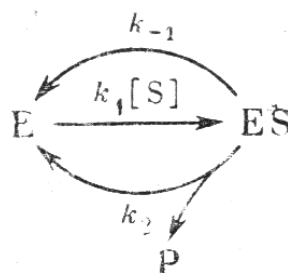
$D_r$  – базовый определитель состояния фермента, из которого образуется конечный продукт реакции;

$[E]_0$  – суммарная концентрация всех форм фермента;

$\sum_{j=1}^n D_j$  – сумма базовых определителей всех состояний фермента.

Таким образом, для нахождения скорости стационарной ферментативной реакции достаточно найти выражения для базовых определителей графа.

Представим простую схему двухстадийной ферментативной реакции в виде графа.



Продукт на графе обычно изображается касательной к ветви, из которой он образуется.

Согласно формуле (12) уравнение для скорости реакции будет иметь вид:

$$v = \frac{k_2 D_{ES} [E]_0}{D_E + D_{ES}},$$

где  $D_E = k_{-1} + k_2$  (так как параллельные ветви складываются),

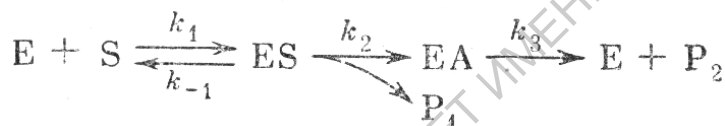
$D_{ES} = k_1 [S]$  (так как ES образуется в бимолекулярной реакции).

Подставляя значения базовых определителей в формулу для скорости, получим следующее выражение

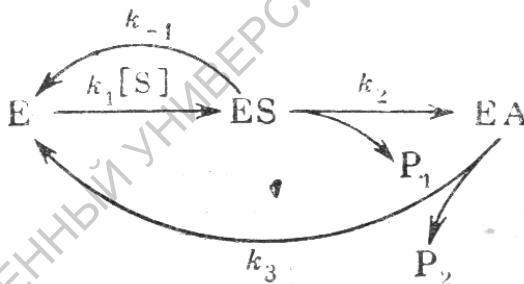
$$v = \frac{k_2 k_1 [S] [E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{k_{-1} + k_2 + [S]} = \frac{V [S]}{K_M + [S]}, \text{ которое}$$

совпадает с формулой (1), найденной классическим методом с помощью алгебраических уравнений.

Рассмотрим трехстадийную реакцию (протекающую в стационарном режиме)



Граф этой реакции будет иметь вид:



В графе три вершины, поэтому каждый из трех базовых определителей будет иметь величины базовых деревьев, равные произведениям из двух множителей (количество вершин без одной).

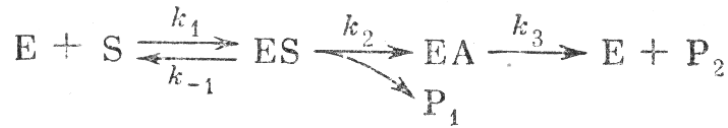
$$D_E = k_{-1} k_3 + k_2 k_3; D_{ES} = k_1 [S] k_3; D_{EA} = k_1 [S] k_2.$$

Скорость реакции (скорость образования продукта  $P_2$ ) согласно (12) будет иметь вид:

$$v = \frac{k_3 D_{EA} [E]_0}{D_E + D_{ES} + D_{EA}} = \frac{k_3 k_1 [S] k_2 [E]_0}{(k_{-1} + k_2) k_3 + k_1 [S] k_3 + k_1 [S] k_2} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M \left(1 + \frac{k_2}{k_3}\right) + [S]}$$

Видно, что получена формула (6).

Найдем с помощью метода графов выражение для скорости трехстадийной ферментативной реакции



протекающей в стационарном режиме в присутствии неконкурентного ингибитора. В данном случае ингибитор I взаимодействует независимо от субстрата S как со свободным ферментом E ( $E + I \leftrightarrow EI$ ), так и с фермент-субстратным комплексом ES ( $ES + I \leftrightarrow EIS$ ). Причем сродство ингибитора в обоих случаях одинаково ( $K_i = [E][I]/[EI] = [ES][I]/[EIS] = k_{-4}/k_4$ ). Тогда между ферментом и ингибитором устанавливается равновесие. Так идет, например, ингибирование ионами  $Cu^{++}$  реакции гидролиза сложно-эфирных субстратов, катализируемых  $\alpha$ -химотрипсином.

Скорость образования продукта  $P_2$  согласно формуле (12) в данном случае будет иметь вид

$$v = \frac{k_3 D_{EA} [E]}{D_E + D_{EI} + D_{ES} + D_{EA} + D_{EIS}},$$

где базовые определители имеют следующие значения:

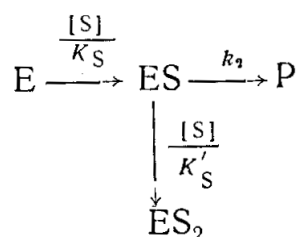
$$\begin{aligned} D_E &= k_{-4} k_{-1} k_{-4} k_3 + k_{-4} k_2 k_3 k_{-4}; \\ D_{EI} &= k_4 [I] k_3 k_{-1} k_{-4} + k_4 [I] k_{-4} k_2 k_3; \\ D_{ES} &= k_{-4} k_3 k_1 [S] k_{-4}; \\ D_{EA} &= k_{-4} k_1 [S] k_2 k_{-4}; \\ D_{EIS} &= k_{-4} k_3 k_1 [S] k_4 [I]. \end{aligned}$$

Подставляя найденные значения базовых определителей в формулу для скорости, получим

$$\begin{aligned} v &= \frac{k_3 k_1 k_2 k_{-4}^2 [S] [E]}{k_1 k_3 k_{-4}^2 \left( \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} + \frac{k_{-1} k_4}{k_1 k_{-4}} [I] + \frac{k_2 k_4}{k_1 k_{-4}} [I] + [S] + \frac{k_2}{k_3} [S] + \frac{k_4}{k_{-4}} [S] [I] \right)} = \\ &= \frac{k_2 [E] [S]}{K_M + K_M \frac{k_4}{k_{-4}} [I] + \left( 1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{k_4}{k_{-4}} [I] \right) [S]} = \\ &= \frac{k_2 / \left( 1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i} \right)}{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) / \left( 1 + \frac{k_2}{k_3} + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} [E] [S] = \frac{k_{кам}^i [E] [S]}{K_{M(каж)} + [S]} \end{aligned}$$



Диаграмма этого процесса, когда за вершину выбрана концентрация фермента  $E$ , а в качестве выхода –  $ES$ , имеет вид



Применение диаграммного метода согласно формуле (13) даёт следующее выражение для скорости ферментативной реакции, ингибированной субстратом:

$$v = \frac{k_2 M(E \rightarrow ES) [E]}{M(E \rightarrow E) + M(E \rightarrow ES) + M(E \rightarrow ES_2)}$$

Величины путей, ведущих от входа  $E$ , следующие:

$$M(E \rightarrow E) \equiv 1; \quad M(E \rightarrow ES) = [S]/K_S; \quad M(E \rightarrow ES_2) = ([S]/K_S) \cdot ([S]/K'_S).$$

Таким образом, скорость ингибированной субстратом двухстадийной реакции будет иметь вид:

$$v_0 = \frac{k_2 \frac{[S]}{K_S} [E]_0}{1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{[S]}{K_S} \frac{[S]}{K'_S}} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_S + [S] + \frac{[S]^2}{K'_S}} \quad (14)$$

Полученная зависимость не является частным случаем формул (2) или (3), то есть имеет место отклонение от кинетики Михаэлиса-Ментен, уравнения которой выражают гиперболическую зависимость скорости от концентрации субстрата. Проанализируем уравнение (14).

При низких концентрациях субстрата, когда  $[S]_0 \ll K_S'$ ,  $v_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_S + [S]}$ ,

то есть формула (14) превращается в (2), линеаризация которой в удобных координатах позволяет определить  $k_2$  и  $K_S$ .

При высоких концентрациях субстрата, когда  $[S]_0 \gg K_S$ ,  $v_0 = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{[S]}{K'_S}}$ .

Линеаризация этого уравнения в координатах  $(1/v_0; [S])$  даёт прямую  $\frac{1}{v_0} = \frac{1}{k_2 [E]_0} + \frac{[S]}{K'_S k_2 [E]_0}$ , которая отсекает на оси ординат отрезок  $1/(k_2 [E]_0)$ , а на оси абсцисс отрезок  $K_S' = -[S]$ .

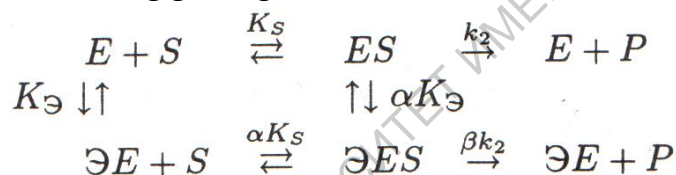
Видно, что при высоких концентрациях субстрата будет наблюдаться торможение субстратом и начальная скорость при увеличении концентрации субстрата должна проходить через максимум, а затем уменьшаться, что иногда и наблюдается в экспериментах.

Таким образом, предположение об образовании тройного комплекса  $ES_2$  может быть использовано для количественного объяснения экспериментальных результатов.

Торможение субстратов при его высоких концентрациях будет наблюдаться и тогда, когда комплекс  $ES_2$  распадается с образованием продукта, но со скоростью, меньшей, чем скорость распада комплекса  $ES$ .

### Влияние обратимого эффектора на кинетику двухстадийной ферментативной реакции

Используя диаграммный метод, найдем выражение для начальной скорости двухстадийной ферментативной реакции, протекающей в присутствии обратимого эффектора по схеме



Изменение стандартной свободной энергии в системе при равновесном переходе от  $E$  к  $\text{Э}ES$  не зависит от пути перехода, то есть  $\Delta F^0_{E \rightarrow ES} + \Delta F^0_{ES \rightarrow \text{Э}ES} = \Delta F^0_{E \rightarrow \text{Э}E} + \Delta F^0_{\text{Э}E \rightarrow \text{Э}ES}$ .

Так как  $-\Delta F^0 = RT \ln K_{\text{равн}}$ , а константы равновесия элементарных стадий согласно принципу микроскопической обратимости обратно пропорциональны константам субстрата и эффектора, то  $K_S \cdot \alpha K_{\text{Э}} = K_{\text{Э}} \cdot \alpha K_S$ . Таким образом, любые три константы однозначно определяют четвертую, которая не является, следовательно, независимой. Поэтому стадию  $ES \rightarrow \text{Э}ES$  можно исключить и представить данную схему в виде ациклической диаграммы с вершиной  $E$ , выбранной в качестве входа, и двумя выходами в точках  $ES$  и  $\text{Э}ES$ .

Отметим звездочкой (\*) величины, зависящие от концентрации эффектора  $[\text{Э}]$ , тогда скорость данного процесса согласно (13) будет иметь вид

$$v^* = \frac{k_2 M(E \rightarrow ES) + \beta k_2 M(E \rightarrow \text{Э}ES)}{M(E \rightarrow E) + M(E \rightarrow \text{Э}E) + M(E \rightarrow ES) + M(E \rightarrow \text{Э}ES)} [E]$$

Находя величины путей и подставляя их в данную формулу, получим

$$\begin{aligned}
 v^* &= \frac{(k_2 \frac{[S]}{K_s} + \beta k_2 \frac{[\mathcal{E}][S]}{K_{\mathcal{E}} \alpha K_s}) [E]_b}{1 + \frac{[\mathcal{E}]}{K_{\mathcal{E}}} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[\mathcal{E}][S]}{K_{\mathcal{E}} \alpha K_s}} = \frac{k_2 \frac{\alpha K_{\mathcal{E}} + \beta [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} [E]_b [S]}{\alpha K_s \frac{K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} + [S]} = \\
 &= \frac{k_{кат}^* [E]_b [S]}{K_{M(каж)}^* + [S]} = \frac{V^* [S]}{K_{M(каж)}^* + [S]}
 \end{aligned} \quad (15)$$

Максимальная скорость ферментативной реакции в присутствии эффектора в отличие от максимальной скорости реакции без эффектора ( $V = k_2 [E]_b$ ) равна

$$V^* = k_2 \frac{\alpha K_{\mathcal{E}} + \beta [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} [E]_b = V \frac{\alpha K_{\mathcal{E}} + \beta [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} \quad (16)$$

Кажущаяся константа Михаэлиса в этом случае равна

$$K_{M(каж)}^* = K_s \frac{\alpha K_{\mathcal{E}} + \alpha [\mathcal{E}]}{\alpha K_{\mathcal{E}} + [\mathcal{E}]} \quad (17)$$

В координатах Лайнуивера-Берка обратные скорости для реакции в присутствии эффектора и без него имеют вид:

$$\begin{aligned}
 \frac{1}{v^*} &= \frac{1}{V^*} + \frac{K_{M(каж)}^*}{V^*} \frac{1}{[S]_b} \\
 \frac{1}{v} &= \frac{1}{V} + \frac{K_s}{V} \frac{1}{[S]_b}
 \end{aligned}$$

Приравнивая ординаты прямых, можно найти значения абсциссы точки пересечения, которая с учётом (16) и (17) имеет вид

$$\frac{1}{[S]_b} = \frac{V - V^*}{K_s V^* - K_{M(каж)}^* V} = \frac{1 - \beta}{K_s (\beta - \alpha)} \quad (18)$$

Подставляя найденные значения в уравнения для обратной скорости, получим ординату точки пересечения

$$\frac{1}{v^*} = \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_s}{V} \frac{1 - \beta}{K_s (\beta - \alpha)} = \frac{1}{V} \frac{1 - \alpha}{\beta - \alpha} \quad (19)$$

Видно, что в выражения (18) и (19) не входят ни константы эффектора  $K_{\text{Э}}$ , ни концентрации эффектора  $[\text{Э}]$ . Координаты точки пересечения семейства прямых, соответствующих различным значениям эффектора, зависят лишь от  $\alpha$  и  $\beta$ , то есть существует однозначное соответствие между механизмом ферментативной реакции и положением точки пересечения прямых в координатах Лайнуивера-Берка.

В зависимости от численных значений множителей  $\alpha$  и  $\beta$  эффектор  $\text{Э}$  может выступать как в роли ингибитора, так и в роли активатора ферментативной реакции.

Рассмотрим некоторые частные случаи, имеющие особое значение, которые широко применяются для описания кинетики ферментативных реакций.

При  $\alpha \rightarrow \infty$ , когда тройной комплекс не образуется, значение  $\beta$  теряет смысл и может быть любым (например,  $\beta=1$ ). То есть будет иметь место полное конкурентное (ассоциативное) ингибирование. Скорость ферментативной реакции в этом случае будет согласно (15) определяться

выражением  $v^* = \frac{k_2[E][S]}{K_s(1+[\text{Э}]/K_{\text{Э}}) + [S]}$ , то есть максимальные скорости

реакций с участием эффектора (ингибитора) и без него равны ( $V^*=V$ ), а

$$K_{M(\text{каж})}^* = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) > K_s.$$

Тангенсы угла наклона прямых в присутствии эффектора с учетом значений  $K_M^*$  и  $V^*$  ((16) и (17)) равны

$$\text{tg} \alpha^* = \frac{K_M^*}{V^*} = \frac{K_s}{V} \frac{\alpha K_{\text{Э}} + \alpha [\text{Э}]}{\alpha K_{\text{Э}} + \beta [\text{Э}]} = \text{tg} \alpha \frac{\alpha K_{\text{Э}} + \alpha [\text{Э}]}{\alpha K_{\text{Э}} + \beta [\text{Э}]} \quad (20)$$

Видно, что прямые в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка для реакций с участием ингибитора расположены выше прямой без ингибитора, так как, согласно (20),  $\text{tg} \alpha^* = \text{tg} \alpha \cdot (1 + [I]/K_i) > \text{tg} \alpha$ . Они пересекаются на оси ординат, а отрезки на оси абсцисс равны соответственно  $-1/K_{M(\text{каж})}$  и  $-1/K_s$ .

При  $1 < \alpha < \infty$  и  $\beta=1$  будет иметь место неполное конкурентное (ассоциативное) ингибирование.

Если  $0 < \alpha < 1$  и  $\beta=1$ ,  $\text{tg} \alpha^* < \text{tg} \alpha$  и будет иметь место конкурентное (ассоциативное) активирование.

Когда  $\alpha=1$ , а  $\beta=0$  будет полное неконкурентное (каталитическое)

ингибирование, для которого согласно (15)  $v^* = \frac{k_2/(1+[I]/K_i)[E][S]}{K_s + [S]}$ , а



прямые пересекаются на оси абсцисс. В случае  $0 < \beta < 1$  неконкурентное ингибирование будет неполным, а в случае  $1 < \beta < \infty$  будет иметь место неконкурентная каталитическая активация.

При  $\alpha \neq 1$ ,  $\beta \neq 1$  и  $\alpha \neq \beta$  будет иметь место смешанное влияние обратимого эффектора на кинетику данной двухсторонней реакции. Особый интерес представляет случай, когда  $\alpha = \beta$ . Согласно формуле (20)  $\operatorname{tg} \alpha^* = \operatorname{tg} \alpha = \operatorname{const}$ , следовательно, прямые в координатах Лайнуивера-Берка будут параллельны. Будет иметь место бесконкурентное (двухпараметрически рассогласованное) ингибирование при  $\alpha = \beta < 1$  и сопрягающее бесконкурентное ускорение при  $\alpha = \beta > 1$ , так как согласно (16), в первом случае  $1/v^* > 1/v$ , а во втором -  $1/v^* < 1/v$ .

Другие смешанные типы ингибирования и активации будут наблюдаться, когда  $\alpha \neq \beta$  при  $\alpha \neq 1$  и  $\beta \neq 1$ .

Используя формулы (15)-(20) можно проанализировать все варианты и представить графический анализ в координатах Лайнуивера-Берка [70-72].

Следует отметить, что существуют и другие методы выявления различных типов ферментативных реакций [39, 73].

Так В.И. Крупянко [39] предлагает векторный метод представления кинетики ферментативных реакций, который отличается наглядностью даже в самых сложных случаях ферментативных превращений. Суть метода заключается в том, что в трехмерной системе координат, включающей кажущиеся значения констант Михаэлиса, максимальные скорости и концентрации ингибитора (или активатора), каждая ингибируемая (или активируемая) ферментативная реакция получает строго определенное представление – конкретный трехмерный вектор. Длина вектора, его положение в системе координат, направление поворота и другие характеристики определяют эффективность ингибирования (или активации), тип эффективности действия и изменения в механизме реакции. Учёт симметричной противоположности положения векторов активируемых реакций соответствующими векторами ингибируемых реакций позволил по-новому подойти к классификации типов ферментативных процессов, выявить наличие взаимосвязи между отдельными из них и предложить единую "параметрическую" классификацию ферментативных реакций, насчитывающую 15 различных типов, чего не может предложить ни одна из других известных классификаций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферменты играют исключительно важную роль во всех процессах жизнедеятельности, направляя и регулируя обмен веществ. Поэтому любое нарушение действия ферментов может повлечь за собой серьезные последствия для живого организма. В связи с этим особое значение приобретает знание факторов, провоцирующих не только изменение каталитической активности ферментов, «отравляющих» их, но и нарушающих их способность к взаимодействию с другими внутриклеточными партнерами реакции, нарушающих способность к регуляции. При изучении активности фермента в пробирке (*in vitro*) не всегда удастся выявить такие отклонения, так как они могут проявляться только внутри клетки в организме (*in vivo*).

Поэтому можно сказать, что перспектива дальнейшего развития энзимологии связана с поиском путей исследования поведения ферментов в целой клетке.

В настоящее время задача определения активности ферментов непосредственно в клетках организма является исключительно сложной. В очень редких случаях можно приблизительно судить об уровне внутриклеточной активности ферментов, определяя, например, в сыворотке крови, продукты их деятельности. Иногда для этой цели используется изотопный метод.

Хорошо разработана техника выявления какого-либо фермента в клетке иммунными методами. Для этого предварительно получают высокоспецифичные антитела (принцип образования комплекса антиген-антитело).

Судить о наличии в клетке определенного фермента можно также по нуклеотидной последовательности молекул нуклеиновых кислот, характерной для данного фермента.

Были попытки проследить функции отдельных ферментов, получая линии мышей, у которых отсутствует какой-либо фермент. И очень часто никаких изменений у организмов выявить не удавалось. Может быть клетки могут включать дублирующие механизмы, позволяющие компенсировать отсутствие данного фермента? А может быть неизвестно, где эти отклонения искать и какова форма их проявлений и время?

Исследования, проведенные в начале XXI века, свидетельствуют о том, что ферменты *in vivo* образуют структурные комплексы и ансамбли как друг с другом, так и с участниками клеточных и внутриклеточных мембран. Их функциональное значение пока не ясно. Однако существует предположение, что образование таких комплексов регулирует активность ферментов.

К настоящему времени полностью определена трехмерная пространственная структура многих ферментов, изучены кинетические

характеристики и механизмы их действия. Но до полного понимания внутриклеточных механизмов регуляции действия ферментов еще далеко.

Нет ясного и четкого ответа даже на вопрос о субстратной специфичности фермента в клетке и пробирке, совпадают они или нет? Ведь выделенные из клетки индивидуальные белки или их комплексы могут оказаться либо результатом распада естественного комплекса, либо – нехарактерного объединения изначально изолированных ферментов.

Применение метода сайт-специфического мутагенеза (строго заданных единичных замен в нуклеотидных последовательностях белков) показало, что многие мутации для функционирования белков незначительны. В то же время иногда замена всего лишь одной аминокислоты меняет функцию белка коренным образом.

Путем сайт-специфического мутагенеза иногда удается повысить устойчивость некоторых агентов. Стабильность ферментов можно повысить в сотни и тысячи раз в результате иммобилизации ферментов (присоединении их к матрице носителя). Способы иммобилизации подбираются так, чтобы сохранить активность фермента или изменить её в нужном направлении. Путем иммобилизации можно менять не только стабильность и активность ферментов, но и субстратную специфичность, сродство к субстрату, повысить устойчивость ферментов к действию высокой температуры и изменениям рН (менять оптимальные значения температуры и рН), получать чистые продукты, а ферменты использовать вторично. Изучение иммобилизованных ферментов прояснило многие детали ферментативного катализа и открыло дорогу принципиально новым подходам в исследовании ферментов. В таких системах фермент работает на границе раздела фаз, внутри так называемых «обращенных» мицелл [74, 75]. Однако пока нет полной уверенности в том, что предлагаемые модельные системы адекватны живой клетке. По крайней мере, некоторый пессимизм по поводу того, что в энзимологии скоро будет нечего делать, абсолютно не оправдан. Думается самое интересное еще впереди.

## ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

Активный центр – часть молекулы фермента, ответственной за присоединение и превращение субстрата.

Амидазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие расщепление связи между углеродом и азотом в веществах типа кислотных амидов с образованием молекулы аммиака.

Амилазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз резервных полисахаридов (крахмала, гликогена).

Анаболизм – совокупность процессов в живых организмах, направленных на обновление частей клеток и тканей.

Апофермент – белковый компонент сложных ферментов. Определяет специфичность действия фермента по отношению к субстрату, а также возможность регуляции каталитической активности, которая проявляется, однако, при соединении апофермента с коферментом.

Биогенные элементы – химические элементы, постоянно входящие в состав организмов и необходимые им для жизнедеятельности (H, C, O, N, P, S др.).

Биосинтез – образование органических веществ из более простых соединений, происходящее в живых организмах под действием ферментов.

Витамины – низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, выполняющие различные биологические функции в живых организмах.

Гидролазы – класс ферментов, катализирующих реакции гидролиза, то есть расщепления органических соединений с присоединением по месту разрыва элементов молекулы воды ( $H^+$  и  $OH^-$ ).

Гомеостаз – способность биологических систем противостоять изменениям и сохранять динамически относительное постоянство состава и свойств.

Гормоны – биологически активные вещества, выделяемые железами внутренней секреции или скоплениями специализированных клеток организма, и оказывающие целенаправленное действие на другие органы и ткани.

Дегидрогеназы – ферменты класса оксидоредуктаз, катализирующие реакции отщепления водорода от одного субстрата и переносящие его на другой.

Изомеразы – класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные реакции перестройки органических соединений, в том числе взаимопревращения изомеров.

Изоферменты (изоэнзимы) – каталитически сходные множественные формы определенного фермента у организмов одного и того же вида, отличающиеся по своим физико-химическим и иммунологическим свойствам.

Иммобилизованные ферменты – искусственно полученные препараты ферментов, молекулы которых ковалентно связаны с полимерным носителем, в результате чего повышается их устойчивость к денатурирующим воздействиям.

Ингибиторы – вещества различной химической природы, подавляющие каталитическую активность отдельных ферментов или ферментных систем.

Индукцируемые ферменты, адаптивные ферменты – ферменты, скорость синтеза которых изменяется в зависимости от условий существования организма. Регуляция синтеза происходит на генетическом уровне под действием индукторов (активаторов), которыми могут быть соответствующие субстраты и метаболиты, а также гормоны.

Катаболизм, диссимиляция – совокупность ферментативных реакций в живом организме, направленных на расщепление сложных органических веществ – белков, нуклеиновых кислот, жиров, углеводов, поступающих с пищей или запасенных в самом организме (жиры, крахмал, гликоген). Катаболические процессы (клеточное дыхание, гликолиз, брожение) занимают центральное место в обмене веществ.

Киназы, фосфотрансферазы – ферменты класса трансфераз, катализирующие реакции переноса фосфорильного остатка ( $-PO_3H_2$ ) от АТФ на различные субстраты.

Коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу коллагеновых волокон соединительной ткани.

Комплементарность – пространственная взаимодополняемость поверхности взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию Ван-дер-Ваальсовых, водородных и ионных связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью и большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ-замок» (комплексы антиген-антитело и фермент-субстрат, четвертичная структура белков и третичная структура нуклеиновых кислот). Комплементарность лежит в основе многих явлений биологической специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне – ферментативного катализа, самосборки биологических структур, молекулярных механизмов иммунитета и др.

Константа Михаэлиса – один из кинетических параметров ферментативной реакции. Численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной. Является функцией нескольких констант скорости; в некоторых случаях характеризует сродство фермента к субстрату.

Конститутивные ферменты – ферменты, которые синтезируются организмом постоянно, независимо от условий существования или наличия соответствующих субстратов.

Коферменты (коэнзимы) – органические соединения небелковой природы, входящие в состав активного центра некоторых ферментов. Соединяясь с апоферментом, коферменты образуют каталитический активный комплекс, так называемый, холофермент. Многие коферменты легко отделяются от белковой молекулы и служат переносчиками отдельных атомов или групп атомов, отделяемых ферментов от субстрата. Прочно связанные с белком коферменты называются простетической группой. Большинство коферментов – производные витаминов.

Лактаза – фермент, гидролизующий лактозу с образованием глюкозы и галактозы.

Лиазы – класс ферментов, катализирующих реакции негидролитического отщепления от субстратов определенных групп атомов с образованием двойных связей, а также реакции присоединения атомов и групп атомов по двойным связям. В зависимости от атомов, между которыми происходит образование или разрыв двойной связи, лиазы делят на подклассы.

Лигазы, синтетазы – класс ферментов, катализирующих реакции присоединения друг к другу двух различных молекул за счёт энергии сопряженной реакции гидролиза, чаще всего АТФ. В зависимости от характера образующейся связи (С-О, С-S, С-N и С-С-связи) лигазы делят на подклассы.

Липазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз сложноэфирных связей в триглицеридах с образованием жирной кислоты и глицерина.

Липиды – жироподобные вещества, входящие в состав всех живых клеток и играющие важную роль в жизненных процессах (влияют на проницаемость клеток, активность многих ферментов, участвуют в передаче нервного импульса, мышечном сокращении и т.д.).

Липопротеиды – комплексы белков и липидов. Составляют структурную основу всех биологических мембран. В свободном состоянии присутствуют в плазме крови и лимфе.

Метаболизм – обмен веществ. В более узком смысле метаболизм – это промежуточный обмен, охватывающий всю совокупность реакций, главным образом ферментативных, протекающих в клетках и обеспечивающих как расщепление сложных соединений, так и их синтез и взаимопревращение.

Метаболический путь – определенная последовательность ферментативных превращений какого-либо вещества в клетке.

Метаболиты – промежуточные продукты, образующиеся в ходе метаболических процессов, то есть промежуточные продукты метаболических путей.

Метилтрансферазы (трансметилазы) – ферменты класса трансфераз, катализирующие обратимые реакции переноса метильных групп.

Микроэлементы – химические элементы, содержащиеся в организмах в низких концентрациях (обычно тысячные доли процента и меньше) и необходимые для их нормальной жизнедеятельности. Это, например, металлы (Fe, Cu, Mg, Zn, Mo, Co и др.) и неметаллы (I, Br, F, B, Se и др.).

Нуклеазы – ферменты класса гидролаз, катализирующие реакции расщепления фосфодиэфирных связей в полинуклеотидной цепи нуклеиновых кислот с образованием моно- и олигонуклеотидов.

Органотропность – свойство физического, химического или биологического фактора избирательно воздействовать на определенный орган.

Плазма – жидкая или гелеобразная часть биологических структур: крови, лимфы, клеток (цитоплазма) и др.

Рацемазы – ферменты класса изомераз, катализирующие обратимые реакции превращения стереоизомеров, имеющих один асимметричный атом углерода.

Репарация (восстановление) – свойственный клеткам всех организмов процесс восстановления природной (нативной) структуры ДНК, поврежденной при нормальном синтезе ДНК в клетке (а также физическими или химическими агентами). Репарация осуществляется специальными ферментными системами клетки.

Репликация (повторение) – процесс самовоспроизведения макромолекул нуклеиновых кислот (обеспечивающий точное копирование генетической информации), в основе которого лежит ферментативный синтез ДНК на матрице ДНК (или РНК на матрице РНК).

Транскрипция (переписывание) – биосинтез молекул РНК на соответствующих участках ДНК. Транскрипция осуществляется ферментом ДНК зависимой РНК-полимеразой, ферментом который «узнаёт» знак начала транскрипции, присоединяется к нему, расплетает двойную спираль ДНК и копирует, начиная с этого места, одну из её цепей.

Трансляция (передача) – синтез полипептидных цепей белков по матрице информационной РНК.

Транспорт веществ – в живых организмах включает доставку необходимых соединений к определенным органам и тканям с помощью кровеносной системы, всасывание их клетками и передвижение внутри клеток, а также выведение продуктов обмена веществ.

Трансферазы – класс ферментов, катализирующих обратимый перенос различных групп атомов от молекул одних органических соединений (доноров) к другим (акцепторам).

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1. Получить формулу (2) классическим методом.
2. Используя таблицу 2 представить на графиках линейные трансформации основного уравнения ферментативной кинетики в координатах  $(1/v; 1/[S])$ ,  $([S]/v; [S])$ ,  $(v; v/[S])$ .
3. Найти численные значения кинетических параметров ( $k_{\text{кат}}$  и  $K_{\text{M(каж)}}$ ) гидролиза метилового эфира N-бензоил-L-аминомасляной кислоты, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином, исходя из следующих данных:

$[S]_0 \cdot 10^3, \text{ M}$	2,24 2,24	1,43 1,49	1,12 1,12	0,90 0,90	0,75 0,75
$v_0 \cdot 10^7, \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$	4,25 4,31	3,52 3,60	3,10 3,12	2,71 2,77	2,45 2,40

Условия опыта pH=7,8; 25°C; ионная сила 0,1 M (KCl);  $[E]_0 = 2,16 \cdot 10^{-6}$  M.

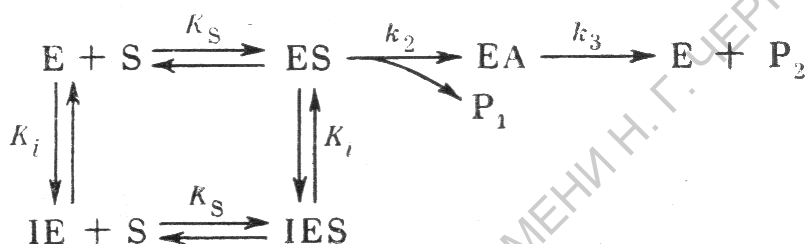
Ответы проанализировать, сделать проверку, найти максимальную скорость процесса.

4. Представить графические зависимости обратных начальных скоростей от обратных начальных концентраций субстрата для случаев конкурентного и неконкурентного влияния ингибитора на двухстадийную ферментативную реакцию, а также для случаев активации.
5. Определить тип ингибирования и найти константу ингибитора  $K_i$ , исходя из следующих данных:

$[I] \cdot 10^5, \text{ M}$	$[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$	$v$ , усл. ед.
0	10,00	5,55
	2,50	4,45
	0,91	2,94
	0,50	2,09
0,5	10,00	4,14
	2,50	3,78
	0,91	2,56
	0,50	1,79
1,0	10,00	4,00
	2,50	3,18
	0,91	2,16
	0,50	1,49
2,0	10,00	2,86
	2,50	2,28
	0,91	1,52
	0,50	1,06
3,0	10,00	2,38
	2,50	1,85
	0,91	1,24
	0,50	0,87



6. Представить графики зависимости обратных скоростей двухстадийных ферментативных реакций от концентрации ингибитора в координатах Диксона ( $1/v_i$ ;  $[I]$ ) для различных случаев действия ингибитора (полного конкурентного и полного неконкурентного).
7. Используя классический метод определения скоростей ферментативных реакций (метод алгебраических уравнений), получить для трехстадийных ферментативных реакций формулы (7), (9), (11).
8. Получить, используя метод графов (метод определителей), формулы для скоростей трехстадийных ферментативных реакций (6), (8), (10).
9. Ингибирование ионами  $\text{Cu}^{++}$  реакции гидролиза сложных эфирных субстратов, катализируемых  $\alpha$ -химотрипсином, происходит согласно схеме

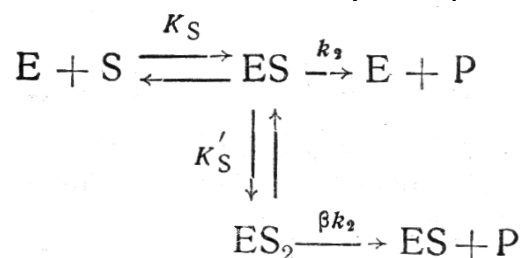


Определить значения индивидуальных констант ( $k_2$  и  $k_3$ ), исходя из следующих экспериментальных данных:

$[\text{Cu}^{++}] \cdot 10^4, \text{M}$	$K_{\text{кат}}, \text{c}^{-1}$	$K_{\text{M(каж)}} \cdot 10^5, \text{M}$
0	86	3,7
1,0	69	3,6
2,0	56	4,8
3,0	46	6,0
5,0	34	6,4
8,0	26	7,7

Условия опыта:  $\text{pH}=6,0$ ;  $25^\circ\text{C}$ ; ионная сила  $0,1 \text{ M}$  ( $\text{KCl}$ );  $[\text{E}]_0=10^{-7} \text{ M}$ .

10. Как изменится формула (14), если тройной комплекс  $\text{ES}_2$  будет распадаться, выделяя  $\text{P}$ , с константой скорости  $\beta k_2$  при  $\beta < 1$ .



Получить формулу для скорости, используя диаграммный метод.

11. Используя диаграммный метод, получить выражение для скорости ферментативной реакции, когда ингибитор реагирует только с фермент-субстратным комплексом (бесконкурентное ингибирование).
12. Используя диаграммный метод, получить формулу для скорости ферментативной реакции, когда ингибитор реагирует с ферментом с

константой  $K_i$ , а с фермент-субстратным комплексом – с константой  $K_i'$  (так называемое, смешанное ингибирование). Сравнить полученную формулу с формулой (5). Найти в обоих случаях тангенсы угла наклона прямых.

13. Какой тип влияния эффектора будет наблюдаться для случая, когда  $\alpha < 1$ , а  $\beta > 1$ . Изобразить график прямых в обратных координатах Лайнуивера-Берка для случаев, когда  $[\text{Э}] = 0$  и  $[\text{Э}] \neq 0$ . Рассмотреть случаи, когда  $\alpha$  уменьшается при  $\beta = \text{const}$  и  $\beta$  растет при  $\alpha = \text{const}$ .
14. Какой тип влияния эффектора будет наблюдаться при  $\alpha > 1$ , а  $\beta < 1$ . Представить графический анализ в координатах Лайнуивера-Берка. Рассмотреть предельные случаи.
15. Изобразить графики зависимости скоростей от концентрации субстрата для различных типов ингибирования: конкурентного, неконкурентного, бесконкурентного и смешанного.
16. Изобразить в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка прямые для различных типов ингибирования: конкурентного, неконкурентного, бесконкурентного и смешанного.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю.А. Строение и функции белков / Ю.А. Овчинников, А.Н. Шамин. М.: Педагогика, 1983. 128 с.
2. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. №7. С. 10-19.
3. Шамин А.Н. Биокатализ и биокатализаторы. М.: Наука, 1971. 194 с.
4. Реннеберг Р. Эликсиры жизни: Новейшие результаты в области исследования ферментов. Пер. с нем. М.: Мир, 1987. 152 с.
5. Резенгарт В.И. Ферменты – двигатели жизни. Л.: Наука, 1983. 160 с.
6. Коровкин Б.Ф. Проблемы современной энзимодиагностики // Вестник АМН СССР. 1985. №1. С. 12-22.
7. Осинкин А.А. Жизнь и деятельность академика К.Кирхгофа / труды Ин-та истории естествознания и техники АН СССР. История химических наук. М.: АН СССР. 1960. Т. 30. С. 252-287.
8. Шамин А.Н. Основные этапы развития учения о ферментах: В кн.: Развитие представления в области кинетики, катализа и реакционной способности. Под ред. Я.Т. Эйдуса. М.: Наука, 1966. С. 164-180.
9. Чернов Н.Н. Ферменты в клетке и пробирке // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. №5. С. 28-34.
10. Лагнадо Дж. Первым биохимиком была женщина? // Биохимия. 1994. Т. 59, вып. 1. С. 142-144.
11. Ферменты / Под ред. А.Е. Браунштейна. М.: Наука, 1964. 314 с.
12. Классификация и номенклатура ферментов. М.: ИЛ, 1962. 199 с.
13. Номенклатура ферментов. М.: ВИНТИ, 1979. 321 с.
14. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб. М.: Мир, 1966. 814 с.
15. Ашмор П. Катализ и ингибирование химических реакций. М.: Мир, 1966. 508 с.
16. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1965. 248 с.
17. Березин И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клёсов. М.: Изд-во МГУ, 1976. 320 с.
18. Клёсов А.А. Ферментативный катализ. Ч. 1 / А.А. Клёсов, И.В. Березин. М.: Изд-во МГУ, 1980. 264 с.
19. Клёсов А.А. Ферментативный катализ. Ч. 2. М.: Изд-во МГУ, 1984. 264 с.
20. Березин И.В. Основы физической химии ферментативного катализа / И.В. Березин, К. Мартинек. М.: ВШ, 1977. 280 с.
21. Волькенштейн М.В. Физика ферментов. М.: Наука, 1967. 200 с.
22. Уолтер Ч. Кинетика ферментативных реакций. М.: Мир, 1969. 128 с.
23. Березин И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии. М.: Наука, 1990. 384 с.
24. Хайдеров А. Развитие отечественной энзимологии. Душанбе: Дониш, 1990. 156 с.

25. Кошланд Д. Катализ в живой природе и в пробирке. В кн: Горизонты биохимии. Под ред. М.М. Колеса. М.: Мир, 1964. С. 202-217.
26. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974. 256 с.
27. Гребенщиков Ю.Б. Исследование активного центра миозина методом парамагнитных меток / Ю.Б. Гребенщиков, Г.Г. Чарвиани, И.И. Чачечиладзе [и др.] // Биофизика. 1971. Т. 16, №5. С. 794-800.
28. Jencks W.P. The mechanism of enzyme action. In: Current aspects of biochemical energetic. N.Y.: Acad. Press, 1966. P. 273-300.
29. Eyring H., Limpy R., Spikes I.D. The mechanism of enzyme action. N.Y.: Hopkins Press, 1954. 540 p.
30. Волькенштейн М.В. Молекулярная биология. М.: Наука, 1964. 350 с.
31. Karush F. Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin // J. Amer. Chem. Soc. 1950. Vol. 72, №6. P. 2705-2713.
32. Kim Y.D., Lumry R. Studies of the chymotrypsinogen family XII "A" type substates of  $\alpha$ -chymotrypsin at neutral and alkaline pH values // J. Amer. Chem. Soc. 1971. Vol. 93, №3. P. 1003-1013.
33. Попов Е.М. Теоретическое изучение фермент-субстратных взаимодействий // Молекулярная биология. 1977. Т. 11, №1. С.5-41.
34. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М.: Мир, 1966. 864 с.
35. Варфоломеев С.Д. Кинетические методы в биохимических исследованиях / С.Д. Варфоломеев, С.В. Зайцев. М.: Изд-во МГУ, 1982. 345 с.
36. Химическая и биологическая кинетика. Под ред. Н.М. Эмануэля. М.: Изд-во МГУ, 1983. 296 с.
37. Березин И.В. Биокинетика / И.В. Березин, С.Д. Варфоломеев. М.: Наука, 1979. С. 4-62.
38. Киперман С.Л. От кинетической модели – к механизму каталитических процессов. В кн.: Механизм катализа. Ч. 1. Природа каталитического действия. Новосибирск: Наука, 1984. С. 156-174.
39. Крупянко В.И. Векторный метод представления ферментативных реакций. М.: Наука, 1990. 144 с.
40. Фёрш Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. 432 с.
41. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 350 с.
42. Gutfreund H. An introduction to – the steady of enzymes. Oxford, 1965. P. 86.
43. Segel I.H. Enzyme kinetics. N.Y.: Wiley, 1975. 957 p.
44. Крупянко В.И. Система координат, удобная для анализа взаимосвязей между отдельными типами активации и ингибирования ферментов // Прикладная биохимия и микробиологии. 1986. Т. 22, вып. 33. С. 440-446.
45. Крупянко В.И. Метод  $K_M, V$  – система координат в ферментативной кинетике. Пушино: ОНТИ НИБИ, 1987. 117 с.
46. Березин И.В. Иммуобилизованные ферменты. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. 220 с.

47. Березин И.В. Биотехнологии / И.В. Березин, Н.Л. Клячко. М.: Высш. Шк., 1982. 170 с.
48. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984. 261 с.
49. Платэ Н.А. Физиологически активные полимеры / Н.А. Платэ, А.Е. Васильев. М.: Химия, 1986. 296 с.
50. Иммобилизированные клетки и биотехнологии. Сб. науч. тр. Пущино. 1987. 175 с.
51. Иммобилизированные клетки и ферменты. Под ред. Дж. Вудворда. Пер. с англ. под ред. И.В. Березина. М.: Мир, 1988. 216 с.
52. Кудаева И.В. Изменение уровня ферментов печени в ходе динамического обследования лиц, экспонированных винилхлоридом / И.В. Кудаева, Л.А. Бударина, О.А. Дьякович // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2015. Т. 25, №4. С. 46-52.
53. Кугаевская Е.В. Ангиотензин превращающий фермент и болезнь Альцгеймера // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59, вып. 1. С. 5-24.
54. Логунова Е.В. Использование ферментов с целью повышения эффективности антимикробной фотодинамической терапии больных хроническим тонзиллитом / Е.В. Логунова [и др.] // Вестник оториноларингологии. 2016. Т. 81, №2. С. 44-48.
55. Гомазков О.А. Ферменты эпигенеза как терапевтические мишени заболеваний мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, №11. С. 35-44.
56. Зуева М.В. Изменение функции нейронов сетчатки и глиальных клеток Мюллера у больных сахарным диабетом 2-го типа при лечении диабетической ретинопатии ингибитором ангиотензинпревращающего фермента / М.В. Зуева [и др.] // Вестник офтальмологии. 2013. Т. 129, №3. С. 44-47.
57. Сеницына Р.В. Основы кинетики биохимических процессов [Электронный ресурс] // Р.В. Сеницына. Саратов: [б. и], 2014. 42 с. Б. ц. <http://library.sgu.ru> ID-837
58. Волькенштейн М.В. Применение теории графов к расчету сложных реакций / М.В. Волькенштейн, Б.Н. Гольдштейн // Докл. АН СССР. 1966. Т. 170. С. 963-965.
59. Волькенштейн М.В. Новый метод решения задач стационарной кинетики ферментативных реакций / М.В. Волькенштейн, Б.Н. Гольдштейн // Биохимия. 1966. Т. 31. С. 541-548.
60. Гольдштейн Б.Н. Кинетические графы в энзимологии. М.: Наука, 1989. 166 с.
61. Тёмкин М.И. Кинетика стационарных реакций // Докл. АН СССР. 1963. Т. 152. С. 156-159.
62. Тёмкин М.И. Кинетика гетерогенных каталитических реакций // Ж ВХО им. Д.И. Менделеева. 1975. Т. 20. С. 7-14.

63. Cornich-Bowden A. Cooperativity in monomeric enzymes / A. Cornich-Bowden, M.L. Cardenas // J. Theor. Biol. 1987. Vol. 124. P. 1-23.
64. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975. 616 с.
65. Wong J.T.-F. Kinetics of enzyme mechanisms. L.: Acad. press, 1975. 294 p.
66. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с.
67. Волькенштейн М.В. Диаграммный метод решения задач стационарной ферментативной кинетики / М.В. Волькенштейн, Ю.Б. Магаршак // Биофизика. 1970. Т. 15. С. 777-784.
68. Волькенштейн М.В. Применение диаграммного метода решения кинетических уравнений к циклическим ферментативным реакциям / М.В. Волькенштейн, Ю.Б. Магаршак // Биофизика. 1970. Т. 15. С. 949-958.
69. Волькенштейн М.В. Преобразование диаграммы стационарных ферментативных реакций / М.В. Волькенштейн, Ю.Б. Магаршак, В.Е. Стефанов // Биофизика. 1972. Т. 17. С. 379-388.
70. Сеницына Р.В. Применение диаграммного метода для вычисления скорости сложного процесса с целью выяснения и анализа частных случаев / Р.В. Сеницына, Н.А. Худомясова, О.А. Черкасова // Актуальные вопросы научных исследований: Межвуз. сб. научн. трудов. Саратов: Изд.-во СПИ, 2001. Вып. 4, часть 2. С. 89-96.
71. Сеницына Р.В. Анализ смешанного влияния обратимого эффектора на кинетику двухстадийных процессов / Р.В. Сеницына, О.А. Черкасова // Вопросы прикладной физики. 2004. Вып. 11. С. 228-233.
72. Сеницына Р.В. Расчет скоростей возмущенных двухстадийных процессов с использованием графов / Р.В. Сеницына, О.А. Черкасова // Радиофизика. 2005. №4. С. 91-95.
73. Крупяно В.И. Метод  $K_M'V'$  – система координат в ферментативной кинетике. Пушино: Научный центр биологических исследований АН СССР в Пушине, 1987. 118 с.
74. Клячко Н.Л. Димеризация рекомбинантной пероксидазы в системе обращенных мицелл / Н.Л. Клячко, Ю.К. Дулькис. // Биохимия. 1997. Т. 62, вып. 10. С. 1319-1326.
75. Клячко Н.Л. Формиатдегидрогеназа в системе обращенных мицелл / Н.Л. Клячко, В.Н. Гладышева. // Биохимия. 1997. Т. 62, вып. 12. С. 1683-1687.

## Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ	2
Глава 1. ФЕРМЕНТЫ	5
Общая характеристика	5
Особенности ферментов	6
Строение ферментов	8
Основные этапы развития энзимологии	8
Классификация ферментов	12
Механизм действия ферментов	13
Факторы, определяющие активность ферментов	19
Использование ферментов	21
Глава 2. НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ	24
Основная формула ферментативной кинетики и методы её линейной трансформации	24
Конкурентное ингибирование	26
Неконкурентное ингибирование	28
Трехстадийные ферментативные реакции	30
Нахождение скоростей стационарных ферментативных реакций методом графов	31
Нахождение скоростей стационарных ферментативных реакций, включающих равновесные стадии	36
Влияние обратимого эффектора на кинетику двухстадийной ферментативной реакции	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ	44
ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ	48
ЛИТЕРАТУРА	51