



О. В. КОЖЕВНИКОВА, Е. В. ШИЛЯЕВА

КИНЕТИКА И ТЕРМОДИНАМИКА БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Ижевск
2023

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
Институт естественных наук
Кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии

О.В. Кожевникова, Е.В. Шиляева

Кинетика и термодинамика биоспецифических
взаимодействий

Учебно-методическое пособие



Ижевск
2023

УДК 577.31(075.8)
ББК 28.071я73
К583

Рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом УдГУ

Рецензент: канд. биол. наук, доцент Стерлитамакского филиала ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий» С.Н. Садыкова

Кожевникова О.В., Шиляева Е.В.

К583 Кинетика и термодинамика биоспецифических взаимодействий : учеб.-метод. пособие : [Электрон. ресурс]. – Ижевск : Удмуртский университет, 2023. – 130 с.

Учебно-методическое пособие соответствует разделам дисциплин: энзимология, кинетика и термодинамика ферментативных реакций, кинетика макромолекулярных взаимодействий с основами термодинамики, химии и биохимии белка, биоспецифические взаимодействия в иммунологии, энзимологии, эндокринологии.

Рассматривается кинетика и термодинамика взаимодействий фермент-субстрат, антиген-антитело, фармакокинетика. Описаны примеры нахождения кинетических и термодинамических параметров. Решая типовые задачи, отвечая на вопросы, студент приобретает повышенный уровень компетенций, связанных с теорией биоспецифических взаимодействий, методологией планирования эксперимента и обработки экспериментальных данных.

Пособие предназначено для студентов 3–4 курсов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (специализация биохимия), и для студентов 3 курса по направлению подготовки «Биотехнология».

УДК 577.31(075.8)
ББК 28.071я73

© О.В. Кожевникова., Е.В. Шиляева, 2023
© ФГБОУ ВО «Удмуртский
государственный университет», 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	7
Список условных обозначений	9
Раздел 1. Элементарная математика для биологов	11
1.1. Элементарные арифметические действия	11
1.2. Операции с дробями	12
1.3. Линейная функция	14
1.4. Некоторые свойства степеней и логарифмов	17
Раздел 2. Кинетика и термодинамика ферментативных реакций	19
Глава 2.1. Введение в химическую кинетику	19
2.1.1. Кинетический эксперимент	19
2.1.2. История химической кинетики	19
2.1.3. Современные представления о механизме химической реакции	20
2.1.4. Параметры кинетического эксперимента	21
А. Скорость химической реакции	21
В. Порядок реакции и константа скорости	24
С. Определение кинетических параметров по экспериментальным данным	26
Глава 2.2. От чего зависит скорость реакции?	31
2.2.1. Влияние природы вещества	31
2.2.2. Влияние агрегатного состояния реагентов	34
2.2.3. Влияние концентрации	35
2.2.4. Влияние давления и объема	35
2.2.5. Влияние температуры	36
2.2.6. Влияние pH	36
2.2.7. Катализаторы и ингибиторы	37
Глава 2.3. Ферментативный катализ	41
2.3.1. Второй закон термодинамики в живых клетках	41
2.3.2. Как ферменты ускоряют реакции?	43
2.3.3. Термодинамика ферментативных реакций	45
2.3.4. Как клетки могут осуществлять энергетически неблагоприятные реакции?	48
Глава 2.4. Кинетика ферментативных реакций. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости	51
2.4.1. Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен	51
2.4.2. Природа константы K в уравнении Михаэлиса-Ментен	52

2.4.3. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости.....	55
Глава 2.5. Влияние обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции	58
2.5.1. Механизмы влияния.....	58
2.5.2. Кинетика ферментативных реакций, протекающих с участием эффектора.....	60
2.5.2.1. Вид зависимости и смысл параметров ингибирования.....	60
2.5.2.2. Полное конкурентное ингибирование ($\alpha \rightarrow \infty$, β не имеет определенного смысла). Алгоритм определения параметров реакции	61
и типа ингибирования	61
2.5.2.3. Полное неконкурентное ингибирование ($\alpha=1$, $\beta=0$).....	64
2.5.2.4. Бесконкурентное ингибирование ($\alpha=\beta<1$).....	65
Глава 2.6. Факторы, влияющие на ферментативную активность. Влияние pH и температуры на кинетику ферментативных реакций.....	72
2.6.1. Факторы, влияющие на ферментативную активность.....	72
2.6.2. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций в растворах	72
2.6.3. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции	78
2.6.3.1. Изменение равновесных констант.....	78
2.6.3.2. Температурная зависимость индивидуальных констант скоростей	81
Раздел 3. Другие биоспецифические взаимодействия.....	88
Глава 3.1. Определение параметров взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор .	88
3.1.1. Параметры, характеризующие аффинность антител	88
3.1.2. Способы расчета константы аффинности.....	90
3.1.2.1. Зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда	90
3.1.2.2. Определение константы аффинности в двойных обратных координатах.....	92
3.1.2.3. Метод Скэтчарда.....	93
3.1.2.4. Координаты Хилла.....	95
3.1.3. Кинетические закономерности реакции взаимодействия антиген-антитело, гормон- рецептор.....	96
3.1.4. Методики определения констант скоростей ассоциации и диссоциации.....	99
Глава 3.2. Основы фармакокинетики	105
3.2.1. Фармакокинетика. Краткая история	105
3.2.2. Основные понятия фармакокинетики	106
3.2.3. Однокамерные фармакокинетические модели.....	109
3.2.4. Период полувыведения лекарственного препарата.....	113
3.2.5. Другие фармакокинетические модели	114
3.2.6. Фармакокинетическая оптимизация терапии	119

Заключение	125
Список использованной литературы	126
Предметный указатель.....	127

Предисловие

Биоспецифические взаимодействия – это любые контакты между молекулами в живых организмах, которые формируются за счет множества различных сил. По сути, жизнь – это взаимодействия, правильные, своевременные контакты в нужное время в нужном месте. Это справедливо во всех смыслах, на уровне молекул, клеток, организмов, общества. Любой сбой в одном из таких контактов может привести к нарушению не только данного процесса, но и повлиять на самые отдаленные события. Организм живет до тех пор, пока в нем правильно работают все участники, или, по крайней мере, пока ему удастся справиться с накопленными ошибками. Что такое смерть, если не нарушение каких-то взаимодействий?

Поэтому изучение биоспецифических взаимодействий крайне важно, т. к. позволяет описывать механизмы правильных процессов, изучать причины нарушений, искать возможности их исправлений или компенсаций, что в конечном итоге позволяет продлить счастливую жизнь. Конечно, отсюда не следует, что, изучив этот курс на отлично, вы будете жить дольше и счастливее, чем если вы пропустите его, но в какой-то мере, и это справедливо.

Структурные основы взаимодействий вы уже изучили или еще изучите в курсах биохимии, молекулярной биологии, биохимии мембран, иммунологии и биоэнергетики. По всем этим предметам имеется достаточное количество учебников в библиотеке и в интернете. Кинетика и термодинамика обычных химических реакций подробно описана в учебниках химии, химической термодинамики. Особенность данного учебно-методического пособия в том, что в нем простым языком описывается кинетика и термодинамика сложных взаимодействий между биологическими макромолекулами. Так как наиболее подробно изучены взаимодействия ферментов, основное внимание на курсе будет уделено кинетике и термодинамике ферментативных реакций. Однако примерно те же функции описывают и взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор, лекарственный препарат–белок, поэтому, поняв методологию исследования на примере ферментов, дальше вы сможете самостоятельно разобраться с любыми биологическими процессами.

Данное пособие рекомендовано биологам 3 курса при изучении дисциплины «Энзимология. Кинетика и термодинамика ферментативных реакций», биотехнологам 3 курса, изучающим дисциплину «Кинетика макромолекулярных взаимодействий с основами термодинамики, химии и биохимии белка», биологам 4 курса для изучения дисциплины «Биоспецифические взаимодействия в иммунологии, энзимологии и эндокринологии».

Первый раздел пособия написан для тех, кто забыл (или не понял) школьную математику. Вы можете обратиться к нему, если сталкиваетесь с проблемами при сокращении дробей, анализе графиков функций, логарифмировании выражений. Если математические действия не вызывают затруднений, можно начать изучение пособия со второго раздела.

В следующих разделах простым языком описывается кинетика и термодинамика реакций и подробно разбирается решение задач по каждой теме. На каждой лекции (или семинаре) в университете дается задание, что прочитать из учебного пособия. В каждой главе имеются вопросы, на которые необходимо ответить для подготовки к семинару или контрольной работе. Вопросы подробно разбираются на семинарах.

В каждой теме пошагово описывается методика решения задач. Для лучшего усвоения рекомендуется самим обрабатывать все экспериментальные данные и строить графики. Чтение без практики не научит решать задачи.

Хочется верить, что данное пособие будет понятным и полезным для всех студентов, интересующихся кинетикой и термодинамикой биоспецифических взаимодействий. Если вас не очень интересует данная тема, но вы хотите получить диплом, книжка приблизит вас и к этой заветной цели. Желаю, чтобы при изучении данного пособия, вы перестали бояться формул, научились обрабатывать экспериментальные данные и поверили в свои силы.

Кожевникова О.В.

Список условных обозначений

[] - концентрация

A – активатор

Ag – антиген

At – антитело

B – белок

BL – комплекс белок-лиганд

L – лиганд

E – эффектор

EE – комплекс фермент-эффектор

V – концентрация связанного лиганда, моль/л

C – концентрация вещества, моль/л

Cl – клиренс

E – фермент

E_a – энергия активации, Дж

ED – эффективная доза

EI – комплекс фермент-ингибитор

ES – фермент-субстратный комплекс

ESЭ – тройной комплекс фермент-субстрат-эффектор

F – концентрация свободного лиганда, моль/л

G – энергия Гиббса, Дж

h – постоянная Планка

H – энтальпия, Дж

I – ингибитор

k – константа скорости реакции

k_B – постоянная Больцмана

k_{el} – константа элиминации (выведения) лекарственного вещества

K – константа равновесия

K_a – константа ассоциации (связывания), л/моль

K_A – константа активации, моль/л

K_a – константа диссоциации комплекса фермент-эффектор
 K_i — константа ингибирования, моль/л
 K_M — константа Михаэлиса
 K_S —константа диссоциации фермент-субстратного комплекса
LD—летальная доза
 m —масса вещества, г
P –продукт
R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К)
S – субстрат
S – энтропия
 t – время, сек
T –температура, К
 v – скорость реакции, моль/(л·сек)
 v_T – скорость реакции при температуре T
 V_d – кажущийся объем распределения лекарственного вещества, л
 V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции

Раздел 1. Элементарная математика для биологов

1. Элементарные арифметические действия.
2. Операции с дробями.
3. Линейная функция.
4. Некоторые свойства степеней и логарифмов.

1.1. Элементарные арифметические действия

Существует четыре элементарных арифметических действия, которыми мы пользуемся в нашей обыденной жизни, и которые пригодятся нам для нахождения любых численных параметров, описывающих любые свойства любых объектов (скорость реакции, увеличение клеточной массы, влияние факторов на процессы и т.д.) Это сложение, вычитание, умножение и деление.

Сложение обозначается знаком $+$. Результат сложения есть сумма двух или нескольких чисел. Складывать можно только подобные слагаемые, величины одной размерности. Например, нельзя складывать метры и килограммы, нельзя сложить a , b , c и 1 . При сложении величин их размерность не изменяется. Следовательно, в любом уравнении левые и правые части должны иметь одинаковую размерность. Поэтому для проверки правильности написанных вами выражений всегда удобно писать размерности величин. И если в качестве слагаемых окажутся квадратные метры и амперы, значит формула составлена неправильно. Ищите ошибку.

Для упрощения формул количество слагаемых может быть уменьшено, если одна величина намного больше другой. Другими словами, если одно из слагаемых существенно меньше другого, им можно пренебречь. В биологии, химии, физике обычно это можно делать, если одна величина как минимум на порядок (в 10 раз) больше другой. Интуитивно это понятно. Если, например, у вас имеется 1 рубль и еще 3 рубля, то вы, конечно же, заметите недостачу 1 рубля, если он потеряется. Но если у вас миллион рублей, то потерю одного рубля вы не заметите. То есть, можно записать:

$$3+1 \neq 3$$

$$3+0,01 \approx 3$$

Вычитание – операция, обратная сложению, поэтому к ней применимы все свойства, описанные выше для сложения. Обозначается знаком $-$. Результат вычитания одного числа из другого называется разностью. Вычитание можно заменить на сложение двух чисел, если второе число взять с обратным знаком.

$$1 - 2 = 1 + (-2) = -1$$

Умножение обозначается знаком \cdot . Числа, к которым применяется эта операция, называются множителями. Результат умножения – произведение. Например, запись $a \cdot b$ обозначает, что число a взяли b раз. В буквенных выражениях знак умножения принято опускать.

$$ab = a \cdot b = \underbrace{a+a+\dots+a}_b$$

В отличие от суммы, умножать можно величины разной размерности и пренебрегать малыми величинами нельзя. Здесь и большие и малые множители имеют равные права. Например,

$$1000 \cdot 0,01 = 10$$

Как видим, результат умножения сильно отличается от каждого из множителей. Вспомним, как применять операции сложения и умножения в выражениях, где встречается оба эти действия. И как правильно, одним словом, называть эти выражения. Если вы не знаете, что представляет собой данное уравнение, то вы не сможете определить вид зависимости и найти неизвестные. Например, выражение $(ab + ac)$ является суммой двух слагаемых ab и ac . Но мы можем легко преобразовать его в произведение, вынеся общий множитель a за скобку. Получим

$$ab + ac \text{ (сумма)} = a(b+c) \text{ (произведение)}$$

Если, например, требуется найти величину b , то в зависимости от записи, порядок действий будет различным. Если вместо букв будут стоять числа, то порядок действий в выражении слева (**сумма**) будет такой:

1. a умножаем на b = произведение 1
2. a умножаем на c = произведение 2
3. **складываем** произведение 1 и произведение 2

Порядок действий в выражении справа (**произведение**) будет следующий:

1. **находим** сумму чисел b и c
2. **умножаем** на сумму

Видно, что название выражениям дается по последнему действию. В первом случае последней была операция сложения, поэтому выражение 1 является суммой двух слагаемых. Во втором случае последним действием было умножение, поэтому выражение справа является произведением двух множителей.

Деление - операция, обратная умножению. Обозначается знаками $:$, $/$ или $---$. Число, которое делят, называется, делимое. Число, на которое делят – делитель. Результат деления – частное. Частное показывает, сколько раз делитель содержится в делимом. Если одно число не делится нацело на другое, результат деления представляют в виде обыкновенной дроби или округляют с заданной точностью. Например,

$$1:3 = 1/3 \sim 0,333$$

1.2. Операции с дробями

Сначала вспомним смысл дроби. Например, что обозначает запись $1/2$? Читается - одна вторая. Число, стоящее над чертой – числитель, показывает количество предметов, которые мы хотим разделить. Число, стоящее под чертой – знаменатель, показывает на сколько человек (коробок, бочек) мы будем

распределять (поровну!) эти предметы. В нашем случае, имеется 1 (торт), который мы делим на двоих. Каждый получает половину предмета или одну вторую часть.

К дробям применимы все математические операции. Правда, надо вспомнить некоторые правила.

Сложение и вычитание дробей.

Непосредственно складывать и вычитать можно только дроби с одинаковыми знаменателями. В данном случае знаменатель остается без изменений, складываем числители.

$$1/3 + 2/3 = 3/3 = 1$$

Если дроби имеют разные знаменатели, их надо привести к общему знаменателю. Чтобы это сделать, надо вспомнить **основное свойство дроби**. Значение дроби не меняется, если числитель и знаменатель дроби умножить (или разделить) на одно и то же число. Например,

$$1/2 = 2/4 = 5/10 = 10/20 = \dots$$

Интуитивно, это опять же понятно. Если один торт разделить на двоих, то всем достанется столько же, как если 2 торта разделить на четверых или 10 тортов на 20 человек. Рассмотрим сложение дробей с разными знаменателями.

$$\frac{1}{2} + \frac{2}{3} = \frac{3+4}{6} = \frac{7}{6} = 1\frac{1}{6}$$

Чтобы привести дроби к общему знаменателю, надо найти число, которое делится на первый знаменатель и на второй. В нашем примере это число 6. Тогда знаменатель первой дроби мы умножили на 3. Значит и числитель надо умножить на 3, то есть $1/2 = 3/6$. Соответственно, знаменатель второй дроби мы умножили на 2, поэтому и числитель тоже умножаем на 2. Аналогичные действия надо проделать при вычитании дробей.

$$\frac{1}{3} - \frac{2}{5} = \frac{5-6}{15} = -\frac{1}{15}$$

Основное свойство дроби позволяет не только приводить дроби к общему знаменателю, но и сокращать дробь. Мы можем сокращать дробь, разделив числитель и знаменатель на одно и то же число. То есть, числитель и знаменатель должны представлять собой произведения (если выражение буквенное) либо являться составным числом (которое делится на натуральное число). Если же числитель или знаменатель являются суммой, то мы можем попытаться разложить ее на множители. Если это удастся, тогда сокращение возможно. Если нет, то такую дробь сокращать нельзя. Рассмотрим пример. Дробь $(a+b)/b$ нельзя сократить, т.к. числитель является суммой. Дробь ab/b можно сократить на b , т.к. числитель является произведением. Дробь $(ab+b)/b$ можно сократить на b , но для этого надо сначала сумму в числителе представить в виде произведения, вынеся общий множитель b за скобку получим:

$$\frac{ab+b}{b} = \frac{b(a+1)}{b} = a+1$$

Умножение дробей. Самая простая операция с дробями. Просто перемножаем друг на друга числители и результат записываем в числитель. Перемножаем друг на друга знаменатели – результат записываем в знаменатель.

$$1/2 \cdot 2/3 = 1 \cdot 2 / 2 \cdot 3 = 2/6 = 1/3$$

Деление дробей. Так как деление – действие, обратное умножению, то чтобы разделить одну дробь на другую, надо первую дробь умножить на число, обратное делителю (перевернуть вторую дробь).

$$1/2 : 2/3 = 1/2 \cdot 3/2 = 3/4$$

1.3. Линейная функция

Вспомнив элементарные действия с числами, можно перейти к изучению функций (зависимостей) одной величины от другой. Любая функция связывает две величины по определенному правилу. Функцию можно задать с помощью таблицы, графика или формулы. В школьном курсе математики изучают линейную функцию, параболу, гиперболу, показательную, степенную, логарифмическую, тригонометрические функции.

Простейшей функцией является линейная зависимость одной величины от другой вида: $y = ax + b$. Из названия можно предположить, что графиком этой функции является прямая линия. Вообще, все существующие в мире прямые можно описать функцией вида

$$y = ax + b \quad (1.1.1)$$

При исследовании любых процессов, как правило, пытаются подобрать такие параметры (или их преобразования), чтобы зависимость была линейной. Важно уметь определять параметры такой функции – a и b . Напомню, какой смысл несут эти величины. Для этого найдем значение функции при $x = 0$. Подставив в выражение 1.1.1 $x = 0$, получим, $y = b$. Следовательно, параметр b показывает координату y точки пересечения прямой с осью OY . (Все точки, лежащие на оси OY , имеют координату $x = 0$).

Предположим, что вы провели эксперимент и получили зависимость $y(x)$ (например, оптическая плотность от времени), показанную на рис. 1. Определим значения a и b для данной функции. Другими словами: по данному графику найдем функцию.

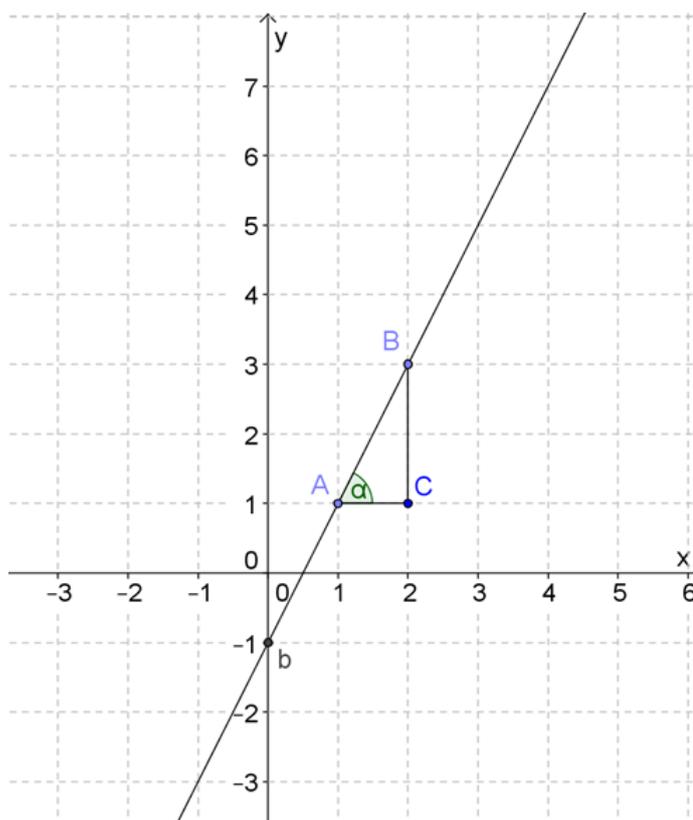


Рис.1.1.1. График линейной функции

Видно, что прямая пересекает ось OY в точке с ординатой (-1) . Следовательно, $b = -1$.

Чтобы ясно понимать смысл параметра a , надо вспомнить производную функции. Производная показывает мгновенную скорость изменения функции (скорость изменения в данной точке), насколько быстро изменяется значение функции при изменении переменной – физический смысл производной:

$$y'(x_0) = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{y(x_0 + \Delta x) - y(x_0)}{\Delta x} \quad (1.1.2)$$

Найдем производную функции 1.1.1

$$y'(x_0) = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{a \cdot (x_0 + \Delta x) + b - a \cdot (x_0) - b}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{ax_0 + a\Delta x + b - ax_0 - b}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{a\Delta x}{\Delta x} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} a = a \quad (1.1.3)$$

Видим, что производная линейной функции не зависит от координаты и во всех точках равна a . С другой стороны, по определению производной (1.1.2) видно, что производная показывает отношение приращения функции (числитель) к приращению аргумента (знаменатель). Значит, если построить прямоугольный треугольник в любой точке прямой (рис. 1.1.1) и найти это отношение, то оно будет показывать тангенс угла наклона прямой. Следовательно, параметра в линейных функциях несет в себе очень ясный смысл. Он показывает скорость изменения функции и равен тангенсу угла наклона прямой. На приведенном рисунке тангенс угла наклона прямой равен отношению длины отрезка BC к AC .

$$a = \operatorname{tg} \alpha = \frac{|BC|}{|AC|} = \frac{3-1}{2-1} = 2 \quad (1.1.4)$$

Следовательно, функция, представленная на рисунке, описывается уравнением $y = 2x - 1$.

Теперь мы сможем анализировать, как идет график линейной функции без построения прямой.

1. Если $a > 0$, то $\operatorname{tg} \alpha > 0$, следовательно, функция возрастающая.
2. Если $a < 0$ ($\operatorname{tg} \alpha < 0$)- функция убывающая.
3. Если $a = 0$, то $\operatorname{tg} \alpha = 0$, следовательно, функция не меняет своего значения на всей области определения. Значит, график представляет собой прямую, параллельную оси OX .
4. Если $b > 0$, график пересекает ось OY выше оси OX .
5. При $b < 0$, точка пересечения лежит ниже оси OX .
6. При $b = 0$, график проходит через начало координат.

Казалось бы, теперь-то все абсолютно ясно. Но оказывается, при обработке результатов многие находят тангенс неправильно! Например, могут измерить угол транспортиром и найти его тангенс с помощью калькулятора. Либо измерить в клеточках, миллиметрах и т. д. длины сторон треугольника и поделить их друг на друга. Ошибка в том, что масштаб осей для построения графиков каждый выбирает произвольно. И угол наклона на рисунке для одних и тех же данных будет разным.

И даже если вы построили график в Excel, вероятность ошибки довольно велика. Казалось бы, уж здесь то, в чем проблема? Ведь компьютер по введенным данным сам нарисовал прямую и даже подписал на ней уравнение (линия тренда)! Ни a , ни b искать не надо! Виноват, конечно же, не компьютер, а вы сами. Вы, а не компьютер, вводя данные, не учли порядок чисел. Например, при построении графика в координатах Лайнуивера-Берка, как правило, обратная концентрация и обратная скорость реакции имеют какой-то порядок, отличный от первого порядка ($10^2 - 10^8$). Причем, эти порядки крайне редко совпадают. Если вы их не ввели, ошибка в тангенсе составит несколько порядков.

И так, как правильно найти тангенс угла? Рассмотрим на конкретном примере. Чем больше вы нарисуете треугольник, тем меньше будет ошибка в определении тангенса.

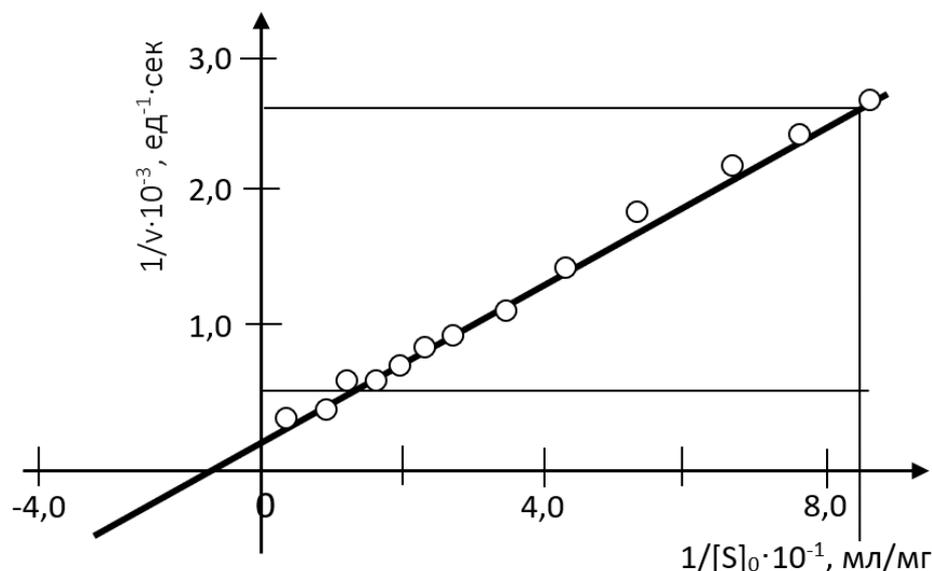


Рис. 1.1.2. График в координатах Лайнуивера-Берка.

Приращение функции в выделенном треугольнике находим по разности:

$$\Delta y = (2,8 - 0,7) \cdot 10^3 = 2,1 \cdot 10^3$$

Приращение аргумента $\Delta x = (8,5 - 0) \cdot 10^1 = 85$

Тогда тангенс угла наклона $\operatorname{tg} \alpha = \Delta y / \Delta x = 2100 / 85 \sim 24,7$

Если бы мы сосчитали тангенс угла, видимого на рисунке, то он получился бы равным примерно 0,5 (3 см / 6 см = 0,5).

Теперь вы сможете находить любые параметры по экспериментальным данным, например, порядок реакции, константу скорости, константу равновесия и т.д.

1.4. Некоторые свойства степеней и логарифмов

Свойства степеней часто используются при решении задач, когда данные представлены в виде чисел, умноженных на 10 в какой-то степени: $a \cdot 10^n$. Что вообще означает это число n ? По определению степени a^n есть краткая запись произведения числа самого на себя n раз.

$$a^n = \underbrace{a \cdot a \cdot a \cdot a \cdot \dots \cdot a}_{n \text{ раз}}$$

Для преобразования выражений, надо вспомнить основные свойства степеней:

1. $a^0 = 1$
2. $a^m a^n = a^{m+n}$;
3. $a^m / a^n = a^{m-n}$;
4. $(ab)^n = a^n b^n$;

5. $(a^m)^n = a^{mn}$;

6. $(a/b)^n = a^n/b^n$

Логарифмическими функциями пользуются для представления данных в случае большого диапазона используемых значений или для приведения функций к линейному виду. Что же обозначает запись $\log_a b$, на многих навевающая тоску и беспомощность?

Читается: логарифм числа b по основанию a . Эти таинственные 5 букв ($\log_a b$) равносильны задаче: найти такое число c , чтобы $a^c = b$. Вот и вся премудрость. То есть, всякий раз, когда вам надо найти логарифм, вы на самом деле подбираете степень (c) для основания логарифма (a), чтобы основание, возведенное в эту степень (a^c), равнялось числу, стоящему под знаком логарифма (b). И так, просто запомните первые 4 слова из этой фразы: **логарифм — это показатель степени**, в которую надо возвести основание логарифма, чтобы получить число, стоящее под знаком логарифма.

Для описания процессов чаще всего используются два основания логарифмов – e и 10 . Для них существуют свои обозначения: $\log_e b = \ln b$ (натуральный логарифм b); $\log_{10} b = \lg b$ (десятичный логарифм b).

Свойства логарифмов:

1. $\log_a(bc) = \log_a b + \log_a c$

Логарифм произведения равен сумме логарифмов

2. $\log_a \frac{b}{c} = \log_a b - \log_a c$

Логарифм частного равен разности логарифмов

3. $\log_a b^p = p \cdot \log_a b$

Степень выносим перед знаком логарифма

4. $\log_a b = \frac{\log_c b}{\log_c a}$

Переход от логарифма по основанию a к логарифму с любым другим основанием (в данном случае c).

Всеми этими свойствами мы будем пользоваться при выводе различных зависимостей, при формулировках законов и решении задач.

Раздел 2. Кинетика и термодинамика ферментативных реакций

«Огонь, который горит в два раза ярче, сгорает в 2 раза быстрее»

реплика из фильма «Бегущий по лезвию»

Глава 2.1. Введение в химическую кинетику

1. Кинетический эксперимент.
2. История химической кинетики.
3. Современные представления о механизме химической реакции.
4. Параметры кинетического эксперимента.
 - a. Скорость химической реакции.
 - b. Порядок реакции и константа скорости.
 - c. Определение кинетических параметров по экспериментальным данным.

2.1.1. Кинетический эксперимент

Один из главных признаков, который отличает живое от неживого, это изменение во времени – движение, развитие, увядание, размножение. Причем, эти изменения строго контролируемы, и если они нарушаются, это проявляется как болезнь или смерть. Что является причиной нарушений? Кто их запускает и регулирует? Какими методами можно раскрыть тайны и повлиять на эти изменения? (1). На эти вопросы пытается ответить математический раздел биологии – биологическая кинетика (биокинетика). Химическая кинетика изучает скорости и механизмы любых химических реакций. Механизмы и скорости реакций, протекающих в живых организмах, изучает биокинетика, кинетика и термодинамика ферментативных реакций. **Механизм реакции** — это последовательность взаимодействий и структурных превращений веществ. Полное описание механизма включает исследование кинетических и термодинамических параметров всех стадий процесса.

Что надо знать, чтобы решать эти задачи? На чем основана биокинетика? Биокинетика опирается на основные законы физической и химической кинетики. Наиболее интенсивно изучаются ферменты, поэтому и в данном пособии наибольшее внимание уделено кинетике ферментативных реакций – ферментативному катализу. Кроме этого, биокинетика изучает процессы передачи информации между клетками. Этот раздел биокинетики называется молекулярная рецепция. Очень важную область биокинетики составляет фармакокинетика, которая изучает поведение лекарственных веществ в нашем организме. Еще одна область исследований – кинетика роста и эволюции клеточных популяций. И так, наше изучение мы начнем с краткого знакомства с историей химической кинетики.

2.1.2. История химической кинетики

Вероятно, одной из самых первых попыток изучения механизма химической реакции являются работы Р. Бойля, который в конце 17 века (1680) наблюдал, что фосфор начинает светиться ярче, если уменьшить давление воздуха. В 18 веке

(1770) А. Лавуазье изучал взаимодействие ртути с кислородом. Один из самых длинных его экспериментов продолжался в течение 100 дней. Через 7 лет после этого немецкий ученый К. Венцель делает вывод, что «средство тел к общему растворителю обратно пропорционально времени, которое необходимо для их растворения». По сути, Венцель сформулировал основные положения закона действующих масс почти на 100 лет раньше норвежцев К. Гульдберга и П. Ваанге. Но, его работы прошли незамеченными современниками, что очень часто бывает в науке. Английские ученые Хиггинс и его ученица Фульгем предположили, что все реакции протекают через образование и распад промежуточных соединений (1789–1794). Хеннель, Либих, Вильямсон, а также русский ученый Д.И. Менделеев описали обратимый и сложный характер химических превращений (1869). В 1861 г. А.М. Бутлеров сформулировал теорию химического строения: закономерности протекания химических реакций зависят от строения веществ.

2.1.3. Современные представления о механизме химической реакции

Что такое химическая реакция? Это превращение веществ. Каждое вещество состоит из одинаковых молекул. Молекулы состоят из атомов, соединенных химической связью. Поэтому, чтобы произошла реакция, надо разорвать старые связи между атомами в молекулах и сформировать новые. Кто сможет это сделать? Оказывается, причина всех реакций – броуновское движение (или, можно сказать, температура). В результате броуновского движения молекулы сталкиваются. И если их энергия выше определенной величины, то в результате такого соударения они превратятся в промежуточный продукт (интермедиат, переходное состояние), реакция произойдет. Эта энергия, которая необходима для запуска реакции, называется **энергией активации**. Термин был введен Аррениусом в 1889 г.

Согласно современным представлениям, все реакции делятся на простые и сложные (табл. 2.1.1).

Таблица 2.1.1

Типы химических реакций

простые	сложные	
мономолекулярные $A \rightarrow B$	обратимые	каскадные
бимолекулярные $A + B \rightarrow C$	параллельные $A + B \rightarrow C \rightarrow D + F$ ↓ $E \rightarrow G + H \rightarrow I$	последовательные $A + B \rightarrow C \rightarrow D + F \rightarrow G$
тримолекулярные	циклические	смешанные

Попробуйте по примерам в таблице предположить, чем отличаются простые реакции от сложных? (3)

В зависимости от числа атомов, одновременно вступающих в простую реакцию, они делятся на моно-, би- и тримолекулярные. Одновременное взаимодействие более 3 молекул практически невозможно. Простых реакций в природе крайне мало. Большинство реакций представляют собой последовательность простых реакций и называются сложными.

Если реакция в прямую и обратную сторону протекает через одни и те же вещества, она **обратимая**. Если через разные вещества (или те же, но в другом порядке) – **циклическая**. **Параллельными** называются реакции, которые протекают одновременно и имеют 1 или более общих субстратов. Реакции, в которых на каждом этапе происходит увеличение числа молекул, называются **каскадными**.

Основной задачей химической кинетики является изучение механизмов протекания химических реакций. Первая и наиболее простая задача – определить количественные закономерности превращений (скорость, константу скорости, порядок реакции). Более сложная задача – изучить механизм реакции, т.е. определить все промежуточные соединения и скорости превращения на отдельных этапах. Как же это делают?

2.1.4. Параметры кинетического эксперимента

А. Скорость химической реакции

Вы, наверное, наблюдали, что одни реакции идут быстро, другие – медленно. Приведите примеры (4). То, насколько быстро или медленно протекает химическая реакция, отражает параметр – скорость реакции.

Скорость реакции – изменение концентрации вещества в единицу времени (изменение количества вещества в единице объема в единицу времени).

$$v = \frac{C_1 - C_2}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta C}{\Delta t} \quad (2.1.1)$$

где C – молярная концентрация вещества, *моль/л*; t – время, с. Из определения следует, что размерность скорости *моль/(л*с) = Мс⁻¹*. В сокращенной записи M означает не моль (количество вещества), а именно *моль/л*(концентрация). То есть, когда вы читаете фразу «1М раствор NaCl», это означает, что в вашем растворе не 1 моль хлорида натрия (всего, во всем объеме), а концентрация хлорида натрия в вашем растворе 1 моль на литр. С помощью уравнения 2.1.1 можно решать простейшие задачи.

Задача 1.

Вычислите скорость реакции цинка с серной кислотой, начальная концентрация которой равна 0,5 моль/л. Вся серная кислота израсходовалась за 1 минуту.

Задача 2.

Вычислите скорость реакции железа с бромоводородной кислотой, содержащей 1 грамм кислоты в 1 литре раствора, если известно, что вся кислота израсходовалась за 5 секунд.

Если быть совсем точными, то вы вычислили сейчас **среднюю скорость** на протяжении данной реакции. Формула 2.1.1 показывает среднюю скорость реакции на данном промежутке времени. И по одному этому значению никакие другие параметры реакции узнать не получится. **Мгновенную скорость реакции** (скорость в данный момент времени) отражает запись:

$$v = -dC/dt, \text{ если } C \text{ – субстрат реакции}$$

$$v = dC/dt, \text{ если } C \text{ – продукт реакции} \quad (2.1.2)$$

В чем разница между этими выражениями для скорости? (5)

Чтобы измерить скорость реакции проводят кинетический эксперимент. Задача кинетического эксперимента – измерять концентрацию исследуемого вещества в ходе реакции. Этим веществом может быть **субстрат** (исходное вещество) или **продукт реакции**. **Промежуточные вещества** измерять трудно, т.к. они быстро распадаются. По результатам измерений строят график – зависимость концентрации от времени. По рисунку 2.1.1 определите, какая линия соответствует изменению концентрации какого вещества? (6)

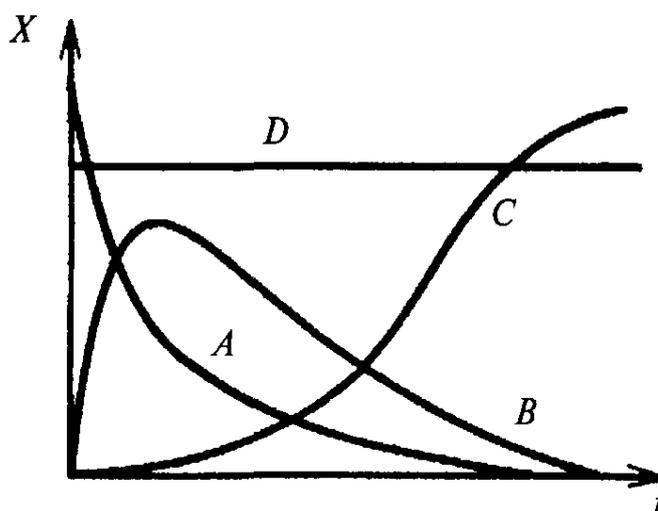


Рис. 2.1.1 Изменение концентрации различных веществ в ходе двухстадийной реакции[2]

Постоянна ли скорость данной реакции в различные моменты времени? (7)
Проверим ваше предположение на конкретном примере.

Задача3[2]

Экспериментально установлено, что в реакции иодида калия с тиосульфатом натрия концентрация KI изменяется следующим образом:

Время, мин	0	10	20	30	40
C, мМ	2	1,4	1,1	0,9	0,8

Вычислите среднюю скорость реакции в каждом промежутке времени (по 10 мин) и постройте график изменения скорости реакции от времени. Объясните, почему со временем скорость реакции изменяется.

Вернемся к определению скорости (выражение 2.1.1, рисунок 2.1.1). Скорость реакции показывает, во сколько раз изменение концентрации больше, чем изменение времени. Или, другими словами, скорость реакции показывает изменение высоты графика (концентрации, рис. 2.1.1) на каждую единицу изменения времени или крутизну изменения концентрации, насколько быстро концентрация меняется от времени. Уменьшая длину временного отрезка, мы приходим к определению производной: изменение концентрации в данный момент времени.

Скорость реакции – это производная функции $C(t)$, концентрации от времени. В математике вводится понятие производной именно как скорость изменения функции (физический смысл производной). И так, если известно алгебраическое выражение функции, то существуют правила нахождения производных. Но в эксперименте мы строим график, у нас нет алгебраического выражения. Тогда придется вспомнить и геометрический смысл производной.

Производная функции – тангенс угла наклона касательной (рис.2.1.2). Как правильно найти тангенс угла, описано в разделе 1.

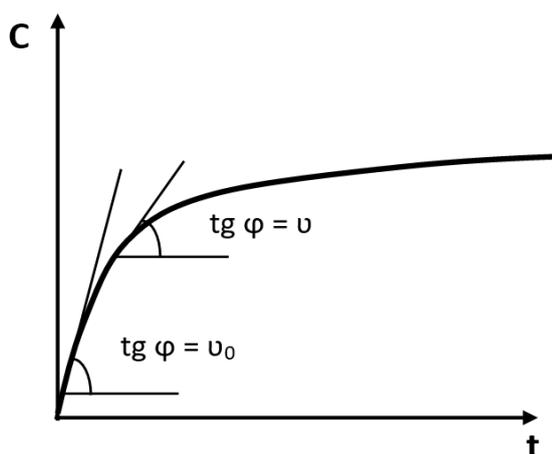


Рис. 2.1.2. Определение скорости химической реакции и начальной скорости

По наклону касательных видно, что скорость реакции убывает с течением времени. Она максимальна в начальный момент времени реакции и называется

начальной скоростью (касательная проводится из начала координат, угол φ большой). Затем она убывает до нуля, концентрация продукта остается постоянной, касательная параллельна оси абсцисс.

Задача 4.

По данным задачи 3 постройте график функции $C(t)$ и определите скорость реакции по касательным в любых трех точках. Сравните полученную скорость со скоростью, найденной первым способом в задаче 3.

В. Порядок реакции и константа скорости

Рассмотрим реакцию



Согласно закону действующих масс (основное уравнение химической кинетики), скорость реакции v зависит от концентраций исходных веществ А и В:

$$v = k [A]^a [B]^b \quad (2.1.4)$$

Для начала познакомимся поближе с буквами, стоящими в выражении (2.1.4).

v – скорость реакции, моль/л*с

k – **константа скорости** реакции. Я не могу сейчас сказать о ее размерности, потому что, оказывается, эта величина имеет переменную размерность! Возможно, такого вам еще не встречалось. Мы сами выведем ее размерность чуть позже, познакомившись с другими символами выражения 2.1.4.

$[A]$, $[B]$ – концентрации веществ А и В, соответственно. Измеряются в моль/л (или М);

a , b – **порядок реакции** по веществу А и В, соответственно. Общий порядок реакции = $a+b$.

Вот теперь мы сможем обсудить порядок реакции и смысл константы k , а затем научиться находить эти параметры. На практике реакции бывают нулевого, первого, второго и, гораздо реже, третьего порядка. Порядок реакции может быть и дробным. В простейших случаях он совпадает со стехиометрическими коэффициентами, но в большинстве реакций их величины различны. По определению, порядок реакции – это показатель степени в уравнении 2.1.4, а не стехиометрические коэффициенты в схеме реакции 2.1.3. Оказывается, именно порядок реакции определяет размерность константы скорости. Рассмотрим размерность константы k для различных порядков реакции.

Порядок реакции может быть нулевым, только если мы говорим о частном порядке реакции – коэффициенты a или b . Если, например, $a = 0$, это означает, что скорость зависит от концентрации данного вещества в нулевой степени. А согласно свойству (1) степеней (см. п.4 раздел 1), любое число в нулевой степени равно 1. Следовательно, в данном случае скорость реакции не зависит от концентрации вещества А. Это может быть только в случае, если вещество А взято в избытке. Тогда, в какую бы сторону мы ни изменяли его концентрацию (безусловно, в определенных пределах), эти изменения не повлияют на скорость

реакции. Другими словами, скорость зависит от концентрации вещества, взятого в недостатке.

Это легко представить. Предположим, в реакции должны соединиться красные (А) и белые (В) шары. Всякая реакция может произойти только в результате соударения молекул (они не умеют гипнотизировать на расстоянии). Теперь представим, что в комнате (пробирке), имеется 1 тысяча шаров А и только 10 шаров В. Вероятность соударения шаров А и В невелика, но она будет возрастать при увеличении количества шаров В, но не А! То есть, скорость реакции в данном случае будет зависеть только от концентрации вещества В.

$$v = k[A]^a[B]^b = k[B]^b \quad (2.1.5)$$

Общий порядок реакции в данном случае равен порядку реакции по веществу В и равен b . Общий порядок не может равняться нулю, т.к. в данном случае мы бы получили, что скорость реакции не зависит от концентрации никакого вещества.

Рассмотрим простейшую реакцию первого порядка:



$$v = k[A] \quad (2.1.7)$$

Подставим размерности величин скорости и концентрации и найдем размерность константы k :

$$k = \frac{v}{[A]} = \left[\frac{\frac{\text{моль}}{\text{л} \cdot \text{с}}}{\frac{\text{моль}}{\text{л}}} \right] = [\text{с}^{-1}] \quad (2.1.8)$$

Следовательно, в реакциях первого порядка размерность константы скорости - с^{-1} .

В реакциях второго порядка:



$$v = k[A][B] \quad (2.1.10)$$

получим размерность константы скорости:

$$k = \frac{v}{[A][B]} = \left[\frac{\frac{\text{моль}}{\text{л} \cdot \text{с}}}{\frac{\text{моль}}{\text{л}} \cdot \frac{\text{моль}}{\text{л}}} \right] = \left[\frac{\text{моль} \cdot \text{л}^2}{\text{моль}^2 \cdot \text{л} \cdot \text{с}} \right] = \left[\frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{с}} \right] = [M^{-1} \text{с}^{-1}] \quad (2.1.11)$$

В реакциях третьего порядка размерность будет $[M^2 \text{с}^{-1}]$ и т.д. Заметим, что во всех случаях в размерность константы скорости входит время - с^{-1} . То есть, константа скорости характеризует скорость процесса - события, протекающие в единицу времени. Этим константы скорости отличаются от констант равновесия.

И так, разобравшись с размерностями константы скорости, посмотрим, какой смысл несет в себе ее численное значение. Подставив в выражения (2.1.5, 2.1.7, 2.1.10) концентрации веществ, равные 1, получим, что в любом случае $v = k$.

Следовательно, когда мы видим в таблицах, статьях, учебниках численные значения k , мы должны понимать, что это не просто какой-то коэффициент пересчета, а это число показывает, какой будет скорость данной реакции, если взять концентрации исходных веществ по 1 моль/л. И так, **константа скорости численно равна скорости реакции при концентрациях всех реагирующих веществ 1 моль/л.**

С. Определение кинетических параметров по экспериментальным данным

Вот теперь мы все знаем про все буквы в выражении 2.1.4 и можем подумать над тем, как их находить из экспериментальных данных. Конечно же, сначала эти данные надо получить.

1. Провести эксперимент с разными концентрациями субстрата (меняем концентрацию одного вещества! Концентрации других веществ и все остальные условия эксперимента должны быть одинаковы), и в каждом случае рассчитать скорость реакции.
2. Имея зависимость скорости от концентрации субстрата, можно найти порядок реакции и константу скорости.

Существует множество методов определения этих параметров. Мы рассмотрим классический способ, который подходит для определения константы скорости и порядка реакции для любых химических реакций. Закон действующих масс – пример степенной функции. И находить параметры таких функций довольно проблематично. Но, изучив первый раздел данного пособия, мы сможем преобразовать эту функцию в линейную. Чтобы перевести степенную функцию в линейную, надо просто ее прологарифмировать. При этом показатель степени превратится в множитель в многочлене. Именно поэтому многие экспериментальные данные представлены в логарифмических координатах. Применим это свойство к уравнению 2.1.4. Правда, сначала нам придется применить еще одно свойство логарифмов: логарифм произведения равен сумме логарифмов. Получим:

$$\lg v = \lg (k [A]^a [B]^b) = \lg k + \lg [A]^a + \lg [B]^b = \lg k + a \lg [A] + b \lg [B] \quad (2.1.12)$$

Видим, что степенное уравнение 2.1.4 превратилось в сумму трех слагаемых. И теперь функция $\lg v$ линейно зависит от переменных $\lg[A]$ и $\lg[B]$. Однако количество неизвестных как было три, так и осталось (a , b , k). Очевидно, что из одного уравнения мы можем найти только одно неизвестное, из двух – два и т.д. Следовательно, чтобы определить порядки реакции по веществам А, В и константу скорости, нам необходимо провести как минимум три эксперимента. Тогда, подставив известные концентрации веществ А и В и измеренные скорости реакций, мы получим три линейных уравнения. Решив систему уравнений, можно найти все необходимые параметры – a , b , k . Напомню, как решаются системы линейных уравнений на примере конкретной задачи.

Задача[1]

В таблице приведены экспериментальные данные по исследованию взаимодействия фенилдиметилноксазолинона с этиловым эфиром аланина. Требуется найти порядок реакции по каждому компоненту и константу скорости реакции.

$v_0 \cdot 10^7$, моль/л*сек	$[A]_0 \cdot 10^3$, моль/л	$[B]_0 \cdot 10^3$, моль/л
4,06	2,15	15,1
4,20	10,0	3,36
12,10	6,38	15,1
36,8	10,0	29,4

Подставим значения скоростей и концентраций в уравнение (2.1.12). Получим 4 линейных уравнения:

$$\begin{cases} \lg(4,06 \cdot 10^{-7}) = \lg k + a \lg(2,15 \cdot 10^{-3}) + b \lg(15,1 \cdot 10^{-3}) \\ \lg(4,20 \cdot 10^{-7}) = \lg k + a \lg(10 \cdot 10^{-3}) + b \lg(3,36 \cdot 10^{-3}) \\ \lg(12,1 \cdot 10^{-7}) = \lg k + a \lg(6,38 \cdot 10^{-3}) + b \lg(15,1 \cdot 10^{-3}) \\ \lg(36,8 \cdot 10^{-7}) = \lg k + a \lg(10 \cdot 10^{-3}) + b \lg(29,4 \cdot 10^{-3}) \end{cases}$$

Сосчитаем логарифмы, чтобы уравнения приняли более простой вид. В данном случае удобно применить свойства логарифмов 1 и 3, в соответствии с которыми, например,

$$\lg(4,06 \cdot 10^{-7}) = \lg 4,06 + \lg 10^{-7} = -7 + \lg 4,06 = -7 + 0,609 = -6,391$$

Можно, конечно, вводить в калькулятор и произведение чисел, но многие с этим путаются, поэтому лучше понимать, что не обязательно считать $\lg 10^{-7}$ на калькуляторе. Подставив численные значения логарифмов, получим:

$$\begin{cases} -6,391 = \lg k - 2,668 a - 1,821 b \\ -6,377 = \lg k - 2a - 2,474 b \\ -5,917 = \lg k - 2,195 a - 1,821 b \\ -5,434 = \lg k - 2a - 1,532 b \end{cases}$$

Существует два способа решения системы линейных уравнений: метод подстановки и метод вычитания. Метод подстановки заключается в том, что одна из переменных (например, a) выражается через другие (b , k) из первого (или любого другого) уравнения. Полученное выражение подставляют вместо этой переменной (a) в оставшиеся уравнения. Таким образом получают количество неизвестных и уравнений на одно меньше. То есть, если было две переменных и два уравнения, мы можем выразить u через x из первого уравнения. Подставив вместо u выражение через x во второе уравнение, мы получим одно уравнение с одним неизвестным x . Находим x и подставляем найденное значение в выражение u через x . Находим u .

Если в двух уравнениях системы совпадают какие-то слагаемые, то удобнее применить второй способ решения систем – метод вычитания. В нашем примере в уравнениях 1 и 3, а также 2 и 4 совпадают даже по два слагаемых! Вычтем из третьего уравнения первое, а из четвертого – второе. Получим:

$$\begin{cases} 0,474 = 0,473 a \\ 0,943 = 0,942 b \\ -6,377 = \lg k - 2a - 2,474 b \\ -5,434 = \lg k - 2a - 1,532 b \end{cases}$$

Из первого уравнения находим: $a = 1$. Из второго уравнения $b = 1$. Подставляем эти значения в уравнение 3 и находим $\lg k$.

$$-6,377 = \lg k - 2 - 2,474$$

$$\lg k = -1,903$$

Для проверки можно подставить значения a и b в любое из исходных уравнений и найти $\lg k$ из него. Подставив, например, в 4 уравнение, получим

$$-5,434 = \lg k - 2 - 1,532$$

$$\lg k = -1,902$$

Видим, что оба найденных значения совпадают с точностью до сотых. Находим k по определению логарифма: $k = 10^{-1,9} = 0,0125$. Теперь вспомним, что мы говорили о размерности константы скорости. Так как в данной задаче мы получили, что порядок реакции по веществу А – первый, по веществу В – первый, следовательно, общий порядок реакции – второй. Тогда размерность константы скорости $[M^{-1}c^{-1}]$.

Ответ: $a = 1$, $b = 1$, $k = 0,0125 M^{-1}c^{-1}$

Данную задачу можно было решить графически. Из множества значений надо выбрать условия, при которых концентрация одного вещества остается постоянной, тогда скорость зависит только от концентрации второго вещества. Строят график в координатах $\lg v$ ($\lg [A]$) – концентрация В при этом должна быть постоянной. По тангенсу угла наклона прямой находят a , по точке пересечения прямой с осью ОУ – константу скорости k . В данном случае значение ординаты в точке пересечения равно $(\lg k + b \lg [B])$, поэтому из одного графика найти k мы не сможем. Затем отбираем значения при постоянной концентрации вещества А и строим график в координатах $\lg v$ ($\lg [B]$). По тангенсу угла наклона находим b . И вот теперь по точке пересечения с осью ОУ можно найти константу k . Не забываем при этом, что в данном случае ордината точки пересечения равна $(\lg k + a \lg [A])$. Но порядок реакции по веществу А мы уже знаем из первого графика.

Для следующей задачи составьте план эксперимента. Какой будет измеряемый параметр?(15)

Задача 5[1]

Кинетика термического распада хлористого гидразония в смеси его с гидразином при $185^\circ C$ описывается общим уравнением $v = k[N_2H_4]^a[N_2H_5Cl]^b$. Используя данные

таблицы, найти константу скорости реакции и порядок реакции по гидразину и хлористому гидразонию.

Зависимость скорости термодинамического распада хлористого гидразония от концентрации реагентов

$v \cdot 10^4$, моль/л · сек	$[N_2H_4]$, моль/л	$[N_2H_5Cl]$, моль/л
27,7	12,65	17,8
27,4	12,50	17,8
26,1	11,9	17,8
21,9	10,0	17,8
10,5	4,8	17,8
9,86	4,51	17,8
6,48	2,96	17,8
3,57	1,71	17,0
3,34	1,71	15,9
3,30	1,71	15,7
2,58	1,71	12,25
2,29	1,71	10,9
2,24	1,71	10,55
2,19	1,71	10,4

Решение данной задачи состоит из нескольких этапов:

1. Проанализировать данные таблицы и выбрать для построения графика те значения концентраций, при которых концентрация одного из субстратов остается постоянной. Если меняются обе концентрации, линейную зависимость не построить!
2. Построить график зависимости логарифма скорости реакции от логарифма концентрации гидразина при постоянной концентрации гидразония. По тангенсу угла наклона определить порядок реакции по гидразину. Координата точки пересечения графика с осью y равна $(lgk + blg[B])$.
3. Построить график зависимости логарифма скорости реакции от логарифма концентрации гидразония при постоянной концентрации гидразина. По тангенсу угла наклона определить порядок реакции по гидразонию. Координата точки пересечения графика с осью y равна $(lgk + alg[A])$.
4. Зная порядки реакции, подставьте их значения в любое из выражений скорости (2.1.4 или 2.1.12) и найдите значение константы скорости по двум-трем выражениям. Найдите среднее значение.
5. В ответе запишите порядок реакции по каждому компоненту, общий порядок реакции и значение константы скорости с размерностью.

Вопросы и задачи для подготовки к семинару:

1. Что является причиной нарушений биоспецифических взаимодействий? Кто их запускает и регулирует? Какими методами можно раскрыть тайны и повлиять на эти изменения?
2. Что такое механизм реакции?

3. Чем отличаются простые реакции от сложных?
 4. Приведите примеры быстрых и медленных реакций
 5. В чем разница между выражениями для скорости, определяемой по субстрату и продукту реакции?
 6. По рисунку 2.1.1 определите, какая линия соответствует изменению концентрации какого вещества?
 7. Постоянна ли скорость реакции (рис.2.1.1) в различные моменты времени? Ответ поясните.
 8. Чем отличаются понятия скорость реакции и начальная скорость? Что больше?
 9. Приведите примеры трех химических реакций и запишите для них кинетические уравнения.
 10. Составьте (или найдите) план проведения кинетического эксперимента.
 11. Определения: субстрат, интермедиат, продукт реакции.
 12. Запишите закон действующих для реакций:
 - А) $A+2B \rightarrow 3C$
 - Б) $A+B+C \rightarrow D+E$
 13. В колбе находятся 0,5 л раствора, содержащего 16 г тиосульфата натрия $Na_2S_2O_3$. При добавлении к раствору соляной кислоты, взятой в избытке, через 10 сек появляется опалесценция, вызванная образованием мельчайших крупинок серы, что свидетельствует о прекращении химической реакции. Вычислите среднюю скорость реакции.
 14. При изучении скорости реакции карбоната кальция с соляной кислотой измеряли объем выделившегося углекислого газа, измеренного при нормальных условиях. Получены следующие данные:

$V(CO_2)$, мл	0	27	47	61	69	75	80
Время, с	0	15	30	45	60	75	90
- Составьте график зависимости изменения объема выделившегося газа от времени. Вычислите скорость реакции в каждый промежуток времени и начальную скорость реакции. Почему изменяется скорость реакции?
15. Спланируйте эксперимент в задаче 5. Какой будет измеряемый параметр?

Ответы на некоторые задачи.

1. 0,0083 моль/л*с
2. 0,0025 моль/л*с

Глава 2.2. От чего зависит скорость реакции?

1. Влияние природы вещества. Энергия активации.
2. Влияние агрегатного состояния реагентов.
3. Влияние концентрации.
4. Влияние давления и объема.
5. Влияние температуры.
6. Влияние pH.
7. Катализаторы и ингибиторы.

2.2.1. Влияние природы вещества

Различные вещества вступают в реакции по-разному. Одни реагируют легко, другие неохотно; одни – с огромными скоростями, другие – очень медленно. Например, алкены легко вступают в реакции со многими веществами, а алканы малоактивны и реагируют с небольшим количеством веществ. Содержащийся в атмосфере кислород реагирует при обычных условиях со многими простыми и сложными веществами, а азот вступает в реакции с большим трудом, аргон же вообще не реагирует ни с одним веществом. Из этих примеров видно, что скорость реакции в первую очередь зависит от природы вещества. Под природой вещества понимают его структуру (состав, прочность и тип связей, полярность, поляризуемость и т. д.). Как зависит скорость реакции от природы связей? (1)

В предыдущей главе уже говорилось, что все химические реакции происходят в результате столкновения частиц. И только если столкнувшиеся молекулы обладают достаточной энергией, происходит их превращение. В любой момент времени в инкубационной смеси (в пробирке) молекулы отличаются друг от друга по энергии. Есть молекулы с очень низкой энергией (близкой к 0) и есть молекулы с очень высокой энергией. Но таких молекул, обладающих очень низкими или высокими значениями энергии, совсем мало. Большинство молекул имеют энергию, близкую к средней. Теперь представьте, что молекулы с каждой энергией (1, 2 и т. д.) мы распределили по кучкам, и в каждой кучке сосчитали, сколько молекул обладают такой энергией. У нас получится набор столбиков, как монеты определенного достоинства, показанный на рис. 2.2.1.

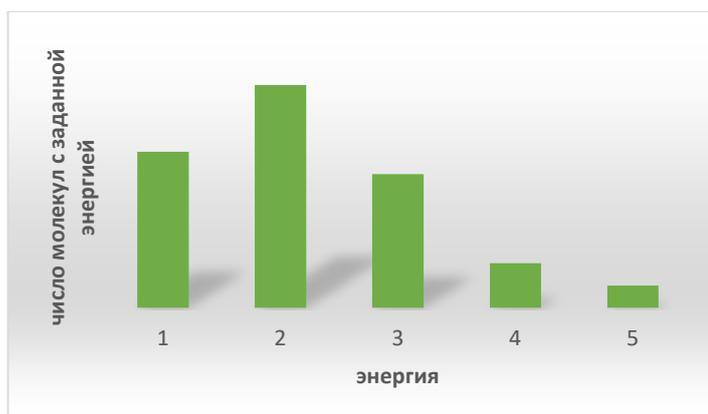


Рис. 2.2.1. Зависимость числа молекул, обладающих определенной энергией, от абсолютного значения энергии

Если ступеньки между определенными значениями энергии делать все уже, то в конце концов мы получим не набор стоек, а плавный график зависимости числа молекул, обладающих определенной энергией, от абсолютного значения энергии (рис.2.2.2).

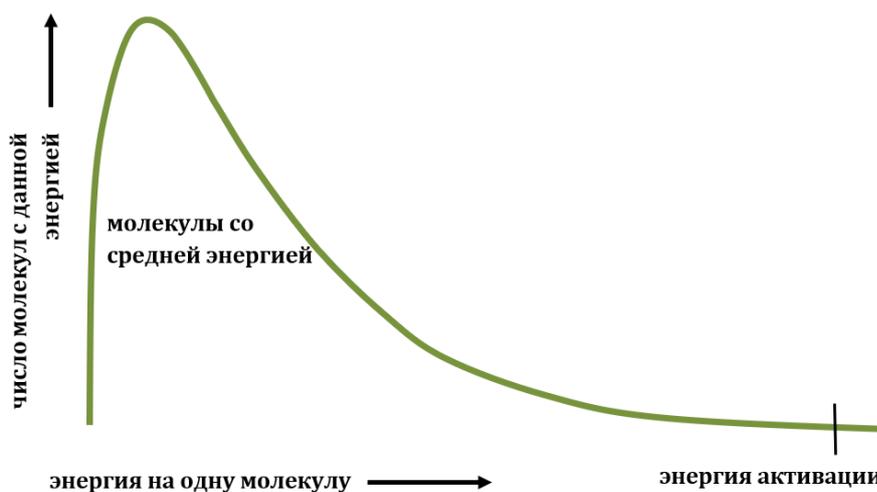


Рис. 2.2.2. Распределение молекул по энергиям

Из рисунка 2.2.2 следует, что в каждый момент времени большинство молекул обладают энергией в пределах пика. И есть только очень небольшое количество молекул данного вещества, обладающих энергией, достаточной для превращения (молекулы, энергия которых не меньше, чем энергия активации). Энергию молекул можно увеличить, нагревая вещество. Та дополнительная энергия, которую надо сообщить молекулам, для того чтобы произошло эффективное соударение, называется **энергией активации**.

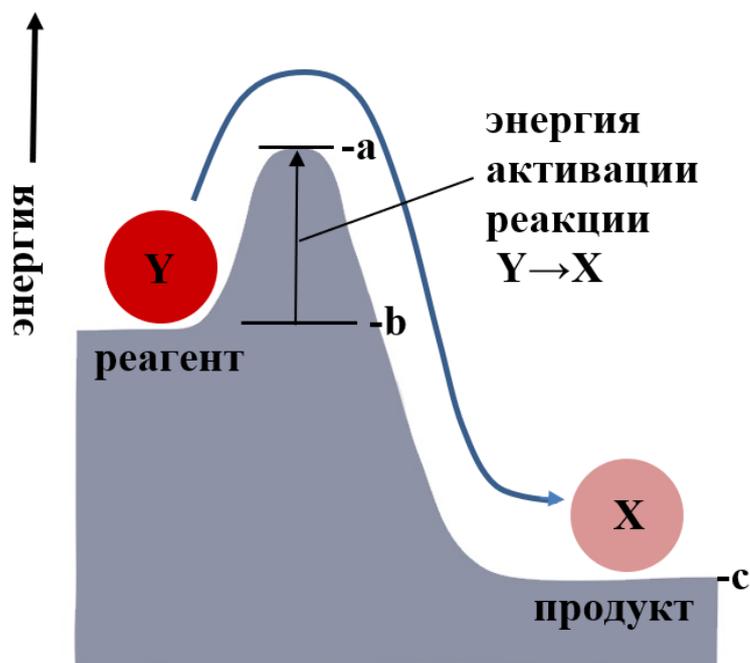


Рис. 2.2.3. Энергия активации

Таким образом, на пути всех частиц, вступающих в реакцию, имеется энергетический барьер, равный энергии активации E_a . От чего зависит величина энергии активации? (2). Когда она маленькая, то находится много частиц, которые могут преодолеть энергетический барьер, и скорость реакции в этом случае велика. И наоборот. Подумайте, для чего нам нужны спички с точки зрения химии? (3)

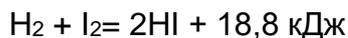
Энергию активации определяют экспериментально. Она изменяется в довольно широких пределах (таблица 2.2.1).

Таблица 2.2.1

Энергии активации некоторых реакций [3]

Реакция	E_a , кДж/моль
$2\text{NH}_3 = 3\text{H}_2 + \text{N}_2$	326
$2\text{SO}_2 + \text{O}_2 = 2\text{SO}_3$	250
$2\text{HI} = \text{H}_2 + \text{I}_2$	186
$\text{H}_2 + \text{I}_2 = 2\text{HI}$	167
$2\text{NO}_2 = 2\text{NO} + \text{O}_2$	113
$2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	70
$\text{CO} + \text{Cl}_2 = \text{COCl}_2$	50
$2\text{NO} + \text{Cl}_2 = 2\text{NOCl}$	20

Видно, что энергия активации большинства реакций намного превышает среднюю кинетическую энергию молекул (4 кДж/моль при комнатной температуре). Рассмотрим взаимодействие двух газообразных веществ – водорода и йода:



$$E_a = 167,4 \text{ кДж/моль}$$

Поясните пожалуйста числа. Что такое 18,8? И что такое 167,4? Какая это реакция? Нарисуйте энергетическую диаграмму реакции (4).

Процесс образования йодоводорода обратим: Чему равна энергия активации распада HI? Какая это реакция? (5).

Многие реакции протекают в несколько стадий. Если химическая реакция протекает в две стадии, как будет выглядеть диаграмма изменения энергии в ходе такой реакции? (6).

Многие возможные с точки зрения термодинамики реакции не идут при обычной температуре, так как высока энергия активации. *Если энергия активации мала (<40 кДж/моль),* это означает, что значительная часть столкновений между частицами реагирующих веществ эффективна, т.е. приводит к их взаимодействию и скорость такой реакции очень большая. Все реакции ионного обмена протекают практически мгновенно, т.к. в этих реакциях участвуют разноименно заряженные ионы, и энергия активации очень мала. Найдите примеры быстрых реакций в таблице.

Если E_a велика (>120 кДж/моль), то это означает, что лишь очень малая часть столкновений эффективна, т.е. приводит к превращению веществ. Например, синтез аммиака при обычных условиях практически не идет. Очевидно, что если энергия активации лежит в пределах от 40 до 120 кДж/моль, то реакция протекает с какой-то средней скоростью. К таким реакциям относятся взаимодействие натрия с водой или этиловым спиртом, обесцвечивание бромной воды этиленом, взаимодействие цинка с соляной кислотой и др.

Но, если реакция экзотермическая, то однажды начавшись, ее будет трудно остановить. Представьте, что случилось бы, если бы все термодинамически разрешенные реакции могли идти, не имея энергетического барьера? (7). Это значит, что вселенная и мы с вами существуем только благодаря энергии активации.

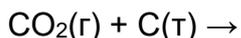
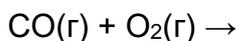
2.2.2. Влияние агрегатного состояния реагентов

Попробуйте сами ответить на вопрос, как влияет агрегатное состояние на скорость реакции? (8). Реакция возможна только при столкновении реагирующих молекул. Поэтому скорость реакции зависит от скорости перемещения частиц. В твердых веществах реакция происходит только на поверхности. Как увеличить скорость реакции между твердыми веществами? (9)

Раздробленное твердое вещество способно реагировать с очень высокими скоростями, вплоть до взрыва. Наверное, вы слышали про страшные взрывы в угольных шахтах. Причина – мельчайшие частички угля в воздухе, которые взрываются от случайной искры.

Реакции, в которых нет поверхности раздела (газ-газ, жидкость-жидкость (смешивающиеся)), называются **гомогенными**. Реакции, в которых есть поверхность раздела (ж-г, т-г, т-т) – **гетерогенными**. Реакция гидролиза жира происходит между жидким жиром (маслом) и водой. К какому типу реакций она относится? (10).

11. Запишите данные реакции в 2 столбика: гомо- и гетерогенные.



2.2.3. Влияние концентрации

Если вы внимательно прочитали главу 2.1, то с легкостью ответите на вопрос: Как влияет концентрация на скорость реакции? (12) Чтобы осуществилось химическое взаимодействие между частицами, они должны эффективно столкнуться. Чем выше концентрация, тем больше частота соударений и тем выше энергия взаимодействующих молекул. Например, в чистом кислороде ацетилен сгорает очень быстро. При этом развивается температура, достаточная для плавления металла.

Как можно увеличить концентрацию вещества в растворе? В газовой фазе? (13) У твердых веществ не учитывают концентрацию, т. к. реакция происходит только на поверхности твердого вещества, а не внутри. Внутри него все атомы находятся в строго определенном положении, и влиять на количество столкновений мы не можем. Известно, что растертый в порошок мел гораздо быстрее растворяется в соляной кислоте, чем равный по массе кусочек мела. Чтобы быстрее растворить кусок сахара в чае, вы его раздавливаете. В промышленности для проведения гетерогенных реакций используют «кипящий слой», чтобы увеличить поверхность соприкосновения реагирующих веществ – обжиг колчедана в производстве серной кислоты.

Однако, если реакция происходит между твердым и жидким веществом или между твердым и газообразным, то можно изменять концентрацию жидкого или газообразного вещества.

2.2.4. Влияние давления и объема

В пунктах 1–3 описано, как влияют на скорость внутренние факторы. Сейчас мы рассмотрим влияние внешних факторов. Концентрация в явном виде входит в основное уравнение химической кинетики, поэтому влияние концентрации очевидно. Но в данном уравнении нет ни давления, ни объема. Однако, если вы вспомните, как связаны (или не связаны) концентрация, объем и давление, вы

сможете ответить на вопрос: влиют ли давление и объем на скорость реакции, и если да, то как? (14)

2.2.5. Влияние температуры

При повышении температуры средняя скорость молекул, их энергия, число столкновений увеличиваются, при этом резко повышается доля «активных» молекул, соударение которых оказывается эффективным. Математически эта зависимость выражается правилом Вант-Гоффа:

$$v_{T_2} = v_{T_1} \gamma^{\frac{T_2 - T_1}{10}} \quad (2.2.1)$$

где v_{T_1} – скорость реакции при температуре T_1 , v_{T_2} – скорость реакции при температуре T_2 . (15) Какой физический смысл имеет температурный коэффициент γ ? Однако не всегда можно бесконечно увеличивать температуру. Многие вещества могут разлагаться, испаряться растворители и т.д.

Задача 1. Рассмотрим реакцию взаимодействия перманганата калия с соляной кислотой. Пусть исходная концентрация перманганата калия 0,01 М. При комнатной температуре раствор обесцветился за 27 секунд. При увеличении температуры на 10 градусов реакция завершилась за 9 секунд. Найдите γ .

Увеличение скорости реакции при возрастании температуры широко используют на производстве при получении различных продуктов химической промышленности: аммиака, серной кислоты, азотной кислоты и др. В главе 2.6 будет рассмотрено влияние температуры на скорость ферментативных реакций. Вы научитесь рассчитывать термодинамические параметры реакций: изменение энтальпии, энтропии и энергии Гиббса в ходе реакции, энтальпию активации и т.д.

2.2.6. Влияние pH

Что такое pH? (16) Скорость многих реакций зависит от кислотности среды. Особенно это касается реакций, протекающих в живых организмах. Причиной этого является то, что если вещество способно к протонированию-депротонированию в растворах, то его различные формы могут обладать различной химической активностью. Например, если вещество А может находиться в двух состояниях: АН и А⁻, то возможны следующие варианты.

1. Только протонированная форма АН вступает в реакцию: АН → В
2. Только депротонированная форма А⁻ вступает в реакцию: А⁻ → В

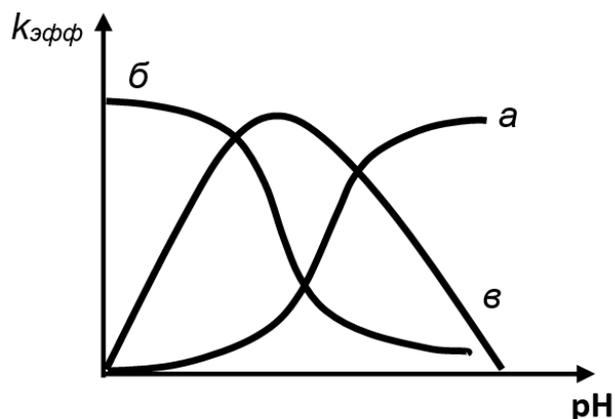


Рис. 2.2.4. Влияние pH на скорость реакции. Вставьте пропущенные слова (17)
 а – активна ... форма, б – ..., в – ...

При фиксированном значении pH скорость таких реакций описывается законом действующих масс:

$$v = k_{эфф}[A]_0 \quad (2.2.2)$$

где сама константа $k_{эфф}$ зависит от pH. В главе 2.6 будет рассмотрено влияние pH на скорость ферментативных реакций. Вы научитесь рассчитывать константы диссоциации функциональных групп, входящих в активный центр ферментов.

2.2.7. Катализаторы и ингибиторы

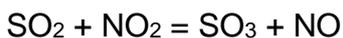
Скорость реакции можно увеличить, введя в реакционную смесь особое вещество. **Катализаторы** – вещества, увеличивающие скорость реакции, но не расходующиеся в ходе реакции. Увеличение скорости реакции называется катализом (от лат. *katalysis* – разрушение). Попробуем понять, как катализатор ускоряет реакцию. Рассмотрим реакцию окисления оксида серы (IV) в оксид серы (VI):



Эта реакция происходит очень медленно. Но если в реакционную смесь попадает оксид азота (II), процесс сильно ускоряется. Оксид азота (II) является катализатором реакции окисления оксида серы (IV). В присутствии катализатора изменяется механизм реакции. Сначала оксид азота (II) взаимодействует с кислородом и превращается в оксид азота (IV):



Затем оксид азота (IV) взаимодействует с оксидом серы (IV):



При этом катализатор выделяется в прежнем виде.

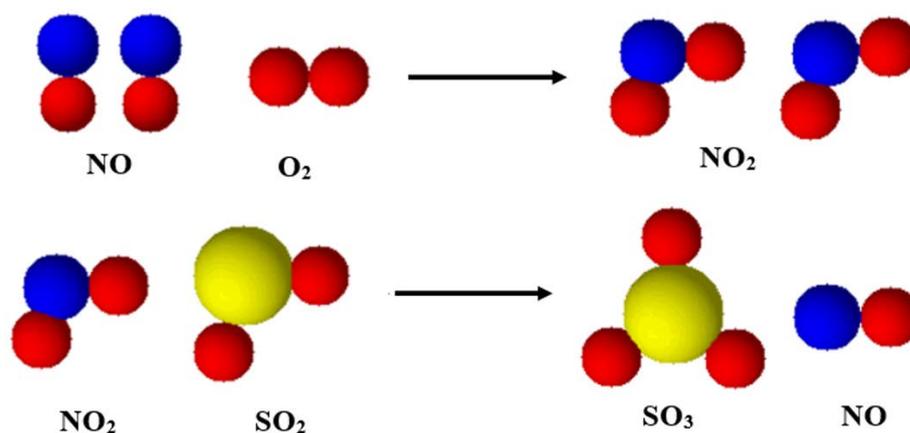


Рис. 2.2.5. Механизм действия катализатора (NO)

Почему же каталитическая реакция в две стадии идет с большей скоростью, чем реакция без катализатора? Вспомните: почему вообще реакции протекают медленно? (18). Катализаторы понижают энергетический барьер (энергию активации, рис. 2.2.6). По рисунку 2.2.6 назовите энергию активации некатализируемой и катализируемой реакций (19).

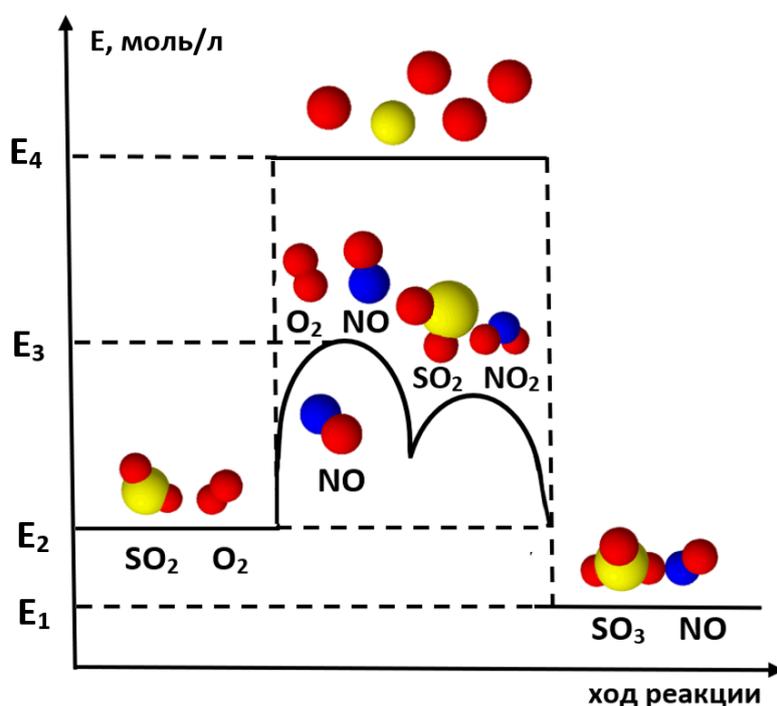


Рис. 2.2.6. Влияние катализатора на энергию активации

Различные катализаторы по-разному снижают энергию активации и, следовательно, ускоряют реакцию. Например, разложение пероксида водорода сильно ускоряет платина, слабее – диоксид марганца, еще слабее – оксид хрома (III). В то же время оксид меди (II) или оксид титана (IV) не влияют на скорость данной реакции. То есть катализаторы селективны.

Таблица 2.2.2

Разложение пероксида водорода с участием различных катализаторов[3]

Катализатор	E_a , кДж/моль	Относительная скорость реакции при комнатной температуре
Без катализатора	70	1
Pt (гетерогенный)	45	2104
Ионы Fe^{2+} (гомогенный)	42	8104
Каталаза	7	$9 \cdot 10^{10}$

Катализаторы широко используют в различных отраслях промышленности и на транспорте. Получение химических продуктов в 80-90% случаев проводят в присутствии катализаторов. Чаще всего это металлы Pt, Fe, Pd, Ni, оксиды алюминия, хрома, марганца, галогениды и т.д.

Различают 2 вида катализа: гомогенный и гетерогенный. Механизм действия гомогенного катализатора состоит в образовании промежуточного вещества (в одной фазе) с меньшей энергией активации (рис. 2.2.5, 2.2.6 – NO_2). В гетерогенном катализе сначала происходит адсорбция, т.е. поглощение молекул реагирующих веществ пористой поверхностью катализатора, с образованием активированного комплекса. Молекулы продуктов не образуют прочных связей с катализатором и десорбируются. Сам катализатор не расходуется в результате реакции, но если на его поверхности адсорбируются другие вещества (каталитические яды), то поверхность становится неработоспособной, требуется регенерация катализатора.

В живых организмах все реакции катализируются ферментами – катализаторами-белками. В отличие от неорганических катализаторов, ферменты чрезвычайно эффективны (ускоряют реакцию до 10^{15} раз) и высокоспецифичны. В одной клетке в одно и то же время протекают тысячи различных реакций, при этом ничего не перепутывается, благодаря высокой специфичности ферментов. Кроме того, они еще и регулируют скорость процессов. Подробно ферментативный катализ будет рассмотрен в следующей главе.

Вопросы и задачи для подготовки к семинару:

1. Как зависит скорость реакции от природы связей?
2. От чего зависит величина энергии активации?
3. Для чего нам нужны спички с точки зрения химии?
4. Поясните числа в реакции образования йодоводорода. Что такое 18,8? И что такое 167,4? Какая это реакция? Нарисуйте энергетическую диаграмму реакции.
5. Чему равна энергия активации распада HI? Какая это реакция?
6. Энергетическая диаграмма двухстадийной реакции.
7. Представьте, что случилось бы, если бы все термодинамически разрешенные реакции могли идти, не имея энергетического барьера?
8. Как влияет агрегатное состояние на скорость реакции?
9. Как увеличить скорость реакции между твердыми веществами?
10. Реакция гидролиза жира происходит между жидким жиром (маслом) и водой. К какому типу реакций она относится?
11. Запишите данные реакции в 2 столбика: гомо- и гетерогенные.

- a) $\text{CO}(\text{г}) + \text{O}_2(\text{г}) \rightarrow$
- b) $\text{S}(\text{т}) + \text{O}_2(\text{г}) \rightarrow$
- c) $\text{CO}_2(\text{г}) + \text{C}(\text{т}) \rightarrow$
- d) $\text{ZnCl}_2(\text{р}) + \text{NaOH}(\text{р}) \rightarrow$
- e) $\text{MgO}(\text{т}) + \text{SiO}_2(\text{т}) \rightarrow$
- f) $\text{Al}_2\text{O}_3(\text{т}) + \text{KOH}(\text{р}) \rightarrow$

12. Как влияет концентрация на скорость реакции?
13. Как можно увеличить концентрацию вещества в растворе? В газовой фазе?
14. Влияют ли давление и объем на скорость реакции, и если да, то как?
15. Какой физический смысл имеет температурный коэффициент γ ?
16. Что такое pH?
17. По рисунку 2.2.4 запишите, какая форма активна: протонированная или депротонированная.
18. Почему реакции протекают медленно?
19. По рисунку 2.2.6 назовите энергию активации некатализируемой и катализируемой реакций.
20. В системе $\text{CO} + \text{Cl}_2 \leftrightarrow \text{COCl}_2$ концентрацию CO увеличили от 0,05 до 0,20 М, а концентрацию Cl_2 - от 0,01 до 0,03 М. Во сколько раз возросла скорость прямой реакции?
21. Во сколько раз изменится скорость реакции $2\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{A}_2\text{B}$, если концентрацию вещества А увеличить в 2 раза, а концентрацию вещества В уменьшить в 2 раза?
22. Во сколько раз следует увеличить концентрацию вещества B_2 в системе $2\text{A}_2 + \text{B}_2 \rightarrow 2\text{A}_2\text{B}$, чтобы при уменьшении концентрации вещества А в 4 раза скорость реакции не изменилась?
23. Составьте кинетическое уравнение гетерогенной реакции цинка с серной кислотой, учитывая, что цинк находится в твердом состоянии. Вычислите скорость реакции, если концентрация кислоты составляет 0,1 М, а константа скорости равна 0,016.
24. Изменится ли скорость реакции взаимодействия железа с хлором, если в системе увеличить давление?
25. Почему продукты хранят в холодильнике?
26. Объясните, почему смесь кислорода и водорода может сохраняться долго, но достаточно искры или вспышки спички, чтобы произошел взрыв?
27. Реакция разложения оксида азота (V) $2\text{N}_2\text{O}_5 = 2\text{N}_2\text{O}_4 + \text{O}_2$ при температуре 10 °С происходит со скоростью 0,0004 моль/л·с, а при температуре 50 °С – со скоростью 0,0064 моль/л·с. Во сколько раз увеличивается скорость реакции при повышении температуры на каждые 10 °С?
28. Скорость химической реакции при 20 °С равна 1 моль/л с. Вычислите скорость этой реакции при 60 °С, если температурный коэффициент равен 3.
29. Почему на мукомольных заводах иногда происходят взрывы?
30. Почему жидкий бензин и этанол горят спокойно (вспомните горение спирта в спиртовке), а пары этих веществ в смеси с воздухом взрываются?

Ответы на задачи:

- 1. 3
- 21. 12
- 22. 2

Глава 2.3. Ферментативный катализ

1. Второй закон термодинамики в живых клетках.
2. Как ферменты ускоряют реакции?
3. Термодинамика ферментативных реакций.
4. Как клетки могут осуществлять энергетически неблагоприятные реакции?
5. Определение кинетических и термодинамических параметров ферментативной реакции.

2.3.1. Второй закон термодинамики в живых клетках

В предыдущих главах описана кинетика реакций, протекающих в неживой природе. В этой главе мы начинаем знакомство с процессами, поддерживающими жизнь. Еще в школе вы изучили отличия живой природы и неживой. Вопрос 1: вспомните эти отличия, особенности живой природы.

Одно из отличий заключается в невероятной красоте и симметрии творений живой природы.

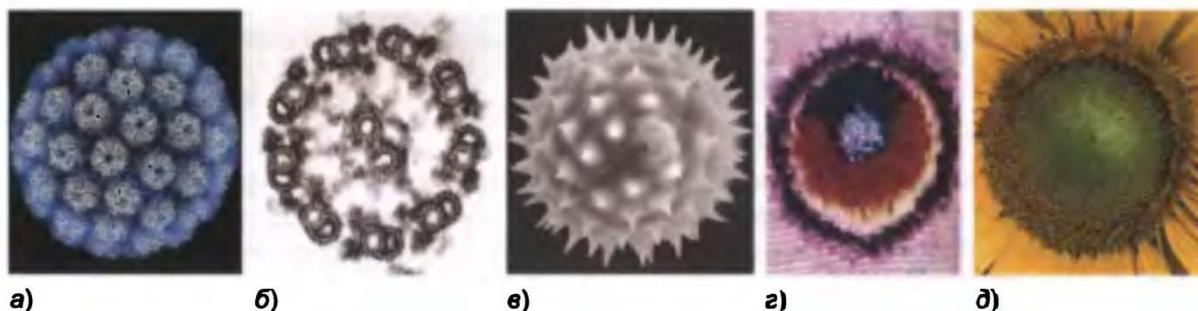


Рис. 2.3.1. Порядок и беспорядок в биологических структурах. В порядке увеличения размера: а) белковые молекулы в оболочке вируса; б) регулярное расположение микротрубочек на поперечном срезе хвостика сперматозоида; в) клетка пыльцы; г) крыло бабочки. Узор создан чешуйками (клетками); д) спиральное расположение семян в головке подсолнуха [7]

Как можно построить такие удивительно сложные структуры? Конечно же, за счет биоспецифических взаимодействий. В любой момент времени в клетках протекают тысячи химических реакций. В некоторых из них энергия выделяется, клетка запасает ее и использует в других процессах, необходимых для жизни. Во многих реакциях большие структуры распадаются до маленьких. Из этих продуктов распада клетка строит себя, создает гармонию. И вот здесь возникает вопрос: не нарушается ли в клетках второй закон термодинамики?

В замкнутой системе процессы всегда идут в сторону увеличения беспорядка. Думаю, все вы наблюдали этот закон в жизни. Например, если в комнате (или в шкафу) долго не убираться, как-то так само собой получается, что беспорядок увеличивается. А вот в обратную сторону *самопроизвольно никогда!* Но возможно ли навести порядок? Да, но для этого требуются усилия!

Рассмотрим этот закон с точки зрения теории вероятности. Представьте, что вы взяли 100 монет, положили все монеты орлами вверх в коробку, закрыли ее

и начали энергично трясти. Что вы увидите, когда откроете коробку? Попробуем объяснить результат с помощью второго закона термодинамики. Сколько существует вариантов, чтобы все монеты лежали орлами вверх? Очевидно, что только один вариант. А сколько вариантов, чтобы 1 монета лежала решкой вверх, а 99 орлами вверх? (2) Чтобы 2 монеты лежали решкой вверх? (3) А 50 монет решкой вверх? Здесь сосчитать труднее, поэтому я просто назову число: для того, чтобы расположить 50 монет решкой вверх, а 50 – орлами вверх, существует примерно 10^{30} вариантов!

Видно, что вариант 50/50 наиболее вероятный, и следовательно, такая комбинация – наиболее разупорядоченная. Вариант 49/51 – примерно в 10 раз менее вероятный. Можно ли сосчитать величину беспорядка? Выразить ее количественно? Мерой беспорядка является **энтропия**. Чем больше хаоса – выше энтропия. Математически этот закон выражает формула Больцмана (выгравирована на его надгробии):

$$S = k \ln W \quad (2.3.1)$$

где $k=R/N_A = 1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К – постоянная Больцмана; W - число микросостояний, которыми реализуется данное макросостояние.

Сосчитайте изменение энтропии, происходящее при встряхивании коробки, т.е. переход из состояния абсолютный порядок (все орлы вверх) в состояние – полный хаос (50/50) (4). Изменение энтропии в единицах э.е./моль коробок? (5).

Живые клетки синтезируют крупные молекулы из мелких, формируют строго упорядоченные надмолекулярные комплексы, органеллы, клетки, ткани, органы, целый организм. То есть они создают порядок. Получается, они нарушают второй закон термодинамики? Нет, не нарушают. Закон справедлив для замкнутой системы. Клетка – открытая система. Живые организмы, понижают энтропию внутри себя за счет увеличения энтропии снаружи. Они «питаются отрицательной энтропией». То есть, клетки используют на полезную работу только часть поглощенной энергии. Неиспользованная часть выбрасывается в виде тепла.

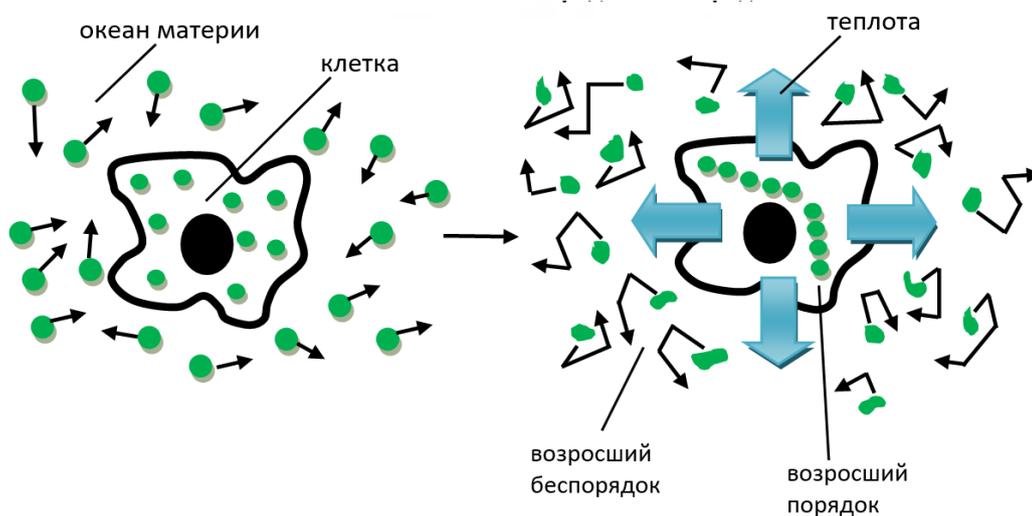


Рис. 2.3.2. Термодинамика живой клетки

Причем, это относится не только к живым организмам, а ко всем процессам во Вселенной. Все, что не используется, превращается в тепло. Наглядным примером является сила трения. Выделяющаяся теплота является самой

неупорядоченной формой энергии, она представляет собой хаотичную толчею молекул. Эта теплота разупорядочивает окружающую среду, поэтому суммарная энтропия процессов всегда возрастает. Второй закон термодинамики никогда не нарушается.

2.3.2. Как ферменты ускоряют реакции?

В предыдущей главе было показано, что в реакцию могут вступать только молекулы, обладающие энергией выше определенной величины (энергии активации). Мы видели на рисунке 2.2.1, что таких молекул очень и очень мало. Поэтому реакции идут медленно, а некоторые практически незаметны. Но если в среду, где присутствуют реагенты, ввести фермент, реакция может протекать практически мгновенно. Как ферменты делают это?

Если дать краткий и простой ответ: ферменты понижают энергию активации. Посмотрим на рисунок 2.3.3. Он очень похож на рисунок 2.2.1 в предыдущей главе, но мы видим, что здесь показаны 2 энергии активации. И число молекул, обладающих энергией активации катализируемой реакции существенно больше (на несколько порядков).

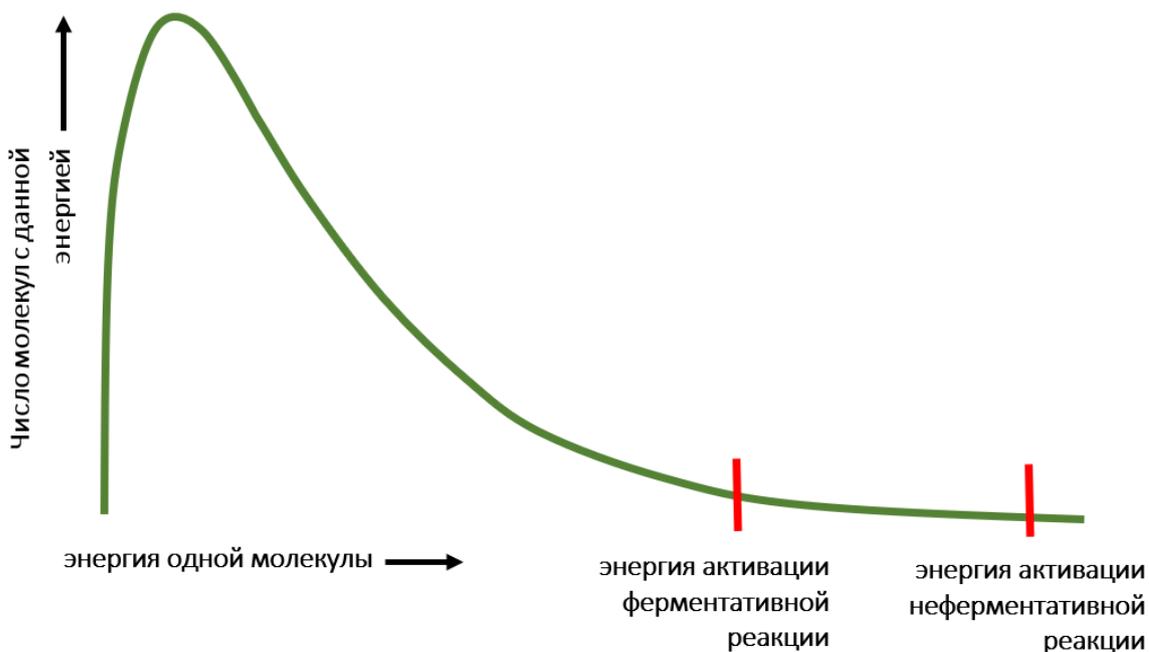


Рис. 2.3.3. Распределение молекул по энергиям

Поэтому ферменты являются чрезвычайно эффективными катализаторами. Они способны ускорять реакцию до 10^{15} раз! И снова поднимем главный вопрос, правда, уже в новой формулировке. За счет чего ферменты ускоряют реакции? Первый ответ мы уже сформулировали: они понижают энергию активации. Но тогда возникает следующий вопрос: как они понижают энергию активации?

Попробуем найти причины ускорения в структуре их активного центра. Активный центр фермента — это уникальная структура, созданная в ходе эволюции. Думаю, не будет преувеличением сказать, что все реакции, любые преобразования и процессы в клетке, вся работа вообще осуществляется с помощью активных

центров. Ферменты - «самые умные» молекулы, только они способны узнавать и преобразовывать субстрат в продукт. И главная причина ускорения как раз заключается в том, что благодаря структуре активного центра ферменты могут **связать субстрат так, чтобы использовать энергию сорбции для преобразования субстрата в продукт.**

Существует множество моделей, описывающих, как фермент может использовать энергию сорбции. У многих из них довольно образные названия и вы можете составить себе некоторое представление о механизме использования энергии сорбции уже по одним названиям: механизм связывания переходного состояния, механизм стабилизации переходного состояния, механизм сближения и ориентации, теория индуцированного соответствия, механизм напряжения, механизм дыбы, щелевой эффект и т.д. Математически, с помощью энергий, данный механизм ускорения обосновывается, например, в литературе [1]. Либо вы можете познакомиться глубже с механизмами ускорения в лекциях по энзимологии [4,5,6].

Вторая причина заключается в том, что в активном центре фермента в нужных точках пространства стоят различные функциональные группы, которые согласованно выполняют всю работу. Эту причину можно назвать **полифункциональный катализ** (кислотно-основный, нуклеофильно-электрофильный и т. д.)

И третью причину мы тоже найдем в активном центре. Активный центр ферментов можно представить как карман, некоторое углубление в глобуле. Часто он формируется как щель между отдельными доменами или внутри одного домена между вторичными структурами. Так как эта область пространственно отделена от поверхности белка, то ее состав и характеристики отличаются от среды цитоплазмы или другой органеллы, где находится фермент. Они могут различаться по вязкости, полярности, диэлектрической проницаемости и т. д. То есть, сама среда пространства активного центра тоже способствует формированию фермент-субстратного комплекса и преобразованию субстрата. Эту причину называют **эффект микросреды** активного центра.

Структура активного центра объясняет и еще одно важное отличие ферментов от неорганических катализаторов – чрезвычайную специфичность. Ферменты опознают свой субстрат из миллиардов других молекул, связывают его и преобразуют в продукт. С чего начинается это взаимодействие? Как фермент и субстрат находят друг друга? Первый контакт осуществляется в результате простого броуновского движения. Все частицы в пространстве движутся, кувыркаются, искривляются, сталкиваются. По очень грубым усредненным оценкам за 1 секунду активный центр фермента испытывает около 500 тысяч соударений с молекулами субстрата. Как только фермент и субстрат столкнулись друг с другом, между ними формируются слабые связи. Чем больше таких связей, тем прочнее связь фермента с субстратом и тем медленнее скорость их диссоциации. Если связей мало, то энергия теплового движения оказывается больше энергии связей и такие молекулы быстро отделяются друг от друга. Если же поверхности фермента и субстрата комплементарны друг другу, то между ними образуется большое количество связей, стабилизирующее фермент-субстратный комплекс. В таком комплексе и происходит превращение субстрата в продукт.

2.3.3. Термодинамика ферментативных реакций

Теперь сопоставим молекулярные картинки, описанные выше (другими словами, механизмы реакций) с законами термодинамики. Даже такие волшебные молекулы как ферменты не могут нарушить закон. Да, они чудесным образом ускоряют реакции в миллиарды раз, но они ускоряют только те реакции, которые, пусть и очень-очень медленно, но все же, протекают и без ферментов. Ферменты не изменяют и константу равновесия. Во сколько раз они ускоряют прямую реакцию, во столько же раз и обратную. Вспомните барьер реакции. Если он становится ниже, то насколько легче его перепрыгнуть слева направо, на столько же и справа налево.

Согласно второму закону термодинамики, реакция протекает только в том случае, если она ведет к возрастанию беспорядка во Вселенной. Для характеристики изменения беспорядка во вселенной используют свободную энергию Гиббса G данной химической реакции. **Энергия Гиббса** и энтропия связаны друг с другом следующей формулой:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.3.2)$$

где ΔG – изменение энергии Гиббса в ходе реакции, ΔH – изменение энтальпии, T – температура, ΔS – изменение энтропии.

Энергетически благоприятны реакции, для которых $\Delta G < 0$. Это одна из формулировок второго закона термодинамики. Примерами энергетически благоприятных реакции можно считать распрямление сжатой пружины, растворение соли (сахара) в воде. Энергетически неблагоприятные реакции – образование пептидной связи, синтез нуклеиновых кислот, синтез мембранных липидов (само не происходит). Все реакции синтеза, протекающие в клетке, приводят к увеличению энергии Гиббса и понижению энтропии. Все они могут происходить только за счет других реакций, в результате которых энергия выделяется. Такая реакция сможет произойти только тогда, когда она будет сопряжена с другой реакцией, в которой уменьшение энергии Гиббса будет больше (по модулю), чем увеличение G в неблагоприятной реакции. То есть суммарное изменение энергии Гиббса в ходе двух сопряженных реакций должно быть отрицательным. Тогда второй закон термодинамики не нарушается.

Изменение энергии Гиббса в какой реакции должно быть больше по модулю: $A \rightarrow B$ или $C \rightarrow D$? (рис. 2.3.4)? (6).



Рис. 2.3.4. При каком соотношении энергий Гиббса возможно протекание энергетически неблагоприятной реакции?

Из формулы 2.3.2 видно, что изменение энергии Гиббса зависит от температуры. И при понижении температуры ценность хаоса понижается, т. е. энтропия играет меньшую роль, чем при более высокой температуре. А зависит ли ΔG от концентрации реагентов? И да, и нет. Чем выше концентрация исходных

реагентов, тем чаще они будут сталкиваться, и тем выше будет скорость прямой реакции. При этом если будут увеличены концентрации продуктов реакции, то они тоже будут чаще сталкиваться, и возрастет скорость обратной реакции. То есть, на благоприятность процесса влияет не само изменение концентрации, а именно отношение концентраций исходных веществ и продуктов реакции. Чем выше это отношение, тем более благоприятна прямая реакция. Математически для реакции



изменение энергии Гиббса прямой реакции от концентраций реагентов зависит следующим образом:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln [X]/[Y] \quad (2.3.3)$$

где ΔG^0 – изменение стандартной энергии Гиббса. Постараемся понять, что показывает эта величина. Из выражения 2.3.3 следует, что если концентрации исходных веществ и продуктов реакции равны 1 М, то $\Delta G = \Delta G^0$. А это значит, что ΔG^0 показывает, каким будет изменение энергии Гиббса в реакции, если концентрации исходных веществ и продуктов реакции равны 1 М. При увеличении концентрации продуктов ΔG прямой реакции становится все более положительным, а реакция – менее благоприятной. И наоборот: при увеличении концентрации исходных веществ ΔG прямой реакции принимает все более отрицательные значения, и реакция становится более благоприятной.

Если в конкретных условиях данная реакция благоприятна, то как долго она будет протекать? Понятно, что в ходе реакции концентрация X растет, Y падает, значит второе слагаемое становится все более положительным. И настанет такой момент, когда ΔG станет равным нулю. То есть протекание реакции в ту и другую сторону одинаково благоприятно (одинаково неблагоприятно). Это состояние называется **равновесием**. В состоянии равновесия концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции будут оставаться постоянными (равновесные концентрации) до тех пор, пока не изменятся внешние параметры реакции. Так как в состоянии равновесия $\Delta G = 0$, получаем:

$$\Delta G^0 = -RT \ln [X]_{\text{равн}} / [Y]_{\text{равн}} \quad (2.3.4)$$

Но, известно, что отношение концентраций при равновесии обозначается величиной K – **константой равновесия**, тогда можно записать:

$$K = [X]_{\text{равн}} / [Y]_{\text{равн}} \\ \Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2.3.5)$$

То есть, ΔG^0 связано с константой равновесия реакции: чем больше константа равновесия, тем более отрицательной будет ΔG^0 , тем более благоприятной будет прямая реакция. Очевидно, что, если протекание реакции в прямом направлении благоприятно с энергетической точки зрения, значит можно получить достаточно много продуктов. И наоборот, если протекание реакции в прямом направлении неблагоприятно, значит реакция остановится рано, и концентрации продуктов будут намного меньше концентраций исходных веществ.

Если подставить выражение 2.3.4 в выражение 2.3.3, получим:

$$\begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln [X]_{\text{равн}} / [Y]_{\text{равн}} + RT \ln [X] / [Y] = RT (\ln [X] / [Y] - \ln [X]_{\text{равн}} / [Y]_{\text{равн}}) = \\ &= RT \ln ([X] * [Y]_{\text{равн}} / [X]_{\text{равн}} * [Y]) \end{aligned} \quad (2.3.6)$$

Выражение 2.3.6 раскрывает еще один важный смысл изменения энергии Гиббса в ходе реакции. Из него следует, что изменение энергии Гиббса в конкретных условиях, при определенных концентрациях исходных веществ и продуктов реакции, зависит от того, насколько далеки их концентрации от равновесных. Если они соответствуют равновесным, то реакция протекать не будет ($\Delta G = 0$). Рассмотрите возможные варианты соотношения концентраций исходных веществ и продуктов реакции и напишите, в какую сторону будет протекать реакция (7). Рассчитайте изменение энергии Гиббса для реакций, в которых $K = 10^{-5}, 1, 10^5$ (8).

Связаны ли как-то константы скоростей прямой и обратной реакций с константой равновесия? Согласно закону действующих масс:

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1 [Y] \\ v_2 &= k_2 [X] \end{aligned} \quad (2.3.8)$$

где v_1 – скорость прямой реакции, v_2 – скорость обратной реакции, k_1 – константа скорости прямой реакции, k_2 – константа скорости обратной реакции. При наступлении равновесия концентрации веществ не меняются, и скорость прямой реакции равна скорости обратной. То есть

$$\begin{aligned} v_1 &= v_2 \\ k_1 [Y]_{\text{равн}} &= k_2 [X]_{\text{равн}} \\ k_1 / k_2 &= [X]_{\text{равн}} / [Y]_{\text{равн}} = K \end{aligned} \quad (2.3.9)$$

Из выражения 2.3.9 следует, что константа равновесия равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакции, т.е. она показывает во сколько раз константа скорости прямой реакции больше константы скорости обратной. Если взять концентрации исходных веществ и продуктов реакции по 1 М, то константа равновесия показывает во сколько раз скорость прямой реакции больше скорости обратной (в данном случае константы скоростей равны скоростям реакций). Обратите внимание, что константа равновесия связана именно с соотношением скоростей (констант скоростей), а не с абсолютными значениями скоростей реакции. Реакции могут протекать быстро, но при этом с низким выходом продуктов реакции. И наоборот, реакции могут проходить с высоким выходом продуктов, но с очень маленькой скоростью.

Все эти законы и процессы, о которых мы сейчас говорили, справедливы для любой химической реакции. Но что происходит в присутствии фермента? Он понижает барьер реакции, но при этом пропорционально возрастают скорости прямой и обратной реакции, поэтому константа равновесия не меняется, энергия Гиббса не меняется, и значит, в клетке могут протекать только реакции, разрешенные вторым законом термодинамики (Рис. 2.3.5).

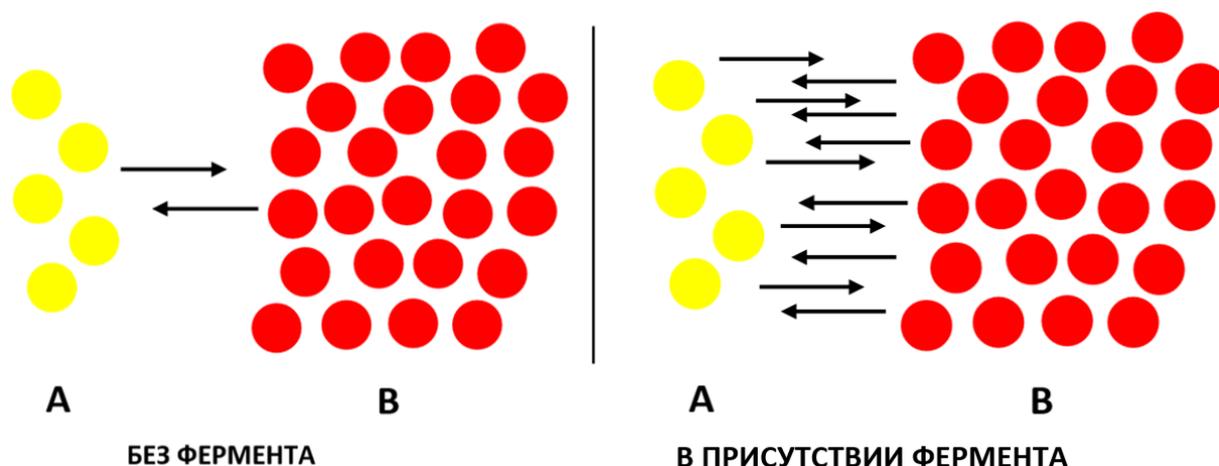


Рис. 2.3.5. Ферменты не меняют константу равновесия.

Однако, если вспомнить биохимию клетки, то можно обнаружить, что в ней протекают и реакции с увеличением энергии Гиббса. Приведите пример реакции в живых организмах, идущей с увеличением энергии Гиббса либо с понижением энтропии. И объясните кажущееся нарушение второго закона термодинамики (9).

2.3.4. Как клетки могут осуществлять энергетически неблагоприятные реакции?

Мы уже знаем, что на направление реакции влияет концентрация веществ. Но как практически клетки могут использовать этот факт? То есть, если энергия Y выше энергии X , а мы хотим осуществлять превращение $X \rightarrow Y$, то как мы должны изменить их концентрации? Из выражения 2.3.3 следует, что можно повысить концентрацию X или понизить концентрацию Y . Повышать концентрации сложнее, а в некоторых случаях опасно. А вот понизить можно, если вновь образующиеся молекулы Y почти сразу же использовать в другой реакции, например, превращая их в молекулы Z :



Энергетически неблагоприятная реакция может осуществляться за счет второй, сопутствующей реакции (рис. 2.3.6).

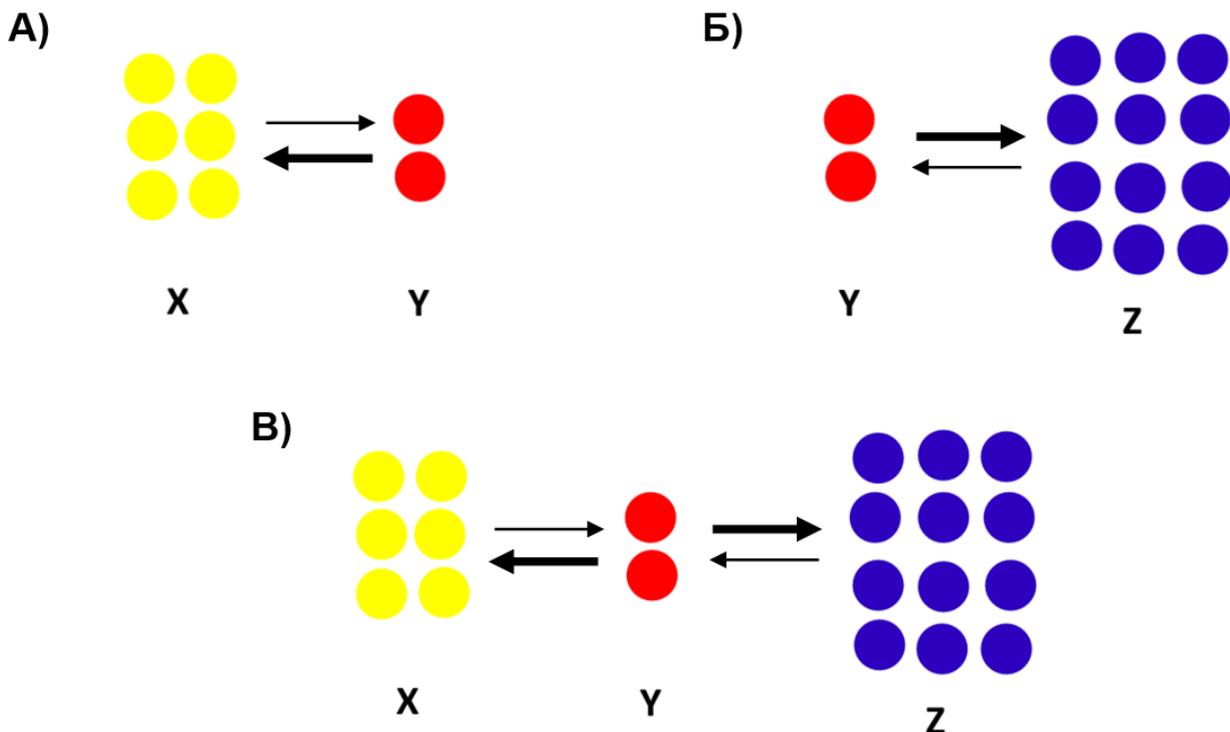


Рис. 2.3.6. Смещение равновесия в сторону неблагоприятной реакции: а) состояние равновесия $X \leftrightarrow Y$; б) состояние равновесия $Y \leftrightarrow Z$; в) сопряженная реакция. Первая стадия осуществляется за счет постоянного понижения концентрации Y

По рисунку 2.3.6 определите константы равновесия и изменение энергии Гиббса в трех реакциях: $X \rightarrow Y$, $Y \rightarrow Z$; $X \rightarrow Z$. (10)

Неблагоприятная реакция $X \rightarrow Y$ самопроизвольно не происходит ($\Delta G^0 > 0$), но если концентрация Y понижается за счет второй реакции $Y \rightarrow Z$, то первая реакция оказывается возможной. То есть энергетически неблагоприятное превращение в клетке может произойти, если фермент, катализирующий эту реакцию, дополняется вторым ферментом, который катализирует энергетически благоприятную реакцию. Вторая реакция работает как сифон: вытягивает на себя вещество Y . Или можно представить работу двух команд: команда из сильных участников (реакция $Y \rightarrow Z$) вытягивает команду из слабых игроков (реакция $X \rightarrow Y$). Например, некоторые реакции на длинном пути получения сахаров из CO_2 и H_2O сами по себе энергетически неблагоприятны. Тем не менее, фотосинтез работает благодаря другим реакциям, которые как бы вытягивают «запрещенные» реакции.

Вопросы для подготовки к семинару:

1. Назовите отличия живой природы от неживой, особенности живой природы.
2. Сколько существует вариантов, чтобы 1 монета лежала решкой вверх, а 99 орлами вверх?
3. Чтобы 2 монеты лежали решкой вверх?
4. Сосчитайте изменение энтропии, происходящее при встряхивании коробки, т.е. переход из состояния абсолютный порядок (все орлы вверх) в состояние – полный хаос (50/50).
5. Изменение энтропии в единицах э.е./моль коробок?

6. Изменение энергии Гиббса в какой реакции должно быть больше по модулю: $A \rightarrow B$ или $C \rightarrow D$? (рис. 4)?
7. Рассмотрите возможные варианты соотношения концентраций исходных веществ и продуктов реакции и напишите, в какую сторону будет протекать реакция.
8. Рассчитайте изменение энергии Гиббса для реакций, в которых $K = 10^{-5}, 1, 10^5$
9. Приведите пример реакции в живых организмах, идущей с увеличением энергии Гиббса либо с понижением энтропии. И объясните кажущееся нарушение второго закона термодинамики.
10. По рисунку 6 определите константы равновесия и изменение энергии Гиббса в трех реакциях: $X \rightarrow Y, Y \rightarrow Z; X \rightarrow Z$.

Глава 2.4. Кинетика ферментативных реакций. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости

1. Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен.
2. Природа константы K в уравнении Михаэлиса-Ментен.
3. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости.

2.4.1. Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен

О существовании ферментов ученые узнали еще в конце 19 века. При изучении скорости ферментативных реакций оказалось, что в отличие от обычных реакций, скорость ферментативных реакций нельзя описать уравнением второго порядка, как для обычных неферментативных реакций.

В 1902 году Браун и независимо от него Анри в 1903 году выдвинули гипотезу об образовании в ходе реакции **фермент-субстратного комплекса**. В 1913 году Михаэлис и Ментен, развив их идеи, предположили, что ферментативные реакции можно описать схемой



В данной схеме (и вообще во всей биохимической литературе) E – фермент, S – субстрат, ES – фермент субстратный комплекс, P – продукт, K_s – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_2 – константа скорости превращения фермент-субстратного комплекса в продукт.

Михаэлис и Ментен вывели зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата для модели 2.4.1, в которой равновесие между свободными ферментом, субстратом и фермент-субстратным комплексом устанавливается быстро по сравнению со скоростью реакции (**быстро устанавливающееся равновесие**). В этом случае вторая стадия реакции практически не влияет на установление равновесия, поэтому концентрации фермента, субстрата и фермент-субстратного комплекса можно считать равновесными. Можно представить сосуд, в котором устанавливается равновесие, и в котором имеется очень маленькое отверстие, из которого по каплям вытекает фермент-субстратный комплекс. Скорость вытекания комплекса практически никак не повлияет на установление равновесных концентраций.

Применим к данной схеме закон действующих масс. Из схемы 2.4.1 видно, что продукт образуется из фермент-субстратного комплекса с константой скорости k_2 . Поэтому скорость реакции

$$d[P]/dt = v = k_2[ES] \quad (2.4.2)$$

Так как концентрация фермента соответствует равновесной концентрации, выразим ее из константы равновесия

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \Rightarrow [E] = \frac{K_s[ES]}{[S]} \quad (2.4.3)$$

Из схемы видно, что фермент, который внесли в инкубационную смесь E_0 , присутствует там в двух состояниях: свободный E и связанный с субстратом

ES. Запишем уравнение материального баланса и подставим в него концентрацию фермента из выражения 2.4.3

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [ES] (K_s/[S] + 1) \quad (2.4.4)$$

Тогда концентрация фермент-субстратного комплекса равна:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (2.4.5)$$

Зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от концентрации субстрата соответствует изотерме адсорбции Ленгмюра. Это говорит о том, что фермент работает как гетерогенный катализатор, на котором адсорбируется субстрат. Подставив выражение 2.4.5 в 2.4.2, получим:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (2.4.6)$$

Выражение 2.4.6 и есть **уравнение Михаэлиса-Ментен**, описывающее зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Однако чаще его записывают в другом виде. Вернемся к уравнению 2.4.2, из которого видно, что скорость реакции будет тем больше, чем выше концентрация фермент-субстратного комплекса. Из выражения 2.4.5 видно, что максимальная концентрация фермент-субстратного комплекса $[ES]_{max}$ равна общей концентрации фермента E_0 . И достигается она, когда концентрация субстрата намного больше константы диссоциации (избыток субстрата).

$$V_{max} = k_2[ES]_{max} = k_2[E]_0 \quad (2.4.7)$$

Подставим выражение 2.4.7 в уравнение 2.4.6, получим другую форму записи уравнения Михаэлиса-Ментен.

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]} \quad (2.4.8)$$

И так, в обычных химических реакциях нет такого понятия - максимальная скорость. В них скорость реакции зависит от концентрации субстрата по закону действующих масс. В ферментативных реакциях для каждой концентрации фермента существует свой предел скорости – **максимальная скорость**. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса-Ментен (2.4.6, 2.4.8).

2.4.2. Природа константы K в уравнении Михаэлиса-Ментен

У самых вдумчивых студентов здесь может возникнуть вопрос: почему в уравнении Михаэлиса стоит константа диссоциации, а не константа Михаэлиса? Оказывается, в зависимости от конкретной ситуации, там действительно иногда может стоять константа диссоциации, но все-таки, в большинстве случаев должна стоять константа Михаэлиса. Давайте разберемся с этой путаницей.

Вспомним, в пункте 2.4.1 было сказано, что Михаэлис и Ментен вывели свое уравнение для быстро устанавливающегося равновесия. То есть, если вы работаете

с ферментом, о котором вам известно, что в смеси его с субстратом быстро устанавливается равновесие, то, вы смело можете использовать для обработки результатов уравнение 2.4.8, находить константу и называть ее константой диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Но что делать, если вам ничего не известно о времени установления равновесия? Можно ли пользоваться уравнением Михаэлиса-Ментен? К счастью, да. Оказывается, это уравнение тем и универсально, что его общий вид сохраняется и в случае медленно устанавливающегося равновесия, и даже в присутствии ингибиторов, изменении pH и температуры. Вот только смысл самой константы меняется. Во всех случаях, кроме быстро устанавливающегося равновесия, вместо константы диссоциации будет стоять константа Михаэлиса. Сейчас мы разберемся с тем, чем она отличается от константы диссоциации.

В 1925 году Бриггс и Холдейн вывели уравнение Михаэлиса-Ментен для реакций, в которых не выполнено условие о быстро устанавливаемом равновесии. Представим, как вообще происходит ферментативная реакция. В первые моменты времени (обычно интервал нескольких микросекунд) фермент только начинает сталкиваться с субстратом и образовывать фермент-субстратный комплекс. Эта стадия реакции называется **предстадионарная**. В ходе нее концентрация фермент-субстратного комплекса растет от нуля до какой-то стационарной концентрации, которая не меняется в ходе реакции. Далее следует **стадионарная** стадия. В ходе нее фермент-субстратные комплексы постоянно образуются и распадаются, при этом скорость образования комплексов равна скорости распада. То есть в ходе стадионарной стадии концентрация фермент-субстратного комплекса, а следовательно, и скорость реакции остается постоянной. Обычно все измерения, которые мы проводим, соответствуют именно этой стадии. Когда большая часть субстрата уже превратилась в продукт, концентрация фермент-субстратного комплекса и скорость реакции постепенно уменьшается.

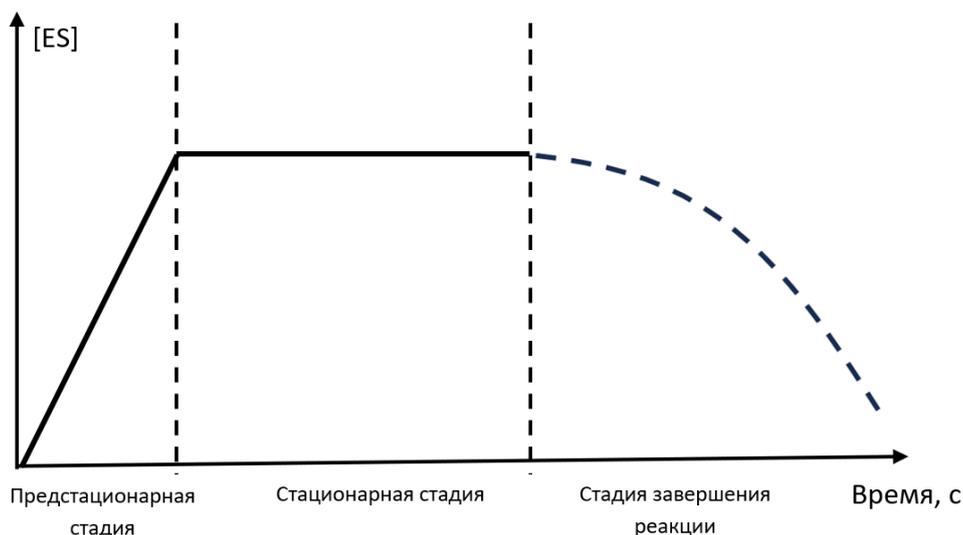


Рис. 2.4.1. Зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса от времени

И так, Бриггс и Холдейн сформулировали **принцип стационарности**

$$d[ES]/dt = 0 \tag{2.4.9}$$

И схема 2.4.1 Михаэлиса-Ментен в их выводе немного изменилась. Объясните, что изменилось в схеме и почему? (1.)



Из схемы видно, что фермент-субстратный комплекс образуется из свободных фермента и субстрата с константой скорости k_1 . А вот распадается фермент-субстратный комплекс по двум направлениям: в обратную сторону с выходом субстрата с константой скорости k_{-1} и в сторону образования продукта с константой скорости k_2 . Тогда изменение концентрации фермент-субстратного комплекса от времени описывается зависимостью:

$$d[ES]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (2.4.11)$$

Выразим концентрацию свободного фермента через $[ES]$:

$$[E] = (k_{-1} + k_2)[ES]/k_1[S] \quad (2.4.12)$$

По сути, вывод Михаэлиса-Ментен отличается от вывода Бриггса и Холдейна только этим пунктом (сравните с выражением 2.4.3). Далее все аналогично. Подставим выражение для E в уравнение материального баланса:

$$[E]_0 = [E] + [ES] = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1[S]} + 1 \right) [ES] = \left(\frac{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}{k_1[S]} \right) [ES] \quad (2.4.13)$$

и выразим отсюда концентрацию фермент-субстратного комплекса

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{[S][E]_0}{K_M + [S]} \quad (2.4.14)$$

где $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ – константа Михаэлиса.

И так, все волшебство произошло на последнем шаге. Поделив числитель и знаменатель дроби на k_1 , и введя новую константу – константу Михаэлиса, мы сохранили общий вид уравнения Михаэлиса-Ментен (сравните с выражением 2.4.5). Теперь остается подставить выражение 2.4.14 в выражение для скорости реакции 2.4.2 и получить новый вид уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.4.15)$$

И так, все три уравнения: 2.4.6, 2.4.8 и 2.4.15 описывают зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и называются уравнениями Михаэлиса-Ментен. Уравнение 2.4.15 можно использовать для описания практически всех ферментативных реакций. Уравнения 2.4.6 и 2.4.8 описывают только зависимости для реакций, в которых выполнено условие о быстро устанавливаемом равновесии.

Есть ли что-то общее между константой диссоциации и константой Михаэлиса? По своей природе обе эти константы равновесные, у них одинаковая размерность – моль/л. Константа диссоциации $K_S = k_{-1}/k_1$ и характеризует сродство субстрата к ферменту. Константа Михаэлиса определяется выражением:

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 = K_S + k_2 / k_1 \quad (2.4.16)$$

В большинстве случаев можно сказать, что она тоже характеризует сродство субстрата к ферменту, но, как видно из выражения 2.4.16, это не совсем правильно. Если только выполнено условие, что $k_2 \ll k_{-1}$, тогда в числителе можно пренебречь вторым слагаемым. А это и есть условие быстро устанавливающегося равновесия.

Смысл константы Михаэлиса можно вывести из уравнения Михаэлиса-Ментен. Найдем, чему будет равна скорость реакции, если взять концентрацию субстрата, равную константе Михаэлиса ($[S] = K_M$).

$$v_0 = \frac{V_{\max} K_M}{2K_M} = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.4.17)$$

Следовательно: **константа Михаэлиса показывает ту концентрацию субстрата, при которой скорость реакции равна половине от максимальной скорости.** Это и есть ее физический смысл. Предположим, в вашем эксперименте вы определили $K_M = 1 \text{ мМ}$. Что это значит? То есть, если вы возьмете концентрацию субстрата 1 мМ, то в вашем эксперименте будет достигнута скорость реакции, равная половине максимальной скорости. Если возьмете концентрацию меньше, чем 1 мМ, то скорость будет меньше, чем $\frac{1}{2} V_{\max}$. Если возьмете больше, чем 1 мМ, то скорость будет больше, чем $\frac{1}{2} V_{\max}$.

2.4.3. Определение константы Михаэлиса и максимальной скорости

Из уравнения Михаэлиса-Ментен следует, что скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата нелинейно, т.к. она присутствует в числителе и знаменателе. Данная зависимость представляет собой гиперболу (рис. 2.4.2).

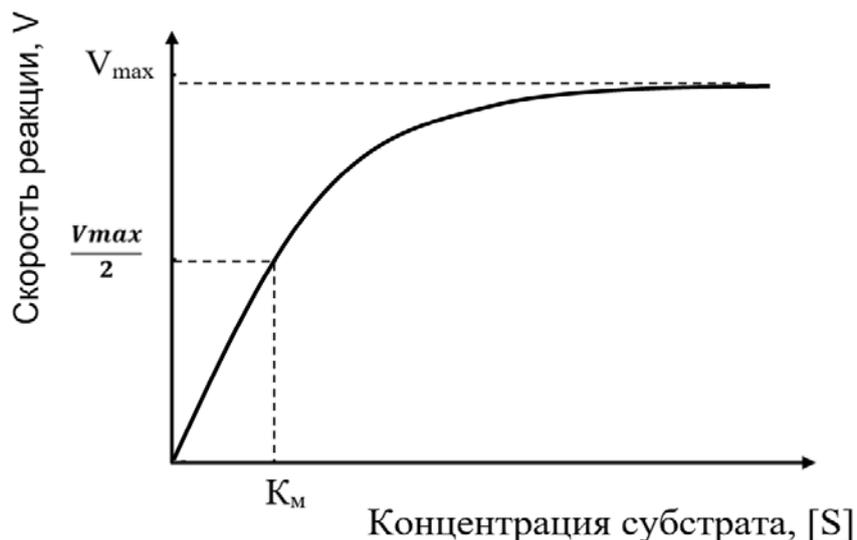


Рис. 2.4.2. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

Видно, что при маленьких концентрациях субстрата скорость линейно растет с увеличением концентрации, затем скорость роста замедляется. При больших концентрациях субстрата скорость реакции остается постоянной. То есть максимальную скорость реакции определяем по горизонтальной линии. Теперь поделим максимальную скорость на 2 и опустим перпендикуляр на ось абсцисс. Это

и есть константа Михаэлиса – значение концентрации субстрата, при которой, скорость реакции равна половине от максимальной.

Однако этот способ определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса неудобен по нескольким причинам. Во-первых, для того чтобы построить гиперболу, требуется провести достаточно большое количество измерений. А вот прямую можно построить всего по 2 точкам. Во-вторых, не всегда удобно работать с высокими концентрациями субстрата. Но пока вы не измерите несколько раз скорость при высоких концентрациях субстрата, вы не определите максимальную скорость реакции, а следовательно, и константу Михаэлиса. И в-третьих, при построении прямой экспериментальные ошибки усредняются компьютером, а при построении гиперболы это сделать намного сложнее.

И так, практически всегда нелинейные зависимости пытаются преобразовать в линейные. Во всех следующих разделах мы тоже будем это делать для нахождения параметров эксперимента. Существует множество способов линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен. Однако, чаще всего используют метод Лайнуивера-Берка, хотя другие способы линеаризации (Иди-Хофсти, Хейнса) имеют некоторые преимущества перед координатами Лайнуивера-Берка. В координатах Лайнуивера-Берка строят зависимость в обратных координатах $1/v$ ($1/S$).

Чтобы получить эту зависимость, перевернем обе части уравнения 2.4.15 и поделим оба слагаемых в числителе на знаменатель. Получим

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S}{V_{max} S} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.4.18)$$

Мы получили уравнение прямой $y = ax + b$, где $x = 1/[S]$, $y = 1/v$, $a = K_M/V_{max}$, $b = 1/V_{max}$ (рис. 2.4.3).

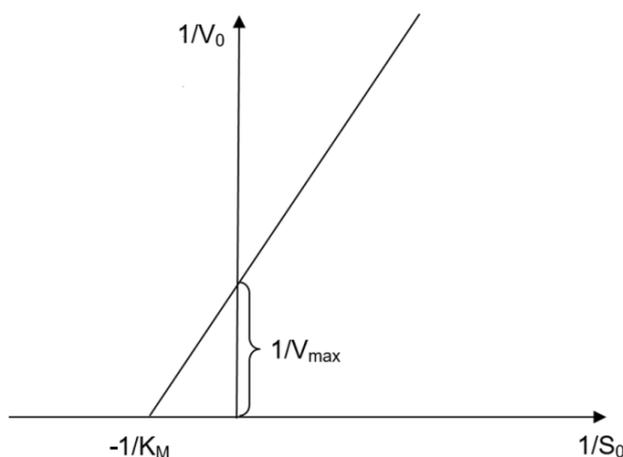


Рис. 2.4.3. Линеаризация уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка

Максимальную скорость находим по точке пересечения с осью ординат. Чтобы найти точку пересечения с осью OY , подставим в уравнение 2.4.18 $x = 0$ ($1/S = 0$). Получим

$$1/v = 1/V_{max} \quad (2.4.19)$$

Чтобы найти точку пересечения с осью ОХ, подставим в 2.4.18 $y=0$ ($1/v = 0$).
Получим выражение

$$0 = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Вычтем из обеих частей уравнения $1/V_{\max}$

$$\frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} = -\frac{1}{V_{\max}}$$

И умножим обе части уравнения на V_{\max}/K_M

$$\frac{1}{S} = -\frac{1}{K_M} \quad (2.4.20)$$

Из уравнений 2.4.19 и 2.4.20 следует, что точка пересечения с осью ординат позволяет вычислить V_{\max} , а точка пересечения с осью абсцисс – найти константу Михаэлиса.

Вопросы для подготовки к семинару.

1. Объясните, чем отличаются схемы 2.4.1 и 2.4.10 и почему?
2. Что такое максимальная скорость реакции? Как ее находят? В чем измеряют?
3. Что такое константа Михаэлиса? Как ее находят? В чем измеряют?
4. Сравните константу Михаэлиса и константу диссоциации фермент-субстратного комплекса.
5. С помощью уравнения Михаэлиса-Ментен определите порядок ферментативной реакции по ферменту, субстрату, общий порядок реакции.

Задача 1. [1]

Определить значение кинетических параметров ($k_{\text{кат}}$ и K_m) гидролиза метилового эфира N-ацетил-L-валина, катализируемого α -химотрипсином, исходя из экспериментальных данных.

$$[E]_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$$

[S] ₀ , М	V ₀ ·10 ⁶ , М·сек ⁻¹
0,200	4,57
0,124	3,83
0,124	3,84
0,091	3,33
0,091	3,31
0,071	2,97
0,071	2,93
0,060	2,67
0,060	2,74

Глава 2.5. Влияние обратимых эффекторов на кинетику ферментативной реакции

1. Механизмы влияния.
2. Кинетика ферментативных реакций, протекающих с участием эффектора
 - 2.1. Вид зависимости и смысл параметров ингибирования.
 - 2.2. Полное конкурентное ингибирование. Алгоритм определения параметров реакции и типа ингибирования.
 - 2.3. Полное неконкурентное ингибирование.
 - 2.4. Бесконкурентное ингибирование.
3. Примеры решения задач.

2.5.1. Механизмы влияния

Ферменты – катализаторы биологической природы. Оказывается, что существуют вещества, регулирующие активность самих катализаторов. Они называются *модуляторами или эффекторами*. Некоторые эффекторы постоянно присутствуют в клетке, другие появляются там при изменении каких-то условий. С точки зрения химии, взаимодействие фермента с эффектором ничем не отличается от взаимодействия с субстратом, коферментом и т. д. Это взаимодействие может быть полностью обратимым, частично обратимым или практически необратимым. К числу известных необратимых ингибиторов принадлежат яды: цианидный ион, инактивирующий ксантиноксидазу, нервнопаралитические яды, инактивирующие холинэстеразу (фермент, участвующий в передаче нервного импульса). Если процесс ингибирования необратим, то кинетическая реакция не подчиняется механизму Михаэлиса-Ментен, основой которого является наличие равновесия между свободной и связанной формами фермента.

В случае обратимых ингибиторов для описания кинетики ферментативной реакции можно использовать уравнение Михаэлиса-Ментен. По влиянию ингибиторов на параметры уравнения Михаэлиса-Ментен (V_{max} и K_m) их классифицируют:

Конкурентные– ингибиторы, конкурирующие с субстратом за активный центр фермента. В присутствии конкурентных ингибиторов понижается сродство фермента к субстрату (повышается K_m), и скорость реакции, но максимальная скорость (V_{max}) не меняется по той же причине конкуренции. При избытке субстрата концентрация ингибитора становится во много раз меньше, чем концентрация субстрата, а его эффект практически незаметен.

Неконкурентные– ингибиторы, не влияющие на сродство фермента к субстрату, но инактивирующие фермент или фермент-субстратный комплекс путем уменьшения V_{max} . Неконкурентные ингибиторы связываются со специальным регуляторным центром фермента. В этом случае увеличение концентрации субстрата не приводит к увеличению максимальной скорости реакции. К неконкурентным ингибиторам относятся ионы тяжелых металлов, обратимо реагирующие с $-SH$ группами цистеинов. Известно несколько сочетаний и вариантов этих двух основных типов обратимого ингибирования.

Многие из известных конкурентных ингибиторов по структуре похожи на обычные субстраты. Они так и называются – *субстратные аналоги*. То есть их

структура позволяет им связываться с ферментом, но преобразоваться в продукт они не могут. Например, малоновая кислота похожа по структуре на янтарную кислоту (рис. 2.5.1). Но янтарная кислота дегидрируется сукцинилдегидрогеназой, а малоновая кислота связывается с ферментом, но в продукт не превращается.

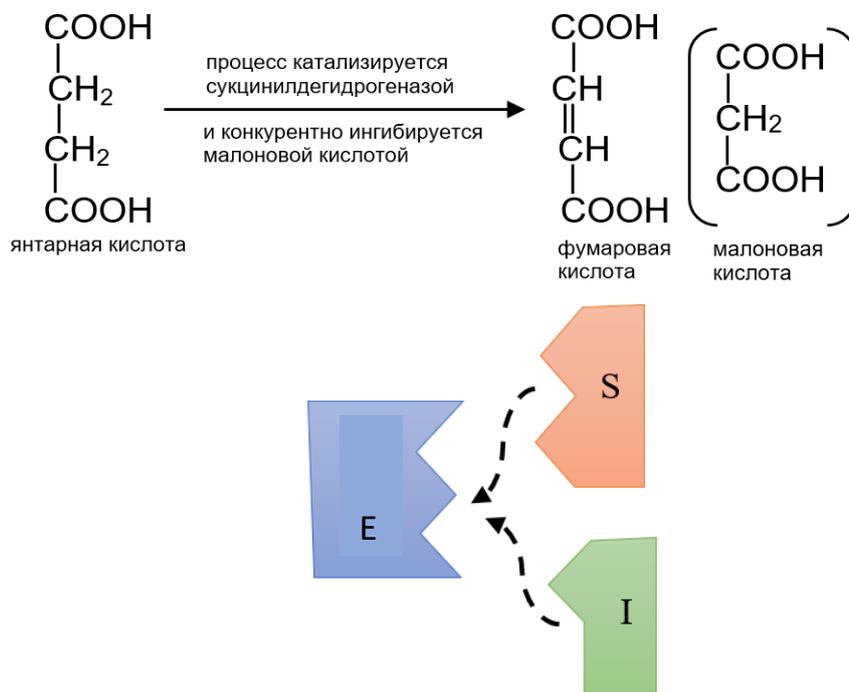


Рис. 2.5.1. Конкурентное ингибирование сукцинилдегидрогеназы малоновой кислотой. S - субстрат (янтарная кислота), I - ингибитор (малоновая кислота, по структуре похож на субстрат). С ферментом (E) могут связаться либо субстрат, либо ингибитор. Тройной комплекс не образуется

Конкурентное ингибирование лежит в основе действия лекарственного препарата сульфаниламида (стрептоцида) (рис. 2.5.2). Его структура очень близка структуре *p*-аминобензойной кислоты - важного витамина многих бактерий. Сульфаниламид ингибирует фермент, участвующий в превращении *p*-аминобензойной кислоты в фолиевую кислоту (кофермент биосинтеза нуклеотидов), тем самым блокируя рост бактерий.

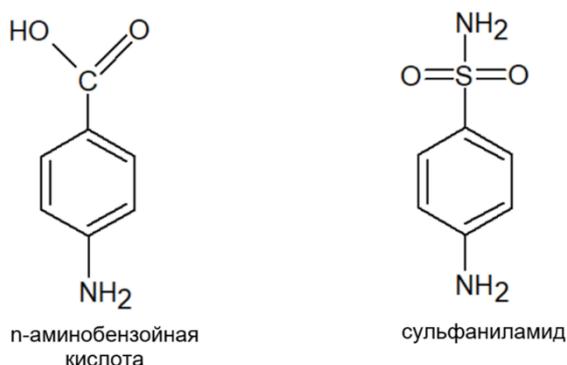
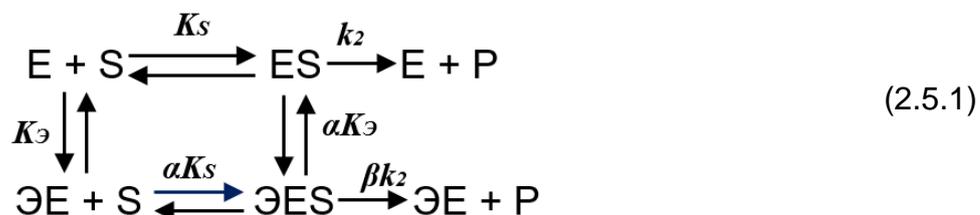


Рис. 2.5.2. Субстрат (*p*-аминобензойная кислота) и конкурентный ингибитор (стрептоцид)

2.5.2. Кинетика ферментативных реакций, протекающих с участием эффектора

2.5.2.1. Вид зависимости и смысл параметров ингибирования

Действие всех типов обратимых ингибиторов и активаторов на обычную двухстадийную ферментативную реакцию можно описать схемой:



Если сравнить с обычной схемой Михаэлиса-Ментен (глава 2.4), то здесь появляются новые буквы, численное значение которых и будет определять тип ингибирования или активации. Все большие буквы K – константы диссоциации. $K_{\text{Э}}$ – константа диссоциации комплекса фермент-эффектор.

$$K_{\text{Э}} = \frac{[E] \cdot [\text{Э}]}{[E\text{Э}]}
 \tag{2.5.2}$$

В случае ингибирования ее называют K_I – константа ингибирования. В случае активации K_a – константа активации. $\alpha K_{\text{Э}}$ – константа диссоциации тройного комплекса фермент-субстрат-эффектор до фермент-субстратного комплекса и свободного эффектора. Из тройного комплекса выходит эффектор.

$$\alpha K_{\text{Э}} = \frac{[ES] \cdot [\text{Э}]}{[ES\text{Э}]}
 \tag{2.5.3}$$

αK_s – константа диссоциации тройного комплекса фермент-субстрат-эффектор на комплекс фермент-эффектор и свободный субстрат. Из тройного комплекса выходит субстрат.

$$\alpha K_s = \frac{[E\text{Э}] \cdot [S]}{[ES\text{Э}]}
 \tag{2.5.4}$$

Из схемы и выражений 2.5.2 – 2.5.4 видно, что параметр α влияет на сродство субстрата и эффектора к ферменту. Если $\alpha = 1$, то эффектор не влияет на сродство субстрата к ферменту, а субстрат – на сродство эффектора к субстрату. Если $\alpha > 1$, то эффектор увеличивает константу диссоциации, понижает сродство и является ингибитором. Если $\alpha < 1$, то эффектор уменьшает константу диссоциации, увеличивает сродство и является активатором.

βk_2 в данной схеме – константа скорости преобразования субстрата в продукт из тройного комплекса фермент-субстрат-эффектор. Очевидно, что если $\beta > 1$, то тройной комплекс превращается в продукт быстрее, чем комплекс без эффектора. Следовательно, эффектор – **активатор**. И наоборот, если $\beta < 1$,

то тройной комплекс превращается в продукт медленнее, чем комплекс без эффектора. Значит, в данном случае эффектор является **ингибитором**.

Скорость реакции в присутствии эффекторов описывается выражением:

$$v = \frac{k_2 \frac{\alpha K_3 + \beta[\mathcal{E}]}{\alpha K_3 + [\mathcal{E}]} [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s \frac{K_3 + [\mathcal{E}]}{\alpha K_3 + [\mathcal{E}]} + [S]_0} \quad (2.5.5)$$

Видно, что общий вид уравнения Михаэлиса-Ментен не изменился. Изменились только значения констант k_{kat} и K_M . Обе эти константы зависят от концентрации эффектора.

$$k_{kat} = k_2 \frac{\alpha K_3 + \beta[\mathcal{E}]}{\alpha K_3 + [\mathcal{E}]}$$

$$K_M = \alpha K_s \frac{K_3 + [\mathcal{E}]}{\alpha K_3 + [\mathcal{E}]} \quad (2.5.6)$$

В отсутствии эффектора $k_{kat} = k_2$, $K_M = K_s$.

И так, действие всех активаторов и ингибиторов на простую двухстадийную ферментативную реакцию описывается выражением 2.5.5. Мы рассмотрим подробно три наиболее распространенных типа ингибирования, а для остальных укажем только численные значения параметров, и вы изучите их самостоятельно.

2.5.2.2. Полное конкурентное ингибирование ($\alpha \rightarrow \infty$, β не имеет определенного смысла). Алгоритм определения параметров реакции и типа ингибирования

Удобнее подставлять значения параметров α и β отдельно в выражение для каждой константы (2.5.6). Далее, если мы будем говорить об ингибиторах, вместо слов и обозначений эффектора, мы будем использовать термины и буквы ингибитора (\mathcal{E} заменяем на I). Для активаторов - \mathcal{E} заменяем на A . При этом необходимо помнить правила сокращения дробей (см. раздел 1). Если мы подставим значение альфа «бесконечность» в выражение для k_{kat} , мы получим в числителе и знаменателе сумму двух слагаемых, одно из которых (αK_i) бесконечно больше другого ($\beta[I]$). А это значит, что вторым слагаемым можно пренебречь.

$$k_{kat} = k_2 \frac{\alpha K_I + \beta[I]}{\alpha K_I + [I]} \approx k_2 \frac{\alpha K_I}{\alpha K_I} = k_2 \quad (2.5.7)$$

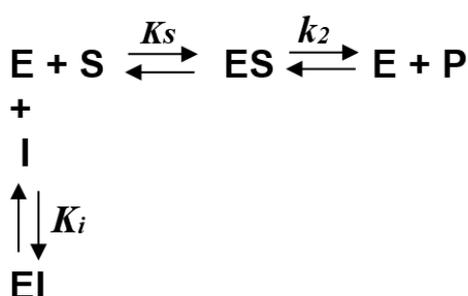
А вот в выражении для константы Михаэлиса в числителе стоят слагаемые одного порядка, поэтому мы оставляем их оба. В знаменателе – первое слагаемое бесконечно больше второго, поэтому вторым слагаемым пренебрегаем.

$$K_M = \alpha K_s \frac{K_I + [I]}{\alpha K_I + [I]} \approx \frac{\alpha K_s (K_I + [I])}{\alpha K_I} = K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \quad (2.5.8)$$

Общий вид уравнения Михаэлиса-Ментен для полного конкурентного ингибирования:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]_0} \quad (2.5.9)$$

Обсудим смысл полученных выражений 2.5.7 – 2.5.9 и сам термин «полное конкурентное» ингибирование. Что означает само значение параметра альфа «бесконечность»? Из схемы 2.5.1 видно, что обе константы диссоциации тройного комплекса фермент-субстрат-ингибитор (αK_{Si} и αK_i) равны бесконечности, то есть тройной комплекс не существует! В этом и состоит смысл термина «полное конкурентное» ингибирование. То есть, субстрат и ингибитор просто не выносят присутствия друг друга. С ферментом может связаться либо ингибитор, и тогда субстрат не сможет связаться, либо с ферментом связывается субстрат, но тогда не сможет связаться ингибитор. И схема 2.5.1 для полного конкурентного ингибирования сокращается:



То есть **полное конкурентное** ингибирование – это абсолютная непереносимость субстрата и ингибитора друг другом. Проанализируем влияние полного конкурентного ингибитора на параметры реакции. Видно, что $k_{кат}$ не зависит от концентрации ингибитора, но она определяет максимальную скорость реакции (раздел 2.4). Следовательно, и максимальная скорость реакции не зависит от концентрации ингибитора. При этом надо понимать, что при любых концентрациях субстрата, когда еще не достигнут его избыток, скорость реакции в присутствии ингибитора, конечно же, будет меньше, чем в отсутствии ингибитора.

В данном типе ингибирования ингибитор влияет только на сродство фермента к субстрату (K_M). Из выражения 2.5.8 видно, что с ростом концентрации ингибитора константа Михаэлиса увеличивается, сродство уменьшается.

Сейчас мы рассмотрим алгоритм определения типа ингибирования и параметров ингибирования.

Алгоритм определения параметров реакции и типа ингибирования

1. Построить зависимости в координатах Лайнуивера-Берка ($1/v$ от $1/s$) для каждого значения концентрации ингибитора (график 1).
2. По виду зависимости сделать вывод о типе ингибирования.
3. По точкам пересечения с осями определить значения V_{max} и K_M для каждого значения концентрации ингибитора.
4. Построить график 2 (иногда графики 2 и 3) для определения константы ингибирования, параметров α и β .

5. В ответе записать тип ингибирования, максимальную скорость (в отсутствии ингибитора), k_2 , K_S , K_I , α и β с учетом размерности.

В полном конкурентном ингибировании зависимость в координатах Лайнуивера-Берка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат (V_{max} постоянна).

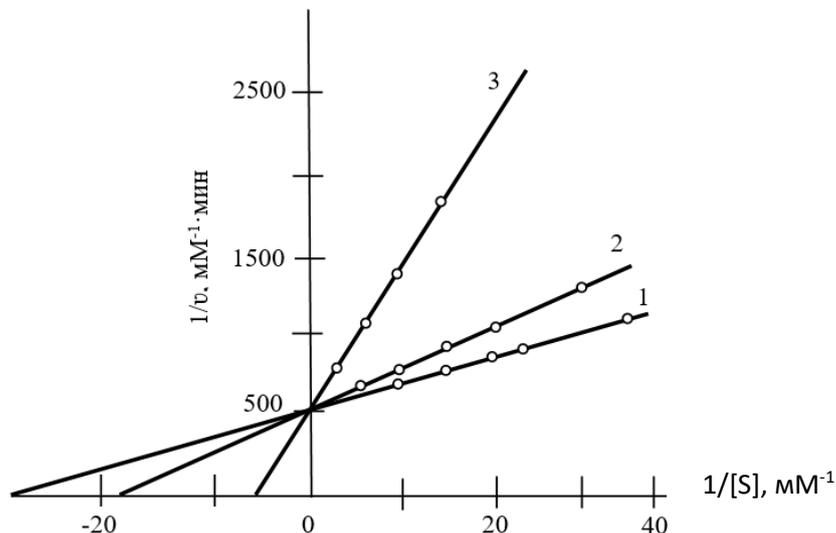


Рис. 2.5.3. Полное конкурентное ингибирование в координатах Лайнуивера-Берка

Каждая прямая построена при определенной концентрации ингибитора. Сколько построено прямых, столько мы будем иметь значений константы Михаэлиса. Из выражения 2.5.8 видно, что зависимость константы Михаэлиса от концентрации ингибитора линейна. Следовательно, построив график 2 в координатах $(K_M, [I])$, можно найти все параметры реакции.

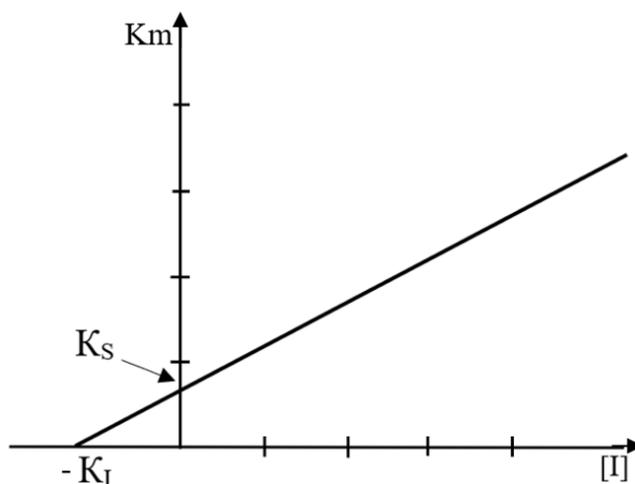


Рис. 2.5.4. Определение константы ингибирования для полного конкурентного ингибирования. Константу диссоциации находим по точке пересечения с осью ординат. Константу ингибирования - по точке пересечения прямой с осью абсцисс

2.5.2.3. Полное неконкурентное ингибирование ($\alpha=1, \beta=0$)

Подставим значения параметров $\alpha=1$ и $\beta=0$ в выражения 2.5.6 для k_{kat} и K_m . Получим, что константа Михаэлиса не зависит от концентрации ингибитора, а k_{kat} определяется выражением:

$$k_{kat} = k_2 \frac{\alpha K_I + \beta[I]}{\alpha K_I + [I]} = k_2 \frac{K_I}{K_I + [I]} = \frac{k_2}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (2.5.10)$$

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата и ингибитора

$$v = \frac{\frac{k_2}{1 + \frac{[I]}{K_I}} [E]_0 [S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (2.5.11)$$

Так как константа Михаэлиса не зависит от концентрации ингибитора, значит зависимости в координатах Лайнуивера-Берка пересекутся в одной точке на оси абсцисс (рис. 2.5.5).

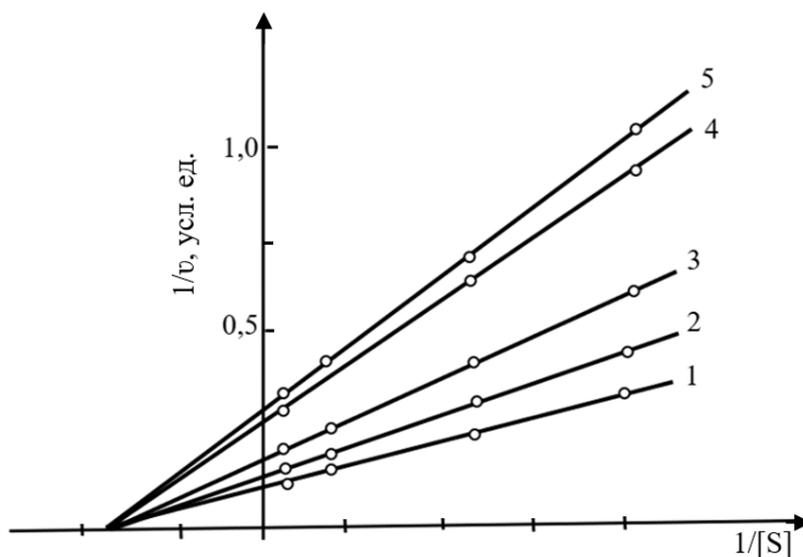


Рис. 2.5.5. Полное неконкурентное ингибирование в координатах Лайнуивера-Берка

По этим графикам находим значения максимальной скорости реакции для каждой концентрации ингибитора. По найденным значениям максимальной скорости рассчитываем k_{kat} для каждой концентрации ингибитора. Из выражения 2.5.10 видно, что k_{kat} зависит от концентрации ингибитора нелинейно. Для линейризации зависимости перевернем левую и правую части выражения. Получим

$$\frac{1}{k_{kat}} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (2.5.12)$$

Построив зависимость в координатах $(1/k_{kat}, [I])$ найдем константу ингибирования по точке пересечения с осью абсцисс (рис. 2.5.6).

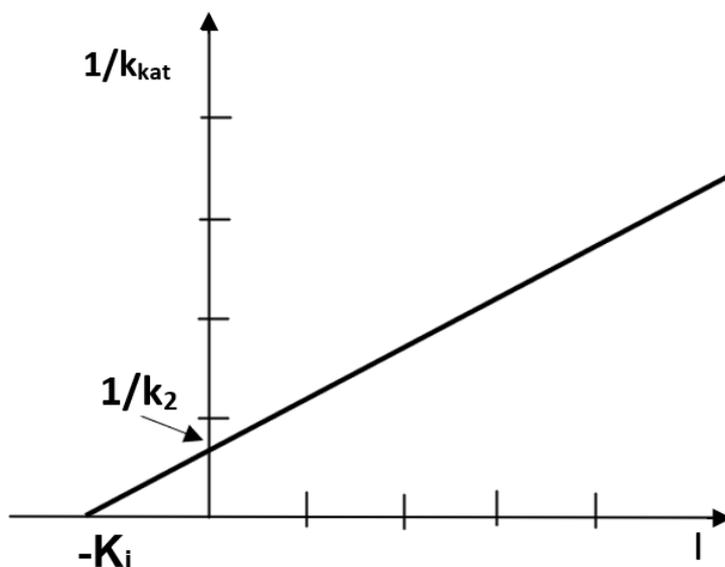


Рис. 2.5.6. Определение параметров ингибирования для полного неконкурентного ингибирования.

Что обозначает термин **полное неконкурентное** ингибирование? Так как константа Михаэлиса не зависит от концентрации ингибитора, следовательно, ингибитор никак не влияет на связывание субстрата и наоборот – субстрат никак не влияет на связывание ингибитора. То есть субстрату совершенно все равно, есть в активном центре фермента ингибитор или нет. И ингибитору тоже. Они никак не влияют на связывание друг друга, конкуренции нет. При этом тройной комплекс не обладает активностью ($\beta = 0$).

2.5.2.4. Бесконкурентное ингибирование ($\alpha=\beta<1$)

В этом типе ингибирования вид константы Михаэлиса не меняется. А в выражении для k_{kat} параметр α можно вынести как общий множитель.

$$k_{kat} = \alpha k_2 \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} \quad (2.5.13)$$

Получим зависимость:

$$v = \frac{k_2 \alpha \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} [E]_0 [S]_0}{K_S \alpha \frac{K_i + [I]}{\alpha K_i + [I]} + [S]_0} \quad (2.5.14)$$

Видно, что в результате бесконкурентного ингибирования обе константы k_{kat} и K_M умножаются на один и тот же множитель

$$\frac{\alpha(K_i + [I])}{\alpha K_i + [I]} \quad (2.5.15)$$

Это означает, что значения констант k_{kat} и K_M ферментативной реакции при увеличении концентрации эффектора уменьшаются в одинаковой степени, поэтому графики в координатах Лайнуивера-Берка имеют вид семейства параллельных прямых (рис. 2.5.7). По точкам пересечения с осями находим

константы Михаэлиса и максимальные скорости для каждой концентрации ингибитора.

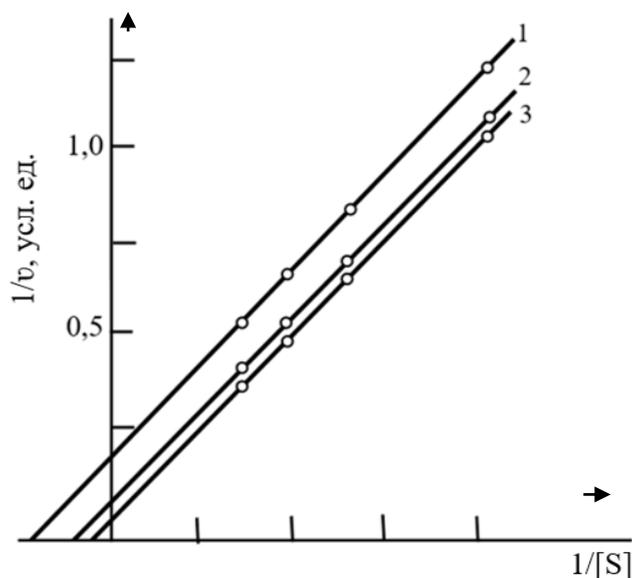


Рис. 2.5.7. Бесконкурентное ингибирование (и активация) в координатах Лайнуивера-Берка

В бесконкурентном ингибировании концентрация ингибитора стоит и в числителе, и в знаменателе выражений (2.5.13 – 2.5.14). Но и эти зависимости можно привести к линейному виду (попробуйте сделать это самостоятельно). Получим:

$$\frac{1}{1 - \frac{k_{kat}}{k_2}} = \frac{1}{1 - \alpha} + \frac{\alpha K_i}{1 - \alpha} \cdot \frac{1}{[I]} \quad (2.5.16)$$

Построим зависимость в координатах $(1 / (1 - k_{kat}/k_2), 1/[I])$ (рис. 2.5.8).

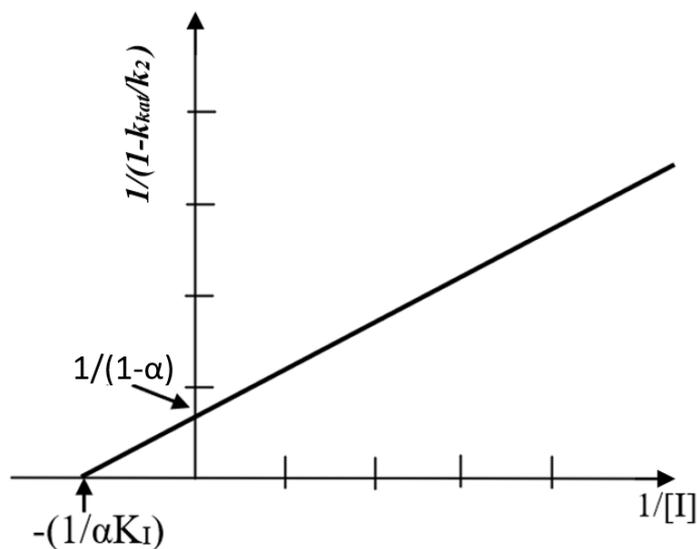


Рис. 2.5.8. Нахождение параметров ингибирования для бесконкурентного ингибирования

Параметр α находим по точке пересечения с осью ординат, а константу ингибирования - по точке пересечения с осью абсцисс.

Обратите внимание, что в случае бесконкурентного ингибирования максимальная скорость реакции уменьшается во столько же раз, во сколько возрастает сродство к субстрату ($\alpha < 1$). То есть фермент, связанный с ингибитором, имеет большее сродство к субстрату, но преобразует его в продукт медленнее. Аналогичные зависимости получаются и для случая бесконкурентной активации ($\alpha > 1$). Однако в данном случае максимальная скорость реакции возрастает во столько же раз, во сколько уменьшается сродство к субстрату. То есть фермент, связанный с активатором, хуже взаимодействует с субстратом, но преобразует его в продукт быстрее.

Существует множество других типов ингибирования и активации: неконкурентная, синергистическая активация, бесконкурентное, антиконкурентное, псевдоконкурентное ингибирование, а также смешанные типы. Обработку данных для них вы можете найти в литературе, указанной в списке.

Примеры решения задач.

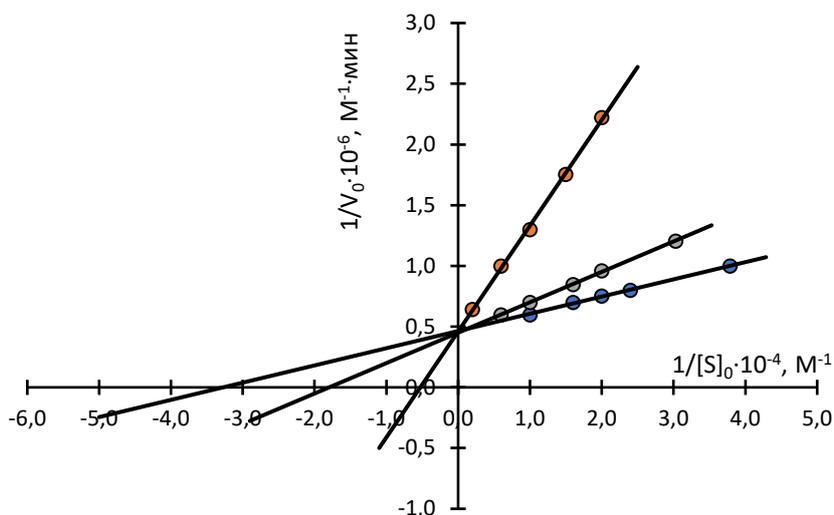
Задача 1.[1]

α -кетоглутарат является ингибитором реакции окисления N-метил-L-глутамата, катализируемого N-метилглутамат-дегидрогеназой. Определить константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор, исходя из данных таблицы.
 $[E]_0 = 6 \cdot 10^{-2}$ мг/мл

$[\alpha\text{-кетоглутарат}] \cdot 10^3, \text{ M}$	$[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$	$V_0 \cdot 10^6, \text{ M} \cdot \text{мин}^{-1}$
0	1,00	1,67
	0,625	1,43
	0,500	1,33
	0,417	1,25
	0,264	1,00
0,6	1,67	1,67
	1,00	1,43
	0,625	1,18
	0,500	1,04
	0,330	0,83
3,0	5,00	1,56
	1,67	1,00
	1,00	0,77
	0,667	0,57
	0,500	0,45

Для решения задачи воспользуемся алгоритмом, описанным выше.

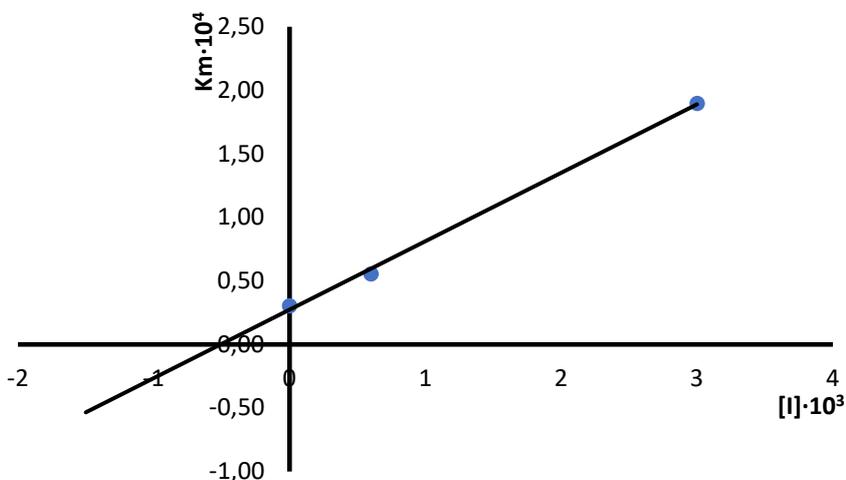
1. Строим графики в координатах Лайнуивера-Берка для каждого значения концентрации ингибитора.



2. Так как графики пересекаются в точке на оси ординат, следовательно, тип ингибирования - полное конкурентное.

3. По точке пересечения на оси ординат находим максимальную скорость реакции. $1/V_{max} = 0,46 \cdot 10^6$. Следовательно, $V_{max} = 2,17 \cdot 10^{-6}$. По точкам пересечения с осью абсцисс находим значения K_M для каждой концентрации ингибитора. При $I = 0$ $1/K_M = 3,23 \cdot 10^4$, следовательно, $K_M = 0,31 \cdot 10^{-4}$ и т.д.

4. По полученным значениям констант Михаэлиса строим график зависимости K_M от концентрации ингибитора (выражение 2.5.8).



5. По точке пересечения с осью $[I]$ находим константу ингибирования.

Ответ: полное конкурентное ингибирование, $V_{max} = 2,17 \cdot 10^{-6}$ моль/л*мин, $k_2 = 3,6 \cdot 10^{-5}$ моль/мг*мин, $K_S = 3,1 \cdot 10^{-5} M$, $K_I = 5,07 \cdot 10^{-4} M$

Задача 2[1]

Бензоат 1,2,5-триметилпиперидол-4(β -изомер) является ингибитором гидролиза бутирилхолина, катализируемого холинэстеразой. Определить тип ингибирования и найти константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор, исходя из данных таблицы

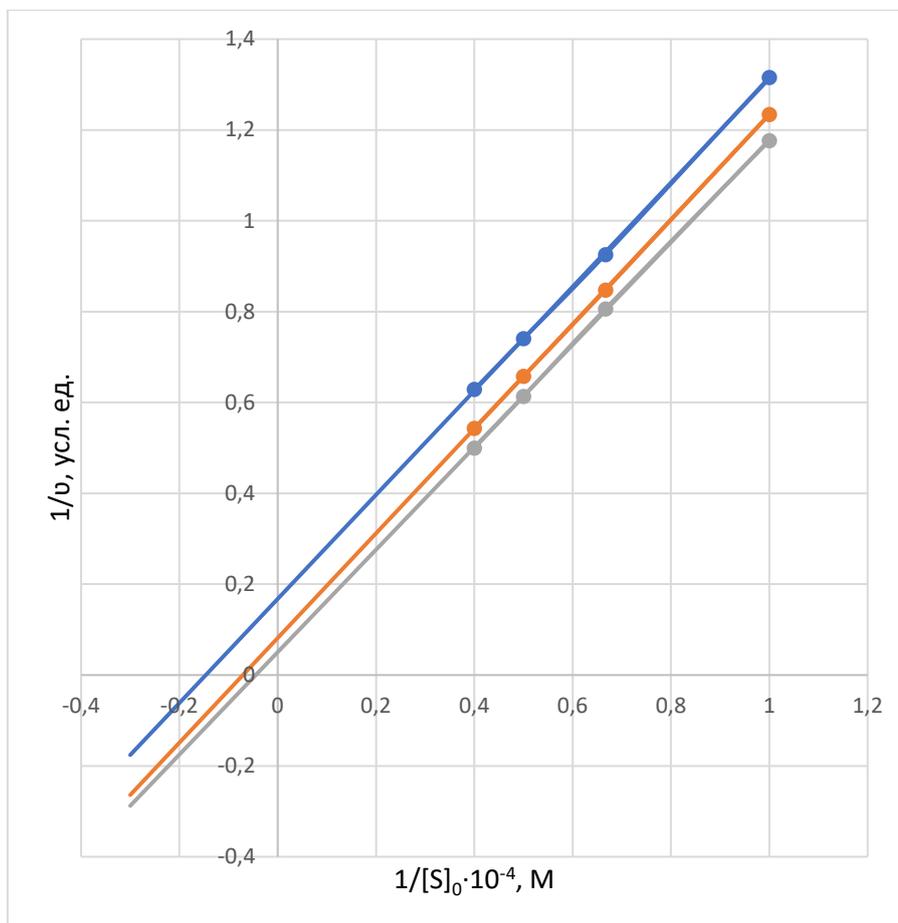
$[I]_0 \cdot 10^5, \text{ M}$	$[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$	$v, \text{ усл. ед.}$
0	10,00	5,55
	2,50	4,45
	0,91	2,94
	0,50	2,09
0,5	10,00	4,77
	2,50	3,78
	0,91	2,56
	0,50	1,79
1,0	10,00	4,00
	2,50	3,18
	0,91	2,16
	0,50	1,49
2,0	10,00	2,86
	2,50	2,28
	0,91	1,52
	0,50	1,06
3,0	10,00	2,38
	2,50	1,85
	0,91	1,24
	0,50	0,87

1. Построив график в координатах Лайнуивера-Берка, делаем вывод, что ингибирование – полное неконкурентное.
2. По графику находим V_{max} и K_M для каждой концентрации ингибитора. Так как скорость дана в условных единицах, то k_{kat} в данном случае равна V_{max} .
3. Строим график в координатах $(1/k_{kat}, [I])$, выражение 2.5.12. По графику находим константу ингибирования.

Задача 3[1]

Данные по влиянию метирапона на гидратацию стирол-оксида, катализируемую эпоксид-гидразой, представлены в таблице. На основании данных таблицы предложите кинетическую схему активации ферментативной реакции и оцените значения кинетических и равновесных параметров реакции.

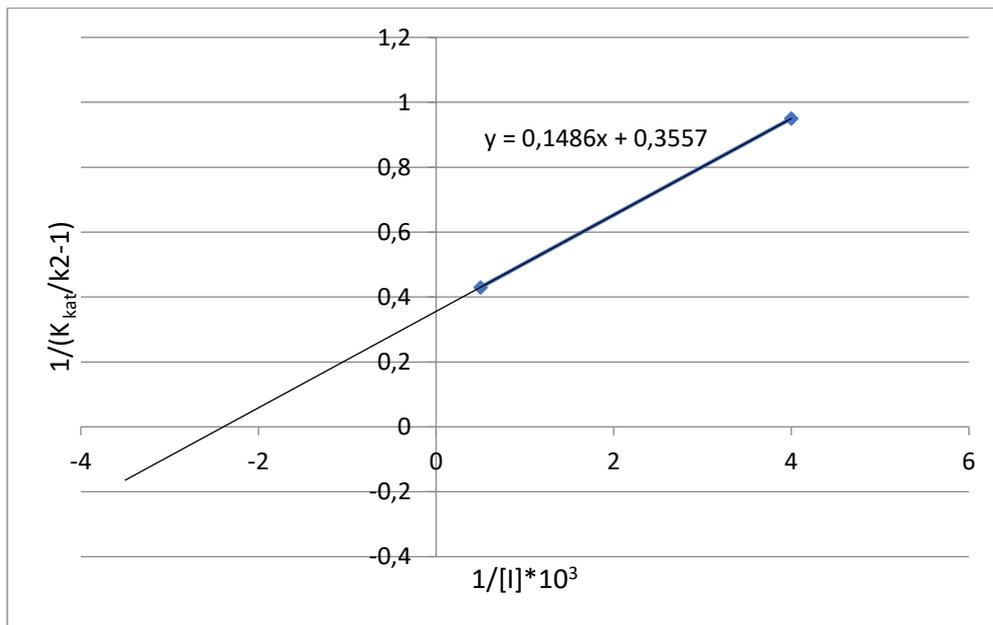
$[\text{метирапон}] \cdot 10^3, \text{ M}$	$[S]_0 \cdot 10^4, \text{ M}$	$v, \text{ усл. ед.}$
0	2,5	1,59
	2,0	1,35
	1,5	1,08
	1,0	0,76
0,25	2,5	1,84
	2,0	1,52
	1,5	1,18
	1,0	0,81
2,0	2,5	2,00
	2,0	1,63
	1,5	1,24
	1,0	0,85



По данным таблицы видно, что при увеличении концентрации эффектора (метирапона) скорость реакции возрастает, следовательно, метирапон – активатор. Так как в координатах Лайнуивера-Берка прямые параллельны, значит тип активации – бесконкурентная. Так как скорость представлена в условных единицах, то ее же можно считать константой скорости (концентрация фермента не известна). По точке пересечения с осью ОУ находим $k_2(5,96)$ в отсутствии эффектора и k_{kat} (12,2 и 19,8) при различных его концентрациях. По точкам пересечения с осью ОХ находим соответственно $K_s(-6,8 \cdot 10^{-4})$ и $K_m(-18,9 \cdot 10^{-4}$ и $-22,2 \cdot 10^{-4})$.

Строим второй график в координатах, подобных уравнению 2.5.16. Однако, при активации удобно умножить обе части уравнения на (-1) и строить график в координатах $(1/(k_{kat}/k_2 - 1), 1/[I])$. В данном случае зависимость имеет вид:

$$\frac{1}{\frac{k_{kat}}{k_2} - 1} = \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{\alpha K_i}{\alpha - 1} \cdot \frac{1}{[I]}$$



$$\alpha=3,8$$

$$K_i = 1,1 \cdot 10^{-4}$$

Глава 2.6. Факторы, влияющие на ферментативную активность.

Влияние pH и температуры на кинетику ферментативных реакций

1. Факторы, влияющие на ферментативную активность.
2. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций в растворах.
3. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции.
 - 3.1. Изменение равновесных констант
 - 3.2. Температурная зависимость индивидуальных констант скоростей

2.6.1. Факторы, влияющие на ферментативную активность

В предыдущей главе мы рассмотрели, как различные вещества могут связываться с ферментом и изменять его активность. Но ферментативная активность изменяется и под влиянием различных физических и химических факторов. К числу таких факторов относятся:

1. pH
2. температура
3. механические силы, действующие в текучих средах (гидродинамические силы, гидростатическое давление и поверхностное натяжение)
4. химические агенты (спирт, мочевины, фенолы, пероксиды и т.д.)
5. облучение (свет, звук, ионизирующая радиация)

Иногда снижение ферментативной активности под воздействием этих факторов обратимо. То есть, прекращение действия фактора сопровождается восстановлением активности фермента. Ситуация напоминает обратимое ингибирование. Небольшое воздействие вызывает лишь незначительное смещение равновесия в сторону неактивной (малоактивной) формы фермента. Это воздействие должно быть относительно небольшим по величине или времени воздействия. Если воздействие вызовет значительные изменения в структуре фермента, то возрастет вероятность инактивации фермента и снизится вероятность обратимости.

Нет четкой границы между "обратимой" и "необратимой" инактивацией белков. Например, фермент может полностью восстановить свою активность после кратковременного нагревания при довольно высокой температуре. Но если увеличить время нагревания, воздействие станет необратимым. Такое поведение белков объясняется их структурой, поддерживаемой комплексом слабых взаимодействий и влиянием факторов на эти силы. В этом разделе мы рассмотрим обратимое влияние pH и температуры на каталитическую активность фермента.

2.6.2. Влияние pH на кинетику ферментативных реакций в растворах

Ферменты, как и все белки, состоят из аминокислот. В зависимости от pH радикалы некоторых аминокислот, а значит и белок в целом, могут приобретать заряд. Заряженные группы часто входят в состав активных центров ферментов, так как в основе целого ряда механизмов ферментативного катализа лежит катализ кислотного или основного типа. Необходимым условием для осуществления кислотного или основного катализа является определенная форма ионогенной группы активного центра: протонированная или депротонированная. Отсюда следует, что каталитически активная форма фермента существует только в одном

строго определенном состоянии ионизации и, в зависимости от pH, в нее может превращаться большая или меньшая часть всего имеющегося в смеси фермента. Соответственно и скорость реакции будет пропорциональна доле активной формы фермента (рис. 2.6.1).

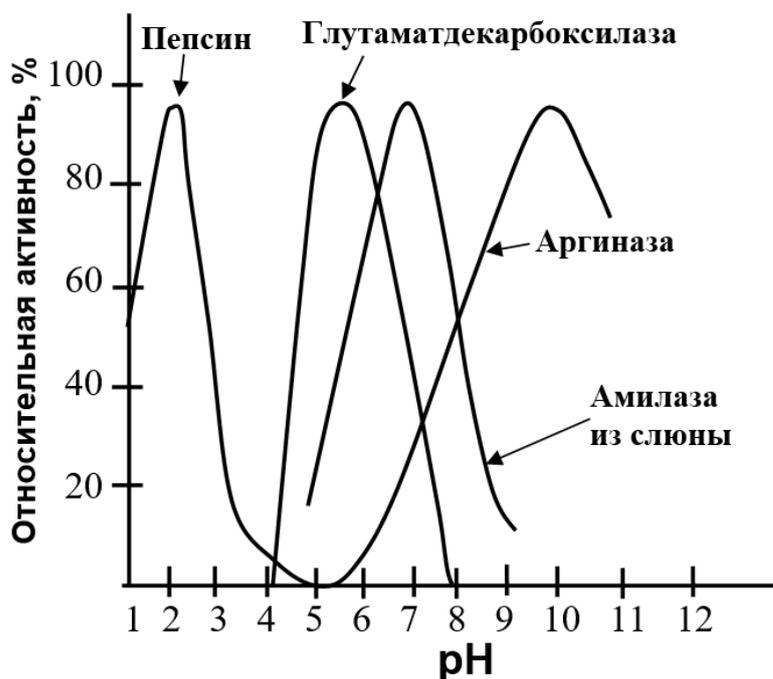


Рис. 2.6.1. Зависимость активности ферментов от pH.

Влияние pH на скорость ферментативной реакции можно изобразить схемой

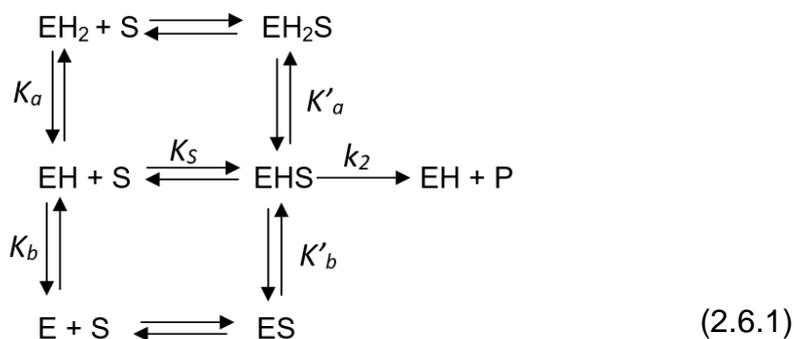


Схема напоминает влияние ингибиторов на ферментативную активность. Но в отличие от нее, здесь активна только одна форма фермента. Обычно схема упрощается, работает либо верхняя, либо нижняя часть схемы. С какой целью исследуют влияние pH на скорость реакции? По экспериментальным данным можно узнать количество и свойства групп, контролирующих связывание и превращение субстрата, их константы ионизации. Ионизация групп, не входящих в активный центр фермента, не влияет на скорость реакции до тех пор, пока молекула остается в нативной конформации (не денатурирует).

Выведем зависимость скорости ферментативной реакции от pH. В схеме (2.6.1) фермент может находиться в трех состояниях ионизации: E , EH и EH_2 . При этом ферментативной активностью обладает только форма EH . Константы диссоциации групп различаются в свободном ферменте (K_a и K_b) и в фермент-

субстратном комплексе (K_a' и K_b). Продукт P образуется из комплекса EHS со скоростью v :

$$v = k_2[EHS] \quad (2.6.2)$$

Уравнение материального баланса по ферменту:

$$[E]_0 = [E] + [EH] + [EH_2] + [ES] + [EHS] + [EH_2S] \quad (2.6.3)$$

Константы диссоциации:

$$\begin{aligned} K_a &= \frac{[EH] \cdot [H^+]}{[EH_2]} & K_a' &= \frac{[EHS] \cdot [H^+]}{[EH_2S]} & K_s &= \frac{[EH] \cdot [S]}{[EHS]} \\ K_b &= \frac{[E] \cdot [H^+]}{[EH]} & K_b' &= \frac{[ES] \cdot [H^+]}{[EHS]} \end{aligned} \quad (2.6.4)$$

Из констант диссоциации выразим концентрации всех форм фермента через $[EHS]$ и подставим эти выражения в уравнение материального баланса 2.6.3. Получим зависимость концентрации активной формы фермента $[EHS]$ от pH , а подставив $[EHS]$ в уравнение 2.6.2, получим

$$v = \frac{k_{kat} [E]_0 [S]_0}{K_{M(каж)} + [S]_0} \quad (2.6.5)$$

И мы снова получили уравнение Михаэлиса-Ментен. Однако, как и в случае ингибирования, k_{kat} и K_M зависят от других факторов. В данном случае, от pH среды:

$$\begin{aligned} k_{kat} &= \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K_a'} + \frac{K_b'}{[H^+]}} \\ K_{M(каж)} &= K_s \frac{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a'} + \frac{K_b'}{[H^+]}} \end{aligned} \quad (2.6.6)$$

Доля фермента, находящегося в активной форме:

$$\frac{[EHS]}{[E]_0} = \frac{k_{kat}}{k_2} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a'} + \frac{K_b'}{[H^+]}} \quad (2.6.7)$$

Видно, что зависимости констант от pH нелинейны, однако их можно преобразовать к линейному виду либо воспользоваться другими приемами (см. задачи ниже). По зависимости k_{kat} от pH можно найти значения констант диссоциации групп фермент-субстратного комплекса (K_a' и K_b). Константы диссоциации ионогенных групп свободного фермента (K_a и K_b) находят по pH -зависимости $k_{kat}/K_{M(каж)}$.

$$\frac{k_{kat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}} \quad (2.6.8)$$

Как уже говорилось ранее, схема обычно выглядит проще. Рассмотрим несколько частных случаев.

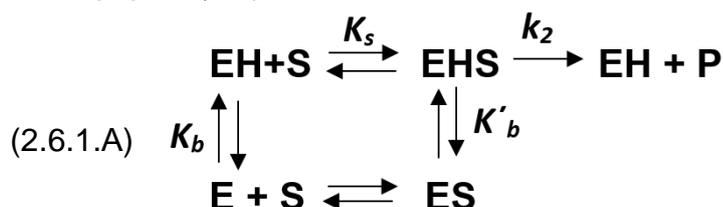
1. $K_a = K_a'$, $K_b = K_b'$.

Из схемы 2.6.1 видно, что в этом случае константа диссоциации ионогенной группы не зависит от связывания субстрата. Из уравнения 2.6.6 также следует, что $K_{M(каж)} = K_s$. А это значит, что субстрат связывается на одном участке активного центра, а ионируемая группа находится в другом участке. Или, другими словами, ионируемая группа находится в зоне катализа активного центра фермента, а не в зоне связывания субстрата.

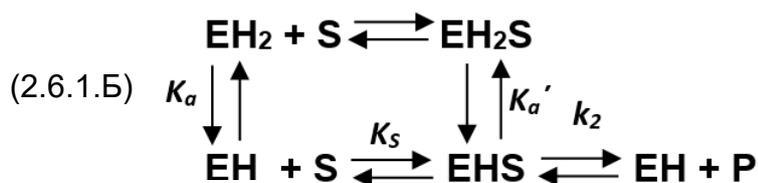
2. $K_a' = \infty$, $K_b' = 0$.

Из схемы 2.6.1 следует, комплексов EH_2S и ES не существует. То есть ионизация фермента переводит его в неактивную форму (EH_2 и E), не способную связывать субстрат. Субстрат связывается только с одной формой фермента EH . Из уравнения 2.6.6 видим, что $k_{кат} = k_2$. Значит, в данном случае ионогенные группы активного центра входят в состав сорбционного участка и не принимают участия в последующей каталитической реакции.

3. Чаще всего в активном центре фермента имеется одна ионогенная группа, влияющая на активность. Если $K_a = K_a' = \infty$, то не существует форм EH_2 и EH_2S . При этом верхняя строчка в схеме 2.6.1 не работает, а фермент активен в протонированной форме (EH).



4. Если $K_b = K_b' = 0$, то не существует форм E и ES . При этом нижняя строчка в схеме 2.6.1 не работает, а фермент активен в депротонированной форме (EH):



Мы рассмотрели простую модель для определения рК ионогенных групп активного центра фермента. Более сложные зависимости получаются для трех- (и более) стадийных реакций, в случае ионизации субстрата и т. д. Кроме того, не следует забывать, что речь идет об обратимых изменениях. При значительном изменении рН нарушение сил, стабилизирующих конформацию нативного белка, может привести к его денатурации, и тогда даже после восстановления оптимального рН ренатурация фермента становится маловероятной.

Задача 1[1]

Гидролиз специфических сложноэфирных субстратов, катализируемый α -химотрипсином, протекает при участии имидазольной группы остатка гистидина активного центра фермента, выступающей в качестве общекисотно-основного катализатора. На основании данных таблицы определить величину рК_a этой группы.

pH	$k_{кат}, \cdot сек^{-1}$
6,5	48
7,0	95
7,5	120
7,8	137
8,0	139
8,5	148
9,0	150

$$[E]_0 = (0,17-2,2) \cdot 10^{-7} M$$

Задачи по определению рК групп можно решать несколькими способами. Можно линеаризовать уравнения 2.6.6, например, в координатах $1/k_{кат}$ от $[H^+]$ или в координатах $lgk_{кат}$ от pH . Но для простых случаев есть более легкие и логичные решения. Сначала проанализируем данные задачи. Из таблицы видно, что с ростом pH константа скорости увеличивается. Удобно построить график зависимости $k_{кат}$ (pH) (рис. 2.6.2).

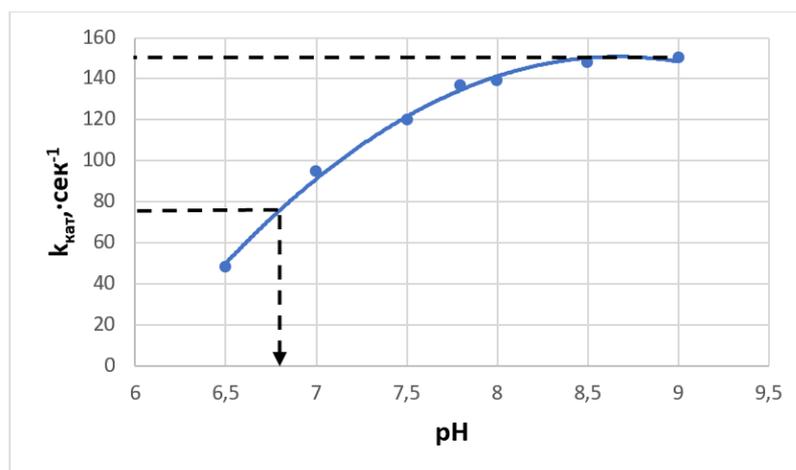
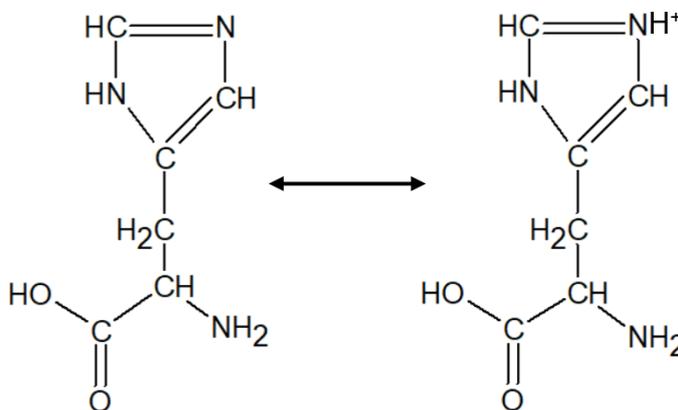


Рис. 2.6.2. Определение значения рК ионогенной группы активного центра фермента по зависимости константы скорости от pH

В условии задачи сказано, что в активном центре альфа-химотрипсина гистидин работает как кислотно-основной катализатор. То есть гистидин может находиться в двух состояниях: протонированном и депротонированном.



В кислой среде все молекулы гистидина находятся в протонированном состоянии и выступают в роли кислоты. В щелочной среде все молекулы депротонированы и являются основаниями. Так как максимальная скорость реакции наблюдается в щелочной среде, следовательно, альфа-химотрипсин активен в депротонированном состоянии (схема 2.6.1.Б).

А вот сейчас надо вспомнить определение pK группы. pK численно равна значению pH среды, при котором половина групп диссоциирована. Как это скажется на скорости реакции? В кислой среде скорость реакции равна нулю, все молекулы фермента протонированы, фермент в нерабочем состоянии. В щелочной среде скорость реакции максимальна, все молекулы фермента депротонированы, все активны. Получается, что при значении pH среды равном pK в активной форме будут находиться ровно половина молекул фермента, и следовательно, начальная скорость будет равна половине от максимальной.

На графике $k_{кат}(pH)$ (рис. 2.6.2) видим, что максимальная константа скорости реакции равна 150 сек^{-1} (весь фермент активен). Делим это значение на 2, получаем, что когда работает половина молекул фермента, константа скорости реакции будет равна 75 сек^{-1} . Опускаем перпендикуляр на ось pH и находим значение $pK = 6,8$

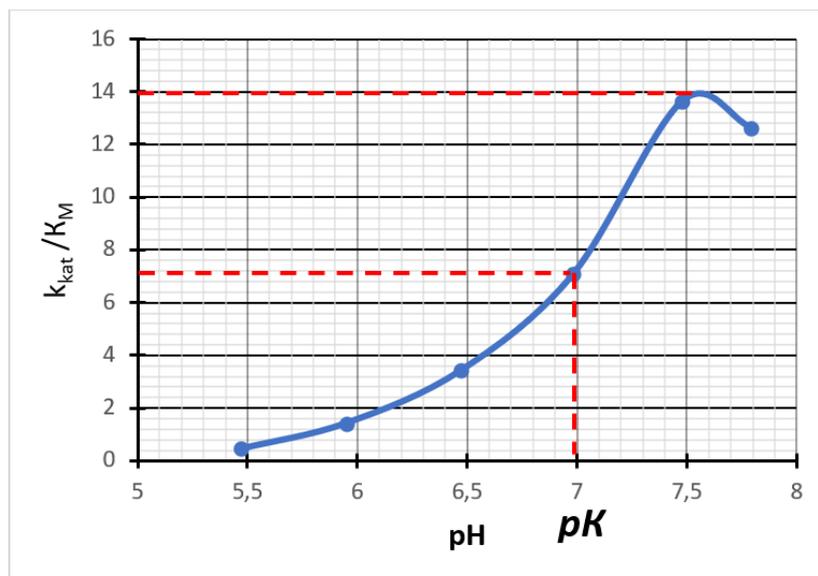
Задача 2[1]

В таблице приведена pH -зависимость гидролиза семикарбазида N-формил-L-фенилаланина, катализируемого α -химотрипсином. Определите значение pK ионогенных групп активного центра свободной формы фермента и фермент-субстратного комплекса и предложите схему pH -зависимости реакции.

pH	$k_{кат} \cdot 10^2, \text{сек}^{-1}$	$K_m \text{ (каж)} \cdot 10^3, \text{M}$
5,47	0,32	7,00
5,95	0,96	6,70
6,47	1,92	5,60
6,98	2,44	3,45
7,48	3,06	2,24
7,79	2,88	2,28

В данной задаче требуется найти значения pK групп в свободном ферменте и в фермент-субстратном комплексе. Из выражений 2.6.6-2.6.8 видно, что по зависимости $k_{кат}(pH)$ мы сможем найти pK фермент-субстратного комплекса, т. к. она зависит от K_a' . Находим его аналогично задаче 1. Найдите самостоятельно.

Чтобы найти pK свободного фермента, строим зависимость $k_{кат}/K_m(pH)$.



Делим максимальное значение (13,6) на два и опускаем перпендикуляр на ось pH. Полученное значение соответствует pK свободного фермента.

Ответ: $pK=7$, $pK' = ?$

2.6.3. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

В главе 2.2 были описаны причины увеличения скорости реакции при возрастании температуры. Температура влияет не только на скорость реакции, но и на положение равновесия между исходными веществами и продуктами реакции. Принцип был сформулирован Ле Шателье: если на систему, находящуюся в равновесии, воздействовать извне, то в системе усиливаются процессы, направленные в сторону противодействия этим изменениям. Другими словами, не только людям, но и химическим системам не нравится что-то менять. Если равновесие установилось при определенной температуре, а мы будем нагревать систему, то в ней пойдет реакция, в ходе которой это лишнее тепло будет поглощаться. Аналогично и обратное. Если систему охлаждать, то реакция пойдет в ту сторону, в которой тепло будет выделяться. Изучая влияние температуры на равновесные и кинетические константы реакции, можно узнать изменение характеристических функций энтальпии, энтропии и энергии Гиббса. Рассмотрим порядок обработки экспериментальных данных для определения термодинамических параметров реакции.

2.6.3.1. Изменение равновесных констант

Так как константы равновесия зависят от энергии исходных веществ и продуктов реакции, и не зависят от энергии активации, то исследуя зависимость равновесных констант от температуры, мы можем узнать изменение энергии в ходе реакции, но не энергию активации. И так, если в эксперименте определялись **константы равновесия**, то для нахождения термодинамических параметров реакции используют **уравнение Вант-Гоффа**:

$$\frac{d \ln K}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (2.6.9)$$

где ΔH – изменение энтальпии в ходе реакции, практически не зависит от температуры.

Порядок обработки экспериментальных данных для равновесных констант.

1. Построить график зависимости $\ln K$ от $(1/T)$. Тангенс угла наклона прямой равен $-\Delta H/R$.

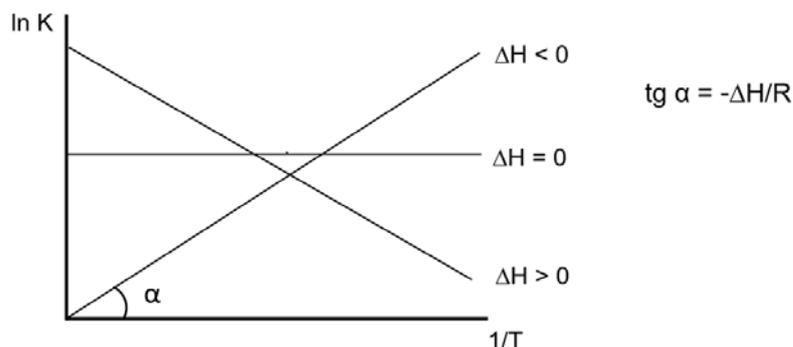


Рис. 2.6.3. Определение изменения энтальпии в ходе химической реакции

2. По этому графику (рис. 2.6.3) определяем $\ln K$ при стандартной температуре (25 °С) и рассчитываем изменение свободной энергии Гиббса в ходе реакции (ΔG , см. главу 2.3 ферментативный катализ):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2.6.10)$$

3. Из определения свободной энергии Гиббса

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.6.11)$$

находим изменение энтропии в ходе реакции

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (2.6.12)$$

Задача 3[1].

Эффективность нековалентного связывания аниона гидрокоричной кислоты с α -химотрипсином зависит от ионизационного состояния α -аминогруппы остатка изолейцина-16 активного центра фермента. Вычислите теплоту ионизации, энергию Гиббса и энтропию ионизации этой группы на основании данных таблицы.

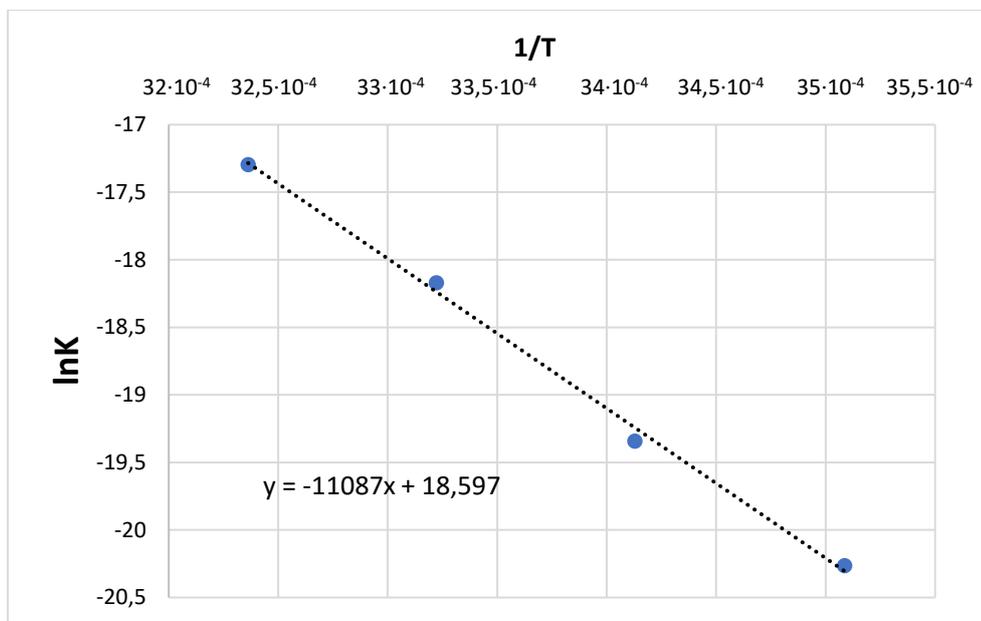
T, °C	pK _a
12	8,81
20	8,41
28	7,90
36	7,52

Так как в данной задаче приведены значения pK группы, следовательно, мы имеем зависимость равновесной константы от температуры. Воспользуемся алгоритмом решения. Чтобы построить график $\ln K$ от $1/T$, нам надо вспомнить, что такое pK и как из него получить $\ln K$. $pK = -\lg K$. Воспользуемся формулой перехода от одного основания логарифма к другому.

$$\log_b a = \frac{\log_c a}{\log_c b}$$

$$\ln K = \frac{\lg K}{\lg e} = 2,31 \lg K = -2,3 pK \quad (2.6.13)$$

Теперь можно построить график $\ln K$ от $1/T$.



По тангенсу угла наклона находим изменение энтальпии при ионизации группы. Обратите внимание, что линия соответствует убывающей функции. То есть тангенс угла наклона отрицательный. Но, т.к. тангенс в выражении 2.6.9 равен $-H/R$, то получим положительное изменение энтальпии:

$$\Delta H = 92022 \text{ Дж/моль} = 92 \text{ кДж/моль}$$

Далее по графику находим значение $\ln K$ при стандартной температуре ($1/T = 33,6 \cdot 10^{-4}$) и изменение энергии Гиббса по формуле 2.6.10.

$$\Delta G = -8,3 \cdot 298 \cdot (-18,59) = 45978 \text{ Дж/моль} = 46 \text{ кДж/моль}$$

И изменение энтропии по формуле 2.6.12:

$$\Delta S = (92-46)/298 = 0,15 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$$

Ответ: $\Delta H = 92 \text{ кДж/моль}$; $\Delta G = 46 \text{ кДж/моль}$; $\Delta S = 0,15 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$

2.6.3.2. Температурная зависимость индивидуальных констант скоростей

Уже говорилось ранее, что скорость химической реакции зависит от высоты барьера активации: чем он выше, тем скорость реакции меньше. Математически зависимость константы скорости от температуры определяется **уравнением Аррениуса**:

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (2.6.14)$$

Чтобы привести зависимость к линейному виду, прологарифмируем ее:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (2.6.15)$$

Построив график в координатах $\ln k$ от $1/T$, по тангенсу угла наклона найдем энергию активации (рис. 2.6.5).

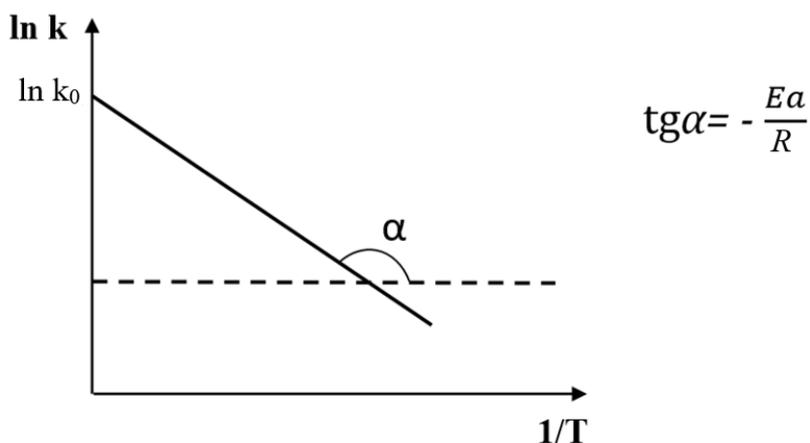


Рис. 2.6.4. Определение энергии активации по уравнению Аррениуса.

Для объяснения физического смысла энергии активации (E_a) были разработаны две теории: «**теория столкновений**» (1917 г) и «теория переходного состояния» (1935 г). Согласно первой из них скорость химической реакции или

количество взаимодействий = (число столкновений)(доля реагентов с достаточной энергией)*(концентрации)*

Согласно этой теории, доля молекул с достаточной для реакции энергией составляет $\exp(-E_a/RT)$, т. е. E_a – минимальная энергия, требуемая для того, чтобы реакция произошла.

По **теории переходного состояния** предполагается, что реагенты находятся в динамическом равновесии с *переходным состоянием*



Согласно схеме, константа равновесия

$$K^* = \frac{[AB^*]}{[A][B]} \quad (2.6.17)$$

скорость реакции:

$$-d[A]/dt = \kappa^*[AB]^* = \kappa^*K^*[A][B] \quad (2.6.18)$$

С другой стороны, если в реакции $A+B \rightarrow P$, константу скорости обозначить k_f , то скорость реакции можно записать:

$$-d[A]/dt = \kappa_f[A][B] \quad (2.6.19)$$

Сопоставляя выражения 2.6.18 и 2.6.19 получаем

$$\kappa_f = \kappa^*K^* \quad (2.6.20)$$

Так как константа равновесия связана с изменением энергии Гиббса (2.6.10), а энергия Гиббса связана с изменением энтальпии и энтропии (2.6.11), получим:

$$K^* = e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} = e^{-\frac{\Delta S^*}{R}} e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}} \quad (2.6.21)$$

$$k_f = \kappa^\ddagger e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

где ΔG^* , ΔS^* , ΔH^* - соответствующие изменения стандартной энергии Гиббса, энтропии и энтальпии реагентов *при переходе к активированному комплексу*. На это следует обратить внимание. В выражениях 2.6.9-2.6.12, описывающих зависимость равновесной константы от температуры, стоят изменения энергии в ходе реакции, т.е. разность энергий продуктов и исходных веществ. А в выражении 2.6.21, описывающем зависимость константы скорости от температуры, стоят энергии активации - разность энергий активированного комплекса и исходных веществ.

Теперь попытаемся разобраться со смыслом параметра κ^\ddagger . Скорость перехода через энергетический барьер можно приравнять к частоте ν колебаний связей, которые необходимо разорвать. То есть, если атомы колеблются с частотой ν колебаний в секунду, то существует ν возможностей в секунду для ее разрыва. Энергия колебаний связи равна $h\nu$, где h – постоянная Планка ($6,62 \cdot 10^{-27}$ эрг*сек). Тепловая энергия колебания равна $k_B T$ (k_B – постоянная Больцмана), следовательно $h\nu = k_B T$, и тогда

$$\kappa^\ddagger = \nu = k_B T / h \quad (2.6.22)$$

$$k_f = \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (2.6.23)$$

Это и есть основное уравнение теории переходного состояния. Видно, что оно нелинейное. Для преобразования его к линейному виду поделим обе части выражения на T и прологарифмируем. Получим

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (2.6.24)$$

Обработку экспериментальных данных проводят следующим образом.

Порядок обработки экспериментальных данных для кинетических констант

1. Построить график зависимости $\ln(k/T)$ от $(1/T)$. Тангенс угла наклона прямой равен $-\Delta H^\ddagger/R$.

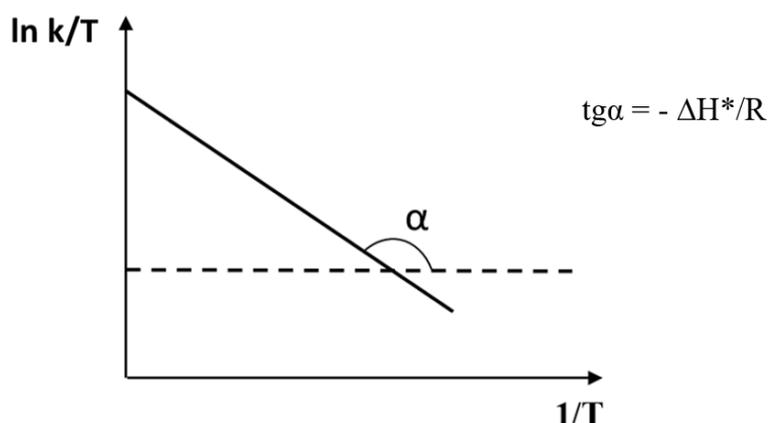


Рис. 2.6.5. Определение энтальпии активации

2. Выражение 2.6.23 можно записать в другом виде

$$k_f = \left(\frac{k_B T}{h} \right) e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2.6.25)$$

и выразить из него изменение стандартной энергии Гиббса при переходе к активированному комплексу ΔG^\ddagger

$$\Delta G^\ddagger = [\ln(k_B T/h) - \ln k] RT \quad (2.6.26)$$

После подстановки численных значений постоянных (в джоулях) и стандартной температуры выражение 2.6.26 упрощается

$$\Delta G^\ddagger = 2478 (29,5 - \ln k) \quad (2.6.27)$$

что позволяет легко найти ΔG^\ddagger .

3. Изменение стандартной энтропии активации ΔS^\ddagger находим по уравнению 2.6.12.

Еще раз напомним, что температурный диапазон ферментативных реакций, для которого применимы данные методы исследования, очень узок. И если мы попытаемся заставить фермент катализировать процесс еще быстрее, подняв температуру выше физиологически допустимой, фермент начнет денатурировать, активных молекул будет становиться все меньше, и скорость реакции начнет уменьшаться. По этой причине ферментативные реакции имеют колоколообразную зависимость скорости реакции от температуры. До определенной температуры скорость реакции возрастает, после чего начинается денатурация и скорость падает.

Денатурация большинства белков начинается в диапазоне температур от 45 до 50 °С и завершается очень быстро при 55°С.

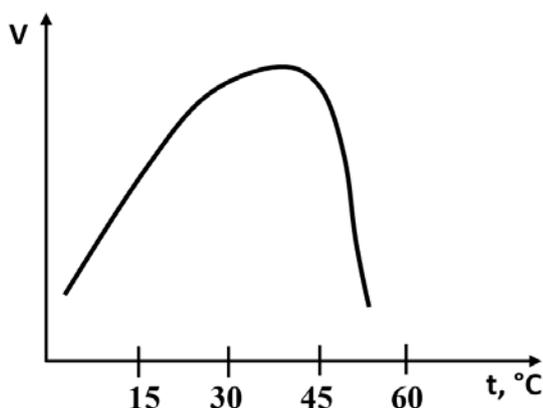
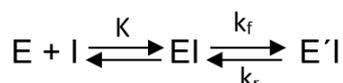


Рис. 2.6.6. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

Задача4[1]

При нековалентном связывании молекулы ингибитора активный центр α -химотрипсина претерпевает медленное обратимое конформационное изменение:



На основании данных таблицы рассчитайте значения стандартных энтальпии и энтропии активации прямой и обратной реакции, а также стандартных энтальпии и энтропии равновесной изомеризации.

Влияние температуры на константы скоростей прямой (k_f) и обратной (k_r) реакций изомеризации активного центра α -химотрипсина при связывании с анионом гидрокоричной кислоты.

t°С	$k_f, \text{сек}^{-1}$	$k_r, \text{сек}^{-1}$
20	0,48	0,23
28	1,78	0,48
36	6,67	1,34

В данной задаче мы видим зависимости констант скоростей прямой и обратной реакции от температуры, поэтому для нахождения термодинамических параметров реакции воспользуемся алгоритмом для констант скоростей и выражением 2.6.24. Строим графики в координатах $\ln k/T$ от $(1/T)$ для прямой (рис. 2.6.7) и обратной реакции (рис. 2.6.8).

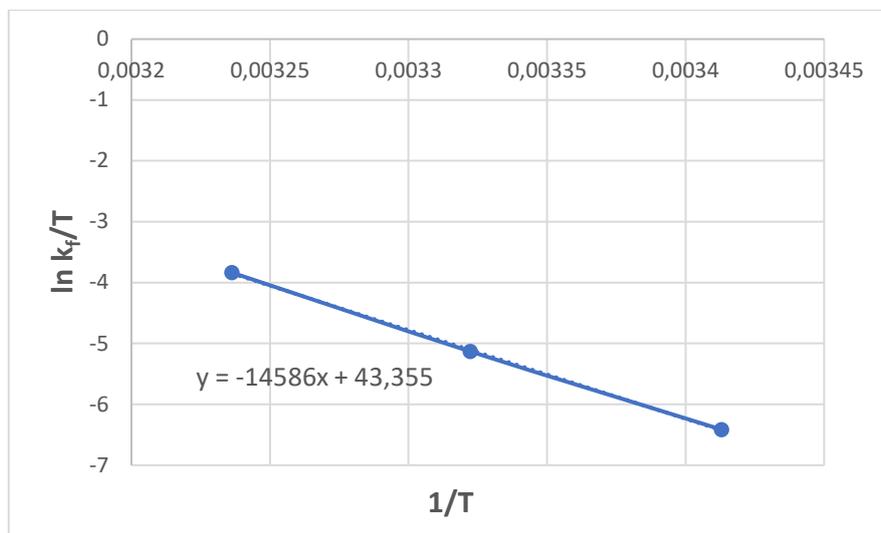


Рис 2.6.7. График для определения энтальпии активации прямой реакции

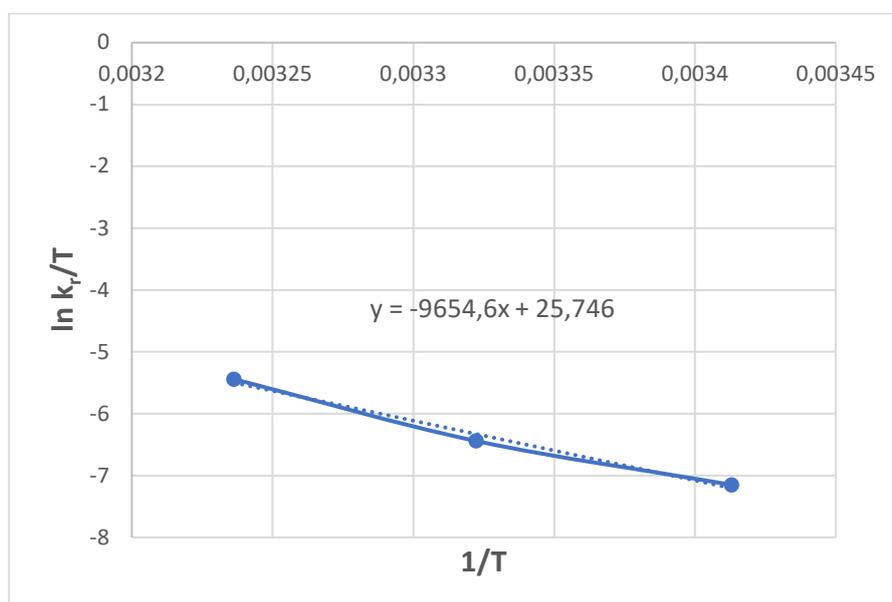


Рис 2.6.8. График для определения энтальпии активации обратной реакции

По тангенсу угла наклона прямой находим энтальпию активации прямой и обратной реакции.

$$\Delta H_f = -(-14586) \cdot 8,31 = 121209 \text{ Дж/моль} = 121,2 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta H_r = -(-9654,6) \cdot 8,31 = 80230 \text{ Дж/моль} = 80,2 \text{ кДж/моль}$$

По уравнению на графике находим $\ln(k/T)$ при стандартной температуре для прямой и обратной реакции. Далее по свойству логарифма частного находим значение $\ln k$ для реакций и рассчитываем стандартную энергию Гиббса активации для прямой и обратной реакции по формуле 2.6.27.

$$\ln k_f/T = -5,6$$

$$\ln k_r - \ln T = -5,6$$

$$\ln k_f = -5,6 + \ln 298 = 0,097$$

$$\ln k_r/T = -6,66$$

$$\ln k_r - \ln T = -6,66$$

$$\ln k_r = -6,66 + \ln 298 = -0,963$$

$$\Delta G_f^* = 2478 \cdot (29,5 - \ln k_f) = 72860 \text{ Дж/моль} = 72,9 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta G_r^* = 2478 \cdot (29,5 - \ln k_r) = 75487 \text{ Дж/моль} = 75,5 \text{ кДж/моль}$$

Находим энтропию активации для прямой и обратной реакции по формуле 2.6.12.

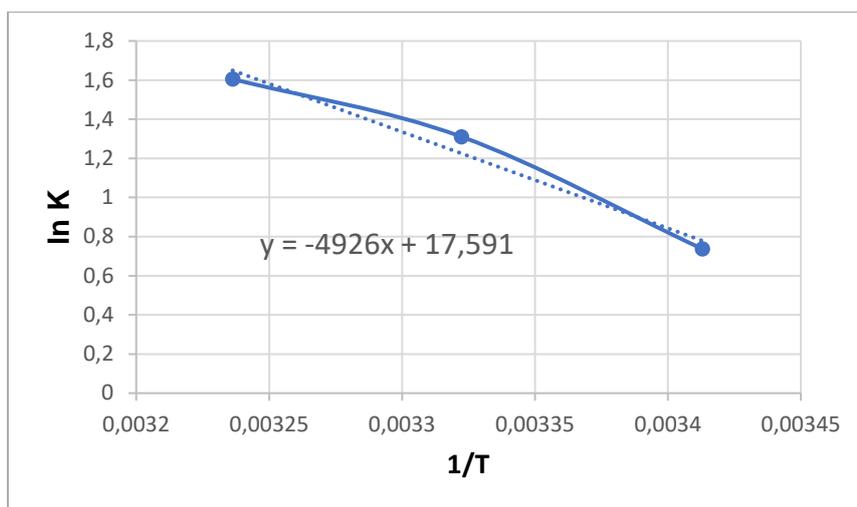
$$\Delta S_f = (121,2 - 72,9) / 298 = 0,162 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$$

$$\Delta S_r = (80,2 - 75,5) / 298 = 0,015 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$$

В данной задаче не приведены константы равновесия, но необходимо найти стандартные энтальпию и энтропию равновесной изомеризации. Это можно сделать двумя способами.

1. В любой химической реакции константа равновесия равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакции: $K = k_f / k_r$. Значит можно создать столбец 4 в таблице и для каждой температуры рассчитать константу равновесия. Нахождение термодинамических параметров по константе равновесия описано в задаче 3.

t °C	k _f , сек ⁻¹	k _r , сек ⁻¹	K
20	0,48	0,23	2,09
28	1,78	0,48	3,71
36	6,67	1,34	4,98

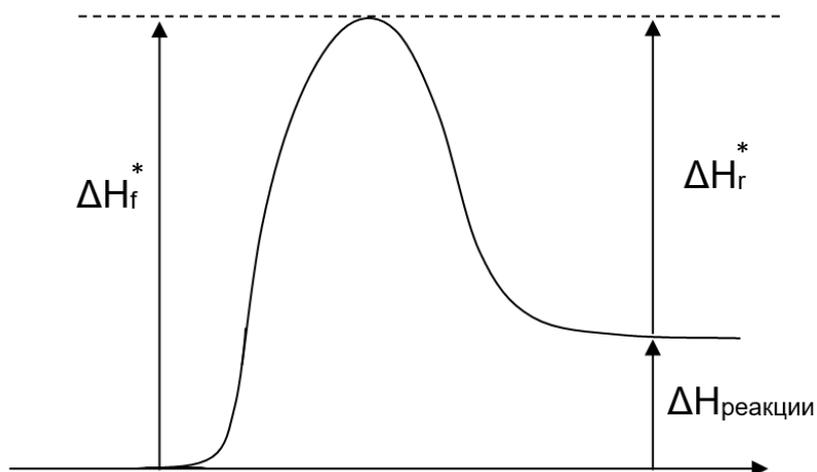


$$\Delta H = -(-4926) \cdot 8,3 = 40886 \text{ Дж/моль} = 41 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta G = -8,3 \cdot 298 \cdot 1,06 = -2621 \text{ Дж/моль} = -2,6 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta S = (40,89 + 2,62) / 298 = 0,15 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$$

2. Вспомним энергетическую диаграмму реакции (главы 2.3-2.4).



Из энергетической диаграммы видно, что разность энергий продуктов и исходных веществ определяется разностью энергий активации прямой и обратной реакций. В данной задаче мы уже определили энергии активации прямой и обратной реакций, поэтому удобно воспользоваться вторым способом и найти энергии равновесной изомеризации по разности энергий активации прямой и обратной реакции.

$$\Delta H_{\text{реакции}} = \Delta H_f - \Delta H_r = 121,2 - 80,2 = 41 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta G_{\text{реакции}} = \Delta G_f - \Delta G_r = 72,9 - 75,5 = -2,6 \text{ кДж/моль}$$

$$\Delta S_{\text{реакции}} = \Delta S_f - \Delta S_r = 0,162 - 0,015 = 0,15 \text{ кДж/моль} \cdot \text{K}$$

Как видим, оба способа приводят к одному и тому же результату.

Раздел 3. Другие биоспецифические взаимодействия

1. Параметры, характеризующие аффинность антител.
2. Способы расчета константы аффинности.
 - 2.1. Зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда.
 - 2.2. Определение константы аффинности в двойных обратных координатах.
 - 2.3. Метод Скэтчарда.
 - 2.4. Координаты Хилла.
3. Кинетические закономерности реакции взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор.
4. Методики определения констант скоростей ассоциации и диссоциации.

Глава 3.1. Определение параметров взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор

3.1.1. Параметры, характеризующие аффинность антител

Жизнь основана на взаимодействиях молекул. Все молекулы в ходе своего функционирования взаимодействуют с другими молекулами. Если какие-либо взаимодействия нарушаются, это приводит к болезни. Описать эти взаимодействия можно с помощью определенных параметров. Прочность взаимодействия оценивают с помощью константы связывания K_a (или константы диссоциации K_d) или энергии Гиббса $\Delta G = -RT \ln K_a$ ($\Delta G = RT \ln K_d$). Скорость образования и распада комплекса описывают с помощью констант скорости k_1 и k_{-1} соответственно. Рассмотрим способы расчета константы связывания для простейшего случая взаимодействия двух одноцентровых молекул.

В предыдущем разделе очень подробно было описано взаимодействие фермента с субстратом и методы расчета кинетических и термодинамических параметров этого взаимодействия. В этом разделе мы рассмотрим взаимодействия белковых молекул с любым лигандом. Это могут быть взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор, белок-РНК, транспортный белок-лиганд и т. д. Вы увидите, что механизм взаимодействия очень похож на взаимодействие фермента с субстратом, и способы нахождения параметров тоже имеют много общего.

Реакцию взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор можно рассматривать как связывание макромолекулы с лигандом. При введении в организм антигена в нем синтезируются антитела. Антитела специфически связываются с антигеном (гормоны с рецепторами) за счет всех тех же взаимодействий, которые обеспечивают взаимодействие фермента с субстратом: ионные, водородные, вандер-ваальсовы связи, гидрофобные взаимодействия. Специфичность взаимодействия определяется структурным соответствием, комплементарностью поверхностей антигена и антитела. В свою очередь комплементарность определяется тем, насколько близко могут подойти друг к другу две поверхности, насколько велика площадь соприкосновения и насколько прочные взаимодействия удерживают эти поверхности вместе.

Количественно прочность взаимодействия антиген-антитело чаще оценивают с помощью константы связывания K_a (в отличие от взаимодействия фермент-

субстрат, где используют константу диссоциации K_s). Специфичность взаимодействия антиген-антитело характеризуют через аффинность, а константу связывания называют константой аффинности. Рассмотрим простейший случай взаимодействия 2 молекул с одним центром связывания:



Свободные белок и лиганд начинают взаимодействовать, реакция протекает до установления равновесия, при котором скорость прямой реакции равна скорости обратной:

$$v = k_1[B][L] = k_{-1}[BL] \quad (3.1.2)$$

Константа равновесия или константа аффинности K_a

$$K_a = \frac{[BL]}{[B] \cdot [L]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (3.1.3)$$

Понятие специфичности является относительным. Если одна популяция антител взаимодействует с антигеном A_1 с константой аффинности K_1 , а с антигеном A_2 с константой аффинности K_2 , и $K_1 \gg K_2$, то данные антитела более специфичны к антигену A_1 и менее специфичны к A_2 . Большинство констант связывания в реакции антиген-антитело лежит в диапазоне $10^5 - 10^{11} M^{-1}$. Это соответствует энергии связывания $28-63 \text{ кДж/моль}$. Принято считать высокоаффинными антитела, взаимодействие которых с антигеном характеризуется константой связывания больше $10^8 M^{-1}$. Большей аффинностью обычно обладают антитела к гидрофобным лигандам, меньшей – к углеводным фрагментам.

На рисунке 3.1.1 показаны константы диссоциации комплексов рецептор-лиганд и константы Михаэлиса. Сравните наиболее вероятные величины констант диссоциации комплексов рецептор-лиганд и констант Михаэлиса. Сделайте вывод о сродстве лигандов к рецепторам и субстратов к ферментам (1).

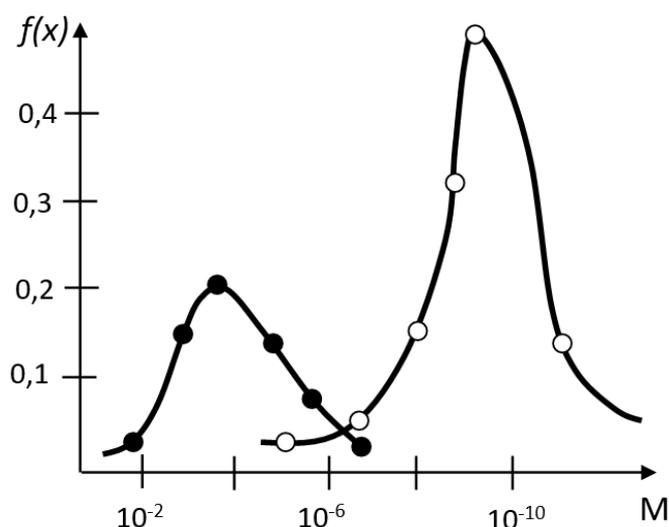


Рис. 3.1.1. Плотность распределения равновесной константы диссоциации комплексов лиганд-рецептор (пустые точки) и констант Михаэлиса (черные) [2]

Задача 1[7]

Антитело связывается с белком A с константой равновесия $K = 5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Когда это же антитело связывается с белком B , оно образует на 3 водородных связи меньше, поэтому энергия связывания уменьшается на 2,8 ккал/моль (при температуре 37°C). Определите константу связывания антитела с белком B . (Если вы рассчитываете энергию в калориях, то используйте значение $R = 1,98 \text{ кал/моль} \cdot \text{K}$)

3.1.2. Способы расчета константы аффинности

3.1.2.1. Зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда

Выведем зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда. Далее константу аффинности будем обозначать буквой K . Вывод состоит практически из тех же трех этапов, что и вывод уравнения Михаэлиса-Ментен.

1. Константа связывания выражается

$$K = \frac{[BL]}{[B] \cdot [L]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{1}{K_d} \quad (3.1.4)$$

где k_1 – константа скорости образования комплекса белок-лиганд, k_{-1} – константа скорости диссоциации комплекса. Изменение энергии Гиббса при образовании комплекса

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3.1.5)$$

2. Очевидно, что белок и лиганд в случае одноцентровых молекул имеют только два возможных состояния – свободное (B , L) и связанное (BL). Поэтому уравнения материального баланса имеют вид:

$$\begin{aligned} [B]_0 &= [B] + [BL] \\ [L]_0 &= [L] + [BL] \end{aligned} \quad (3.1.6)$$

3. Выразим концентрацию свободного белка через его суммарную концентрацию и подставим в выражение 3.1.4.

$$\begin{aligned} [B] &= [B]_0 - [BL] \\ K &= \frac{[BL]}{([B]_0 - [BL]) \cdot [L]} \end{aligned} \quad (3.1.7)$$

После несложных преобразований получим:

$$[BL] = \frac{K \cdot [B]_0 \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad (3.1.8)$$

Мы получили зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда, аналогичную изотерме Ленгмюра. Однако ее вид отличается от обычной изотермы и той, которая была выведена для концентрации фермент-субстратного комплекса (раздел 2.4). Причина в том, что в обычной изотерме Ленгмюра и при выводе

уравнения Михаэлиса-Ментен используется константа диссоциации, а при описании взаимодействий антиген-антитело чаще используют константу связывания. Если бы мы вывели зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда с помощью константы диссоциации, она выглядела бы так:

$$[БЛ] = \frac{[Б]_0 \cdot [Л]}{K_d + [Л]} \quad (3.1.9)$$

Поэтому в следующий раз, если где-то вы увидите разные выражения для описания концентрации комплекса или нахождения констант, обращайтесь внимание на то, какая это константа: константа связывания или диссоциации. В любом случае, зависимость концентрации комплекса от концентрации лиганда (и 3.1.8, и 3.1.9) представляет собой гиперболу, аналогичную изотерме адсорбции Ленгмюра (рис. 3.1.2). Аналогичную зависимость имеет и концентрация фермент-субстратного комплекса и скорость ферментативной реакции от концентрации субстрата (глава 2.4). И здесь, также как и в уравнении Михаэлиса-Ментен, должна стоять концентрация свободного лиганда. Но т.к. эксперимент часто проводят в условиях, когда концентрация лиганда намного больше концентрации фермента, антитела, рецептора ($[Л]_0 \gg [Б]_0$), то очевидно, что даже если весь белок свяжется в комплекс, то концентрация комплекса все равно будет намного меньше концентрации лиганда ($[БЛ] \ll [Л]$). Следовательно, концентрацией комплекса можно пренебречь по сравнению с концентрацией лиганда, и считать $[Л] \approx [Л]_0$. То есть, в выражения 3.1.8 и 3.1.9 можно подставлять общую концентрацию лиганда $[Л]_0$, внесенного в раствор, и тогда оно примет вид:

$$[БЛ] = \frac{K \cdot [Б]_0 \cdot [Л]_0}{1 + K \cdot [Л]_0} \quad (3.1.10)$$

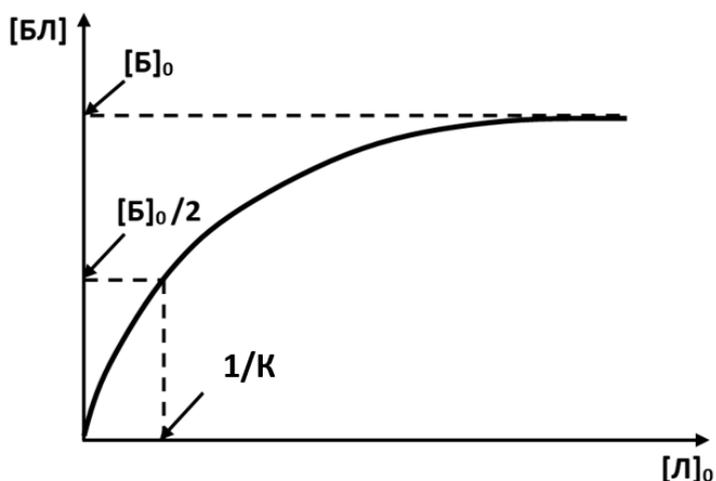


Рис. 3.1.2. Зависимость концентрации образующегося комплекса от общей концентрации лиганда в растворе

Для вычисления константы аффинности определяют концентрацию лиганда $[Л]_0'$, при которой половина белка находится в виде комплекса $[БЛ] = [Б]_0/2$. Подставив эту концентрацию комплекса в выражение 3.1.10, получим

$$\frac{1}{2} = \frac{K[L]_0'}{1 + K[L]_0'}$$

$$1 + K[L]_0' = 2K[L]_0'$$

$$K = 1/[L]_0' \quad (3.1.11)$$

Выражение 3.1.11 показывает, что **константа аффинности** комплекса из двух молекул численно равна обратной концентрации лиганда, при которой половина молекул белка (антитела, рецептора) связана в комплекс. Соответственно, константа диссоциации

$$K_d = 1/K = [L]_0' \quad (3.1.12)$$

И эта запись уже более привычна. Константа диссоциации комплекса из двух молекул численно равна концентрации лиганда, при которой половина молекул белка находится в связанном состоянии.

3.1.2.2. Определение константы аффинности в двойных обратных координатах

Константу связывания можно определить в двойных обратных координатах $1/[БЛ]$ от $1/[Л]_0$ (рис. 3.1.3) – аналогично координатам Лайнуивера-Берка. Перевернув обе части выражения 3.1.10, получим уравнение прямой:

$$\frac{1}{[БЛ]} = \frac{1 + K[L]_0}{K[B]_0[L]_0} = \frac{1}{K[B]_0} \cdot \frac{1}{[L]_0} + \frac{1}{[B]_0} \quad (3.1.13)$$

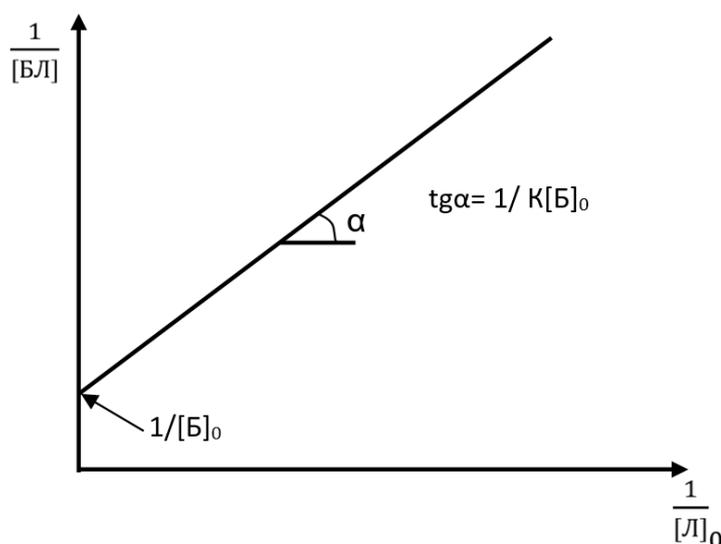


Рис. 3.1.3. Графическое определение константы связывания в двойных обратных координатах

Из выражения 3.1.13 находим точки пересечения с осями координат:

$$\begin{aligned} 1/[БЛ] &= 1/[Б]_0 \\ 1/[Л]_0 &= -K \end{aligned} \quad (3.1.14)$$

Константу аффинности K удобно находить по точке пересечения с осью абсцисс (3.1.14), либо по тангенсу угла наклона прямой. Тангенс угла наклона равен $1/K[Б]_0$. Однако этот график приводит к отклонениям от истинных значений, т.к. часто концентрация свободного лиганда отличается от общей концентрации лиганда и концентрация комплекса тоже определяется с существенными погрешностями.

3.1.2.3. Метод Скэтчарда

Чаще всего для определения константы аффинности используют метод Скэтчарда, являющийся наиболее надежным, т.к. здесь по оси абсцисс откладывают именно концентрацию свободного лиганда, а по оси ординат отношение концентраций, которое определяется точнее. Поделим числитель и знаменатель в выражении 3.1.8 на $[Л]$. Получим:

$$[БЛ] = \frac{K \cdot [Б]_0}{\frac{1}{[Л]} + K} \quad (3.1.15)$$

Умножим обе части выражения 3.1.15 на знаменатель $(K + 1/[Л])$ и перенесем слагаемое $[БЛ]*K$ в правую часть. Получим **уравнение Скэтчарда**:

$$[БЛ]/[Л] = K*[Б]_0 - K*[БЛ] \quad (3.1.16)$$

Данное уравнение впервые было получено Скэтчардом в 1949 г. В 1952 г. Ж. Иди и Б. Хофсти независимо друг от друга получили аналогичные уравнения для определения максимальной скорости и константы Михаэлиса ($v = V_{max} - K_m * v/[S]$).

В координатах Скэтчарда отношение концентраций связанного и свободного лигандов линейно зависит от концентрации связанного лиганда (комплексов лиганд-рецептор, антиген-антитело). В литературе часто эти координаты обозначают английскими буквами: концентрация комплекса белок-лиганд = $[БЛ] = B$ (boundary – связанный). Концентрация свободного лиганда = $[Л] = F$ (free – свободный). В этих обозначениях уравнение Скэтчарда примет вид:

$$B/F = K*B_0 - K*B \quad (3.1.17)$$

Чтобы построить график в координатах Скэтчарда (3.1.16, 3.1.17) по оси абсцисс откладывают концентрацию комплекса ($[БЛ]$, или B , или $[A_2-Am]$), а по оси ординат отношение концентраций связанного и свободного лиганда ($[БЛ]/[Л]$, или B/F , или $[A_2-Am]/[A_2]$) (рис. 3.1.4). Из выражения 3.1.17 видно, что точка пересечения с осью ординат равна $K*B_0$, а точка пересечения с осью абсцисс – B_0 . Тангенс угла наклона прямой равен константе аффинности со знаком минус $-K$.

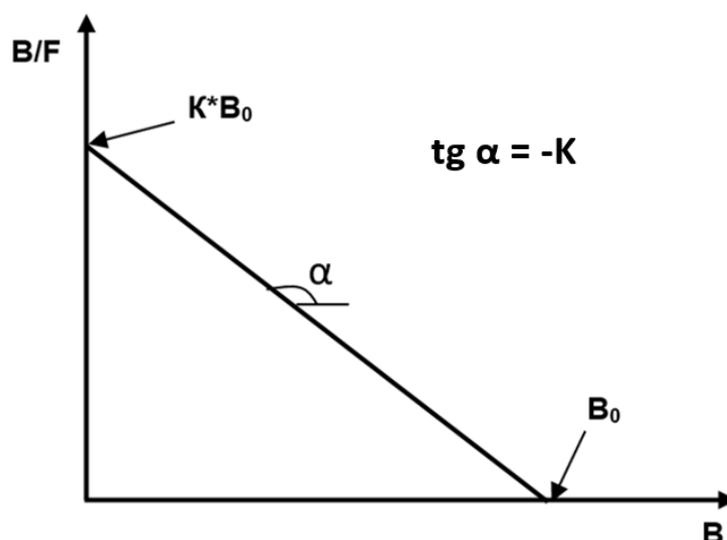


Рис. 3.1.4. График Скэтчарда для определения константы связывания

Чтобы построить этот график необходимо в эксперименте определить равновесную концентрацию комплекса (или свободного лиганда) при разных начальных концентрациях лиганда и постоянной концентрации белка. По полученным данным построить график. По точке пересечения с осью абсцисс определить концентрации центров связывания (если на белке имеется не один центр связывания). Константу аффинности удобно определить по точке пересечения с осью ординат либо по тангенсу угла наклона прямой.

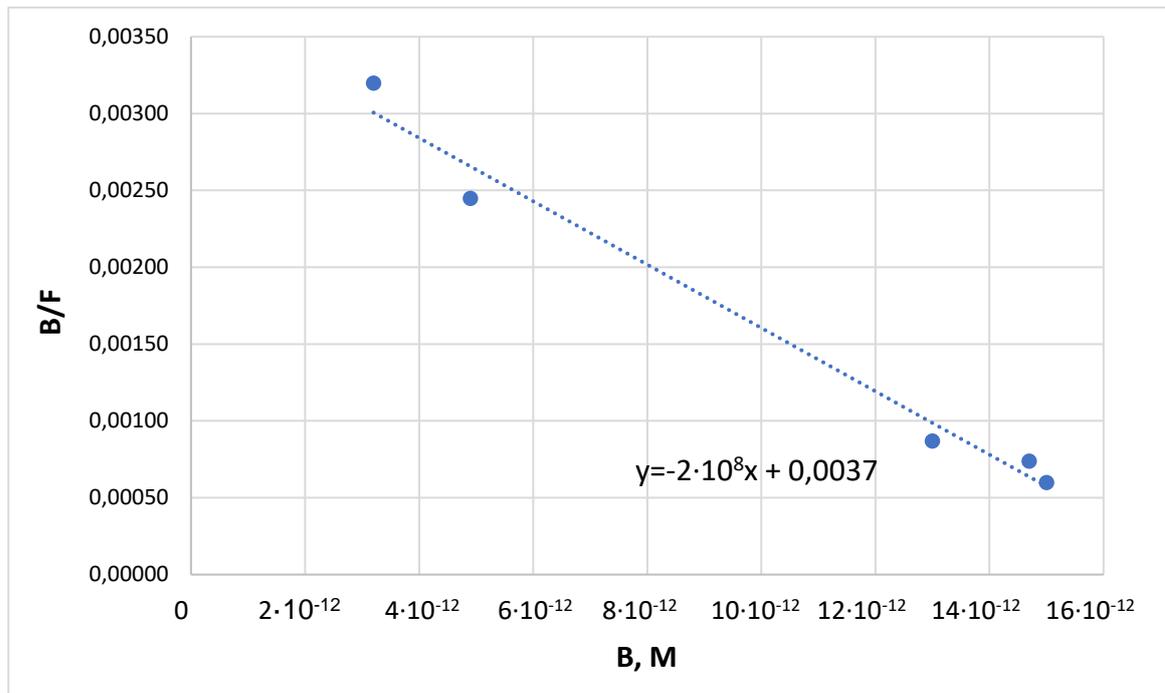
Задача 2. Определите концентрацию связывающих мест в головном мозге крысы и их сродство к (D-ala-2, D-leu-5)-энкефалину (ДАДЛЭ) на основании таблицы [2]

Концентрация добавленного лиганда, нМ	Концентрация связанного лиганда, пМ на 1 г ткани
1	3.2
2	4.9
15	13
20	14.7
25	15

1. В соответствии с уравнением 3.1.17 нам надо знать концентрации связанного лиганда (B) и свободного лиганда (F). Из таблицы видно, что концентрация лиганда ($1 \text{ нМ} = 10^{-9} \text{ М}$) намного больше концентрации комплекса ($1 \text{ пМ} = 10^{-12} \text{ М}$), поэтому концентрация свободного лиганда практически равна концентрации добавленного лиганда. Для каждой концентрации лиганда рассчитываем значение B/F (второй столбец делим на первый) и заполняем таблицу 2.

B, пМ	B/F
3.2	$3.2 \cdot 10^{-3}$
4.9	$2.45 \cdot 10^{-3}$
13	$0.87 \cdot 10^{-3}$
14.7	$0.74 \cdot 10^{-3}$
15	$0.6 \cdot 10^{-3}$

2. Строим график в координатах Скэтчарда (B/F от B).



- По тангенсу угла наклона находим константу аффинности центров связывания к энкефалину. $K = 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$
- По точке пересечения с осью абсцисс – концентрацию связывающих центров.

$$0 = -2 \cdot 10^8 x + 0,0037$$

$$X = 18,5 \cdot 10^{-12} \text{ M} = 18,5 \text{ пМ}$$

Ответ: концентрация связывающих мест 18,5 пМ, константа аффинности $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$

Если на белке имеется несколько центров связывания, то зная концентрацию белка можно определить число центров связывания на одной молекуле. По точке пересечения с осью абсцисс мы определяем концентрацию центров связывания. Поделив ее на известную концентрацию белка, находим число центров связывания на одной молекуле.

3.1.2.4. Координаты Хилла

Еще один способ определения константы аффинности – построение графика в координатах Хилла. Разделим обе части выражения 3.1. 8 на общую концентрацию белка, получим:

$$\frac{[BL]}{[B]_0} = \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} \quad (3.1.18)$$

После некоторых преобразований получим:

$$\frac{[BL]/[B]_0}{1 - [BL]/[B]_0} = K \cdot [L] \quad (3.1.19)$$

Прологарифмируем обе части выражения 3.1.19:

$$\lg \frac{[BL]/[B]_0}{1 - [BL]/[B]_0} = \lg K + \lg [L] \quad (3.1.20)$$

Строим график в координатах $\lg \frac{[BL]/[B]_0}{1 - [BL]/[B]_0}$ от $\lg [L]$ (рис. 3.15)

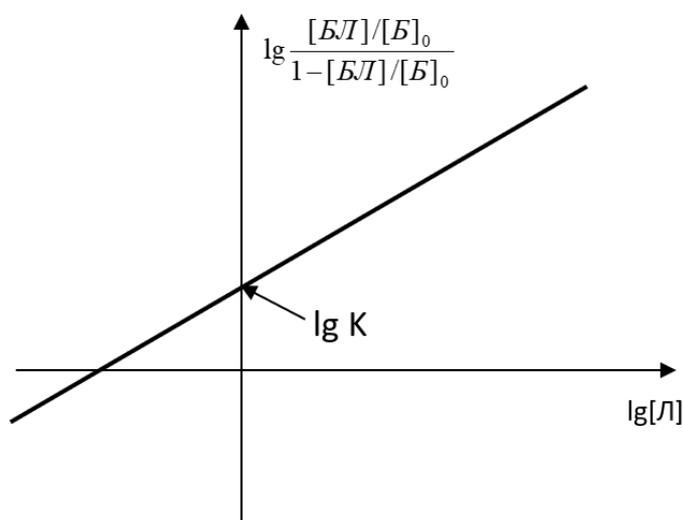


Рис. 3.1.5. Определение константы аффинности в координатах Хилла.

Из выражения 3.1.20 находим точки пересечения с осями. При $x = 0$, $y = \lg K$. То есть константу связывания находим по точке пересечения с осью ординат. Так как тангенс угла наклона равен 1, то точка пересечения с осью абсцисс тоже равна $\lg K$, взятому со знаком минус.

3.1.3. Кинетические закономерности реакции взаимодействия антиген-антитело, гормон-рецептор

Образование комплекса антиген-антитело, гормон-рецептор, как и большинство комплексов белок-лиганд, является обратимым процессом и описывается константой аффинности либо константой диссоциации. Обе эти равновесные константы определяются соотношением констант скоростей образования комплекса и его распада. Эти реакции протекают очень быстро, что затрудняет их определение обычными кинетическими методами. Их определение возможно с использованием двух подходов. В первом из них используют специальную аппаратуру для изучения быстрых реакций – метод остановленной

струи и метод температурного скачка. Другой подход связан с использованием очень маленьких концентраций реагентов, что позволяет снизить скорость реакции и применить обычные кинетические методы. Выведем зависимость концентрации комплекса белок-лиганд (рецептор-лиганд, антиген-антитело) от времени. Взаимодействие обратимо и описывается схемой 3.1.1. Тогда изменение концентрации комплекса во времени определяется скоростями его образования и распада:

$$d[БЛ]/dt = k_1[Б]^*[Л] - k_{-1}[БЛ] \quad (3.1.21)$$

В условиях избытка концентрации лиганда ($[Л] \gg [Б]$) решение этого дифференциального уравнения:

$$[БЛ] = \frac{[Л]_0 [Б]_0}{[Л]_0 + K_d} (1 - \exp[-(k_1 [Л]_0 + k_{-1})t]) \quad (3.1.22)$$

где $[Б]_0$ - начальная концентрация белка (антитела, рецептора), $[Л]_0$ - начальная концентрация лиганда, K_d константа диссоциации комплексов лиганд-белок. На рисунке 3.1.6 (а) показаны зависимости концентрации комплекса белок-лиганд от времени. Каждая линия соответствует определенной концентрации лиганда. В начальный момент времени концентрация комплекса равна нулю, и она постепенно увеличивается до равновесной концентрации. Из уравнения 3.1.22 следует, что равновесная концентрация комплекса белок-лиганд определяется выражением ($t \rightarrow \infty$):

$$[БЛ]_{равн} = \frac{[Л]_0 [Б]_0}{[Л]_0 + K_d} \quad (3.1.23)$$

Можно рассмотреть 2 частных случая.

1. Низкие концентрации лиганда: $[Л] \ll K_d$. В этом случае равновесная концентрация комплекса равна:

$$[БЛ]_{равн} \approx \frac{[Л]_0 [Б]_0}{K_d} \quad (3.1.24)$$

Видно, что при низких концентрациях лиганда равновесная концентрация комплекса зависит от произведения концентраций белка и лиганда.

2. Высокие концентрации лиганда: $[Л] \gg K_d$. Из выражения 3.1.23 следует, что при высоких концентрациях лиганда равновесная концентрация комплекса равна концентрации белка. Аналогичные зависимости были получены и для фермент-субстратного комплекса.

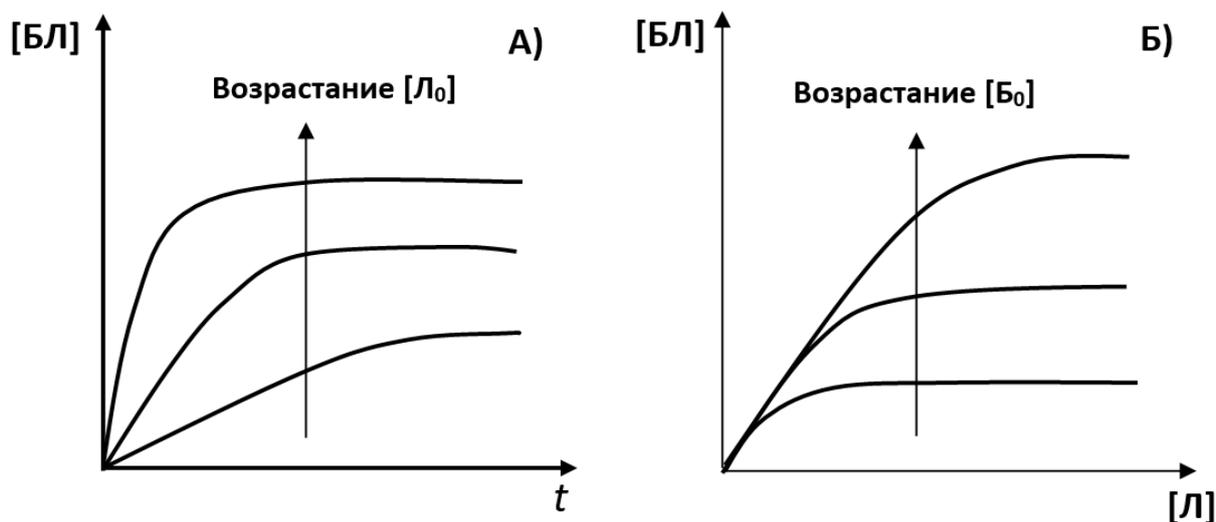


Рис. 3.1.6. А. Кинетика образования комплексов белок-лиганд при различных значениях концентрации лиганда. Б. Зависимость равновесной концентрации комплексов от концентрации лиганда

На рисунке 3.1.6 (б) показана зависимость равновесной концентрации комплекса от концентрации лиганда. Аналогичные зависимости были получены и для ферментативных реакций. Зависимость концентрации фермент-субстратного комплекса и скорости реакции от концентрации субстрата представляет собой гиперболу. При высоких концентрациях субстрата наблюдается максимальная скорость реакции. А максимальная скорость в свою очередь определяется концентрацией фермента:

$$V_{max} = k_2[ES]_{max} = k_2[E]_0 \quad (3.1.25)$$

Константы скоростей ассоциации и диссоциации комплекса белок-лиганд различаются по размерности (укажите их размерность (2) и по абсолютному значению. По рисунку 3.1.7 определите: какие значения констант скоростей ассоциации и диссоциации комплексов лиганд-рецептор встречаются чаще всего (3).

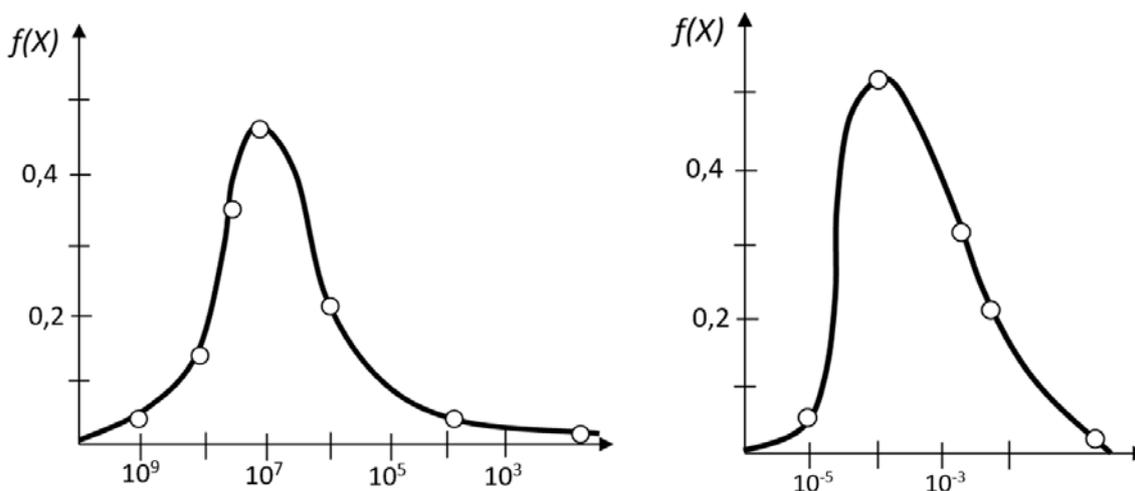


Рис. 3.1.7. Плотность распределения констант скоростей ассоциации (слева) и диссоциации комплексов лиганд-рецептор (справа) [2]

По рисунку видно, что константы скоростей ассоциации на несколько порядков превышают константы скоростей диссоциации комплексов. Считается, что различия

антител в аффинности, в основном, обусловлены различиями в константах скоростей диссоциации. То есть константа скорости диссоциации определяет сродство антител к антигену.

3.1.4. Методики определения констант скоростей ассоциации и диссоциации

Методики определения констант скоростей основаны на анализе выражения 3.1.22. Так как математически такой анализ довольно сложен, мы не будем сами выводить уравнения, а воспользуемся готовой методикой построения прямых и определения констант.

Методика 1 определения констант скоростей ассоциации и диссоциации

1. Построить графики в координатах $-\ln(1-[БЛ]/[БЛ]_{max})$ от t при двух различных концентрациях лиганда.

2. По тангенсу угла наклона прямых определить параметры $k(L_1)$ и $k(L_2)$. Если выражение 3.1.22 переписать в сокращенном виде:

$[БЛ] = [БЛ]_{max}(1 - e^{-kt})$, то параметры $k(L_1)$ и $k(L_2)$ – это и есть показатели экспоненты в данном уравнении для различных начальных концентраций лиганда. То есть $k(L_1) = k_1[L_1]_0 + k_{-1}$, а $k(L_2) = k_1[L_2]_0 + k_{-1}$. Не путайте эти параметры с константами скоростей!

3. Вычислить константу скорости ассоциации k_1 и константу скорости диссоциации k_{-1} по формулам:

$$k_1 = \frac{k(L_1) - k(L_2)}{[L]_1 - [L]_2}$$

$$k_{-1} = \frac{[L]_2 k(L_1) - [L]_1 k(L_2)}{[L]_1 - [L]_2} \quad (3.1.26)$$

Задача 3.

Определите константы скоростей ассоциации и диссоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка на основании данных таблицы. Рассчитайте константу диссоциации [2].

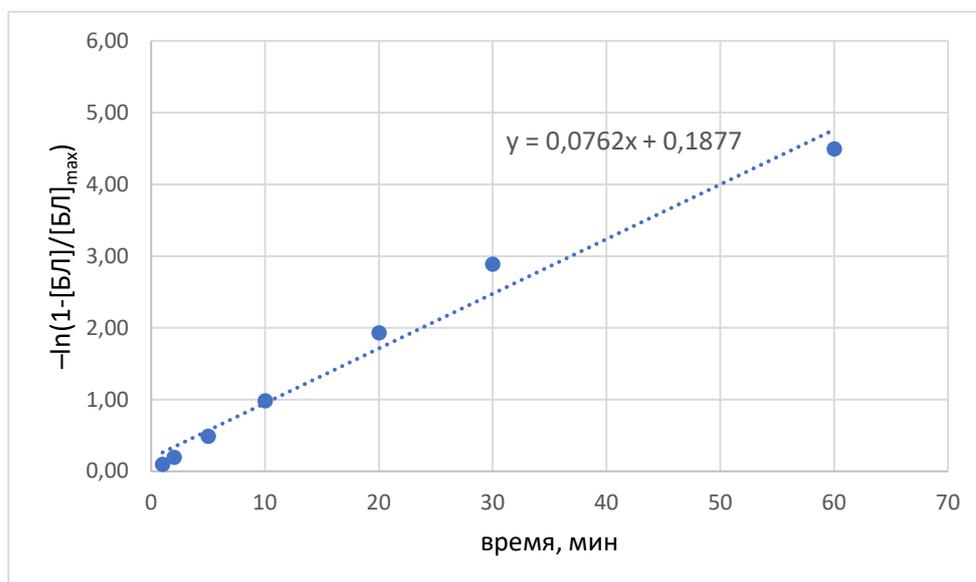
Время ассоциации, мин	Концентрация комплекса, $M \cdot 10^{-11}$ при концентрации фактора роста 4 нМ	Концентрация комплекса, $M \cdot 10^{-11}$ при концентрации фактора роста 10 нМ
1	1,67	3,59
2	3,18	6,58
5	6,92	12,9
10	11,2	18,1
20	15,3	21,0
30	16,9	21,5
60	17,7	21,6
90	17,9	21,6
120	17,9	21,6
240	17,9	21,6

Решение.

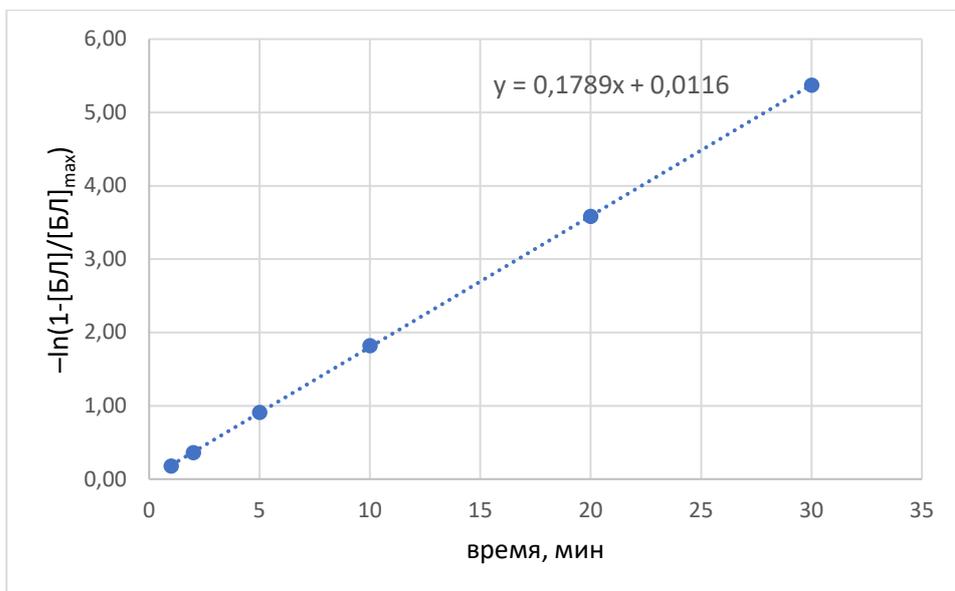
1. По таблице определяем максимальную концентрацию комплекса фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка. $[БЛ]_{max}$ при концентрации лиганда $4 \cdot 10^{-9}$ М равна $17,9 \cdot 10^{-11}$ М. $[БЛ]_{max}$ при концентрации лиганда $10 \cdot 10^{-9}$ М равна $21,6 \cdot 10^{-11}$ М.
2. Для каждого момента времени (при котором не достигается максимальная концентрация комплекса) рассчитываем значение $-\ln(1-[БЛ]/[БЛ]_{max})$. Составляем таблицу 2.

Время ассоциации, мин	$-\ln(1-[БЛ]/ 17,9 \cdot 10^{-11} \text{ М})$	$-\ln(1-[БЛ]/ 21,6 \cdot 10^{-11} \text{ М})$
1	0,10	0,18
2	0,20	0,36
5	0,49	0,91
10	0,98	1,82
20	1,93	3,58
30	2,88	5,38
60	4,49	

3. По данным таблицы строим два графика в координатах $-\ln(1-[БЛ]/[БЛ]_{max})$ от t при двух различных концентрациях лиганда.



Концентрация лиганда 4 нМ



Концентрация лиганда 10 нМ

4. По тангенсу угла наклона прямых определяем параметры $k(L_1)$ – при концентрации лиганда 4 нМ и $k(L_2)$ – при концентрации лиганда 10 нМ. $k(L_1) = 0,076$, $k(L_2) = 0,179$
5. По формуле 3.1.26 определяем константы скоростей ассоциации и диссоциации комплекса:

$$k_1 = \frac{k(L_1) - k(L_2)}{4 \cdot 10^{-9} - 10 \cdot 10^{-9}} = 1,7 \cdot 10^8 [k(L_2) - k(L_1)]$$

$$k_{-1} = \frac{10 \cdot 10^{-9} k(L_1) - 4 \cdot 10^{-9} k(L_2)}{-6 \cdot 10^{-9}} = 0,67k(L_2) - 1,67k(L_1)$$

$$k_1 = 1,7 \cdot 10^8 \cdot (0,179 - 0,076) = 0,175 \cdot 10^8 = 1,75 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$$

$$k_{-1} = 0,67 \cdot 0,179 - 1,67 \cdot 0,076 = -0,00699 = 7 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$$

$$K_d = k_{-1} / k_1 = 7 \cdot 10^{-3} / 1,75 \cdot 10^7 = 4 \cdot 10^{-10} \text{ М}$$

Методика 2 определения константы скорости диссоциации

Константу скорости ассоциации обычно определяют в экспериментах, добавляя радиоактивный лиганд и измеряя концентрацию меченого комплекса в различные моменты времени. Тогда константу скорости диссоциации можно определять, вводя в систему «белок-меченый лиганд» избыток немеченого «холодного» лиганда. В данном случае концентрация меченого комплекса будет уменьшаться, так как при равновесии постоянно происходит образование и распад комплекса. Диссоциацию комплекса можно описать схемой:



Скорость изменения концентрации комплекса в этой схеме, согласно закону действующих масс:

$$d[\text{БЛ}]/dt = -k_1[\text{БЛ}] \quad (3.1.28)$$

Это обычная реакция первого порядка, записанная в дифференциальном виде. Интегрированием получаем:

$$\ln [\text{БЛ}] = -k_1 t + C$$

С учетом начальных условий (при $t = 0$ $[\text{БЛ}] = [\text{БЛ}]_0$) получим:

$$\ln ([\text{БЛ}]/[\text{БЛ}]_0) = -k_1 t \quad (3.1.29)$$

Выражение 3.1.29 представляет собой линейную функцию от времени. Строим график в координатах $\ln ([\text{БЛ}]/[\text{БЛ}]_0)$ от времени. Тангенс угла наклона прямой равен константе скорости диссоциации комплекса со знаком минус.

Задача 4.

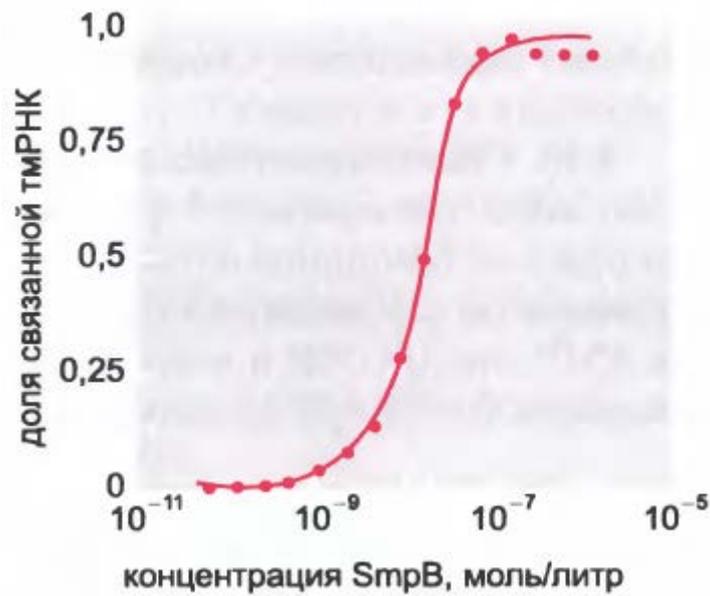
Определите константу скорости диссоциации фактора роста нервов с мембранами головного мозга быка по данным таблицы [2]

Время диссоциации, мин	Концентрация комплекса, $M \cdot 10^{-13}$
0	344
5	113
10	100
30	38
60	7

Сравните найденную константу скорости диссоциации со значением в задаче 2.

Дополнительные вопросы для подготовки к семинару:

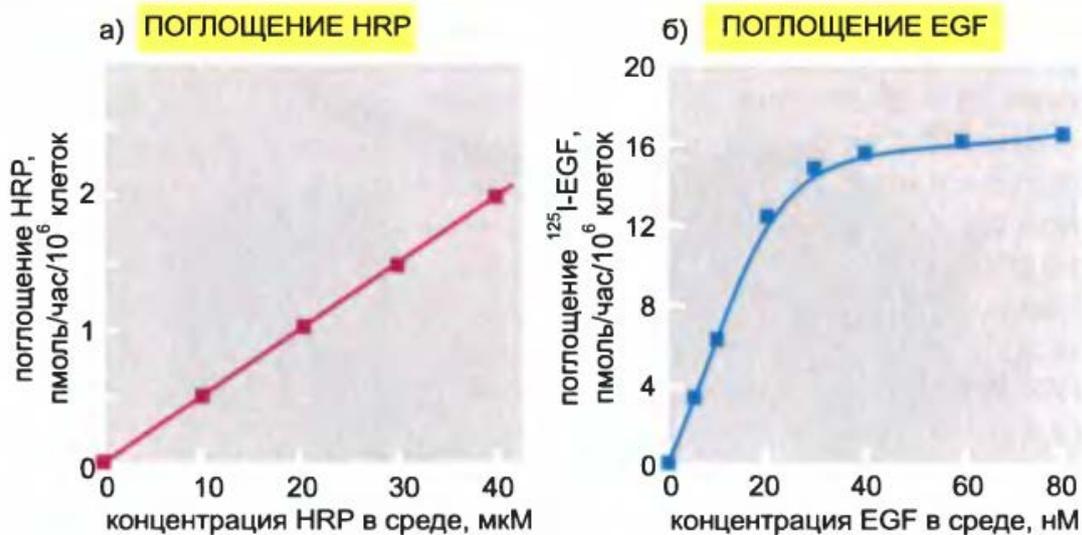
1. Сравните наиболее вероятные величины констант диссоциации комплексов рецептор-лиганд, антиген-антитело и констант Михаэлиса. Сделайте вывод о сродстве лигандов к рецепторам и субстратов к ферментам.
2. Укажите размерность констант скоростей ассоциации и диссоциации комплекса.
3. По рисунку 3.1.7 определите, какие значения констант скоростей ассоциации и диссоциации комплексов лиганд-рецептор встречаются чаще всего.
4. Решите задачи 1-4 (в теоретической части)
5. Белок SmpB связывается с определенными укороченными мРНК (truncated) – тмРНК бактерий, чтобы удалять неполные белки. На рисунке показана зависимость доли связанной тмРНК от концентрации белка SmpB.[7]



С помощью выражения 3.1.9 вычислите долю связанной тмРНК при концентрациях белка, представленных в таблице. Заполните таблицу

[SmpB]	$10^4 K_d$	$10^3 K_d$	$100 K_d$	$10 K_d$	$1 K_d$	$0,1 K_d$	$0,01 K_d$	$10^{-3} K_d$	$10^{-4} K_d$
$\frac{[tmRNA]_{связ}}{[tmRNA]_{общ}}$									

6. Клетки могут поглощать внеклеточные молекулы посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза либо эндоцитоза жидкой фазы. На рисунке показаны зависимости поглощения пероксидазы хрена (HRP) и эпидермального фактора роста (EGF) от их концентрации в среде. Оба белка обнаруживались в маленьких везикулах радиусом 20 нм.[7]



- A. Определите, какой из этих белков поглощается с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, а какой - с помощью эндоцитоза жидкой фазы. Поясните выбор.
- B. Оцените различия в скоростях поглощения при концентрации белков 40 нМ и 40 мкМ.
- C. Рассчитайте среднее число молекул HRP в одном пузырьке при концентрации белка в среде 40 мкМ.
- D. Ученые, поставившие эксперимент, написали: «Данные расчеты ясно показывают, как клетки поглощают EGF посредством эндоцитоза почти полностью исключая при этом внеклеточную жидкость». Докажите это расчетами.

Глава 3.2. Основы фармакокинетики

Только доза делает лекарство ядом и яд лекарством.

Парацельс

1. Фармакокинетика. Краткая история.
2. Основные понятия фармакокинетики.
3. Однокамерные фармакокинетические модели.
4. Период полувыведения лекарственного вещества.
5. Другие фармакокинетические модели.
6. Фармакокинетическая оптимизация терапии.

3.2.1. Фармакокинетика. Краткая история

Фармакокинетика (от греческих слов *pharmakon*– лекарство и *kineo*–двигать) изучает кинетические закономерности процессов преобразования лекарственных веществ в организме человека или животного. Чтобы не путать фармакокинетику с фармакодинамикой, запомните афоризм: «Фармакокинетика изучает то, что делает организм с лекарством, а фармакодинамика – то, что делает лекарство с организмом». Для того чтобы лекарственное вещество подействовало на какой-либо орган или ткань, необходимо, чтобы в клетке были специфичные к нему рецепторы. Результат воздействия зависит от концентрации рецепторов и лекарственного вещества, константы аффинности, скорости превращения и выведения лекарственного средства.

Основная цель фармакокинетики – подобрать такую дозу лекарственного вещества, чтобы добиться максимального лечебного эффекта и минимального токсического.

Люди пытались вылечить себя или друг друга с момента своего возникновения. Основной способ поиска – пробовать все подряд и наблюдать за результатом. Конечно же, этот путь длинный, смертельно опасный, неэффективный, но другого пути не было. Нельзя назвать дату или ученого, с которого началась фармакокинетика. Возможно, началом фармакокинетики можно считать 1918 г, когда Л. С. Штерн описала существование в организме жидкостей, относительно изолированных друг от друга. Какие физиологические жидкости вы знаете? (1). После попадания лекарственного вещества в одну из них, оно практически не может проникнуть в другую. Важность этого утверждения состоит в том, что отдельные жидкости можно рассматривать как камеры (компарменты) и изучать в них концентрацию лекарственного средства, скорость проникновения его в данный отсек, скорость метаболизма и скорость выведения. На этом основаны практически все фармакокинетические модели. Первая фармакокинетическая модель была предложена в 1919 г шведским ученым Эриком Видмарком. Он предложил формулу для расчета концентрации спирта в крови, которую так и называют формулой Видмарка. Название науки «фармакокинетика» появилось лишь в 1953 г., предложено немецким ученым Ф. Достом.

3.2.2. Основные понятия фармакокинетики

У каждой группы людей, области деятельности свой словарь. И, конечно же, есть много слов, которые вы используете, а ваши родители даже не знают об их существовании. Познакомимся со словарем фармакокинетики.

Доза – количество лекарственного вещества, введенного в организм. Выделяют разовую, суточную и курсовые дозы. Что назначают в разовых дозах? (2) В *суточных* дозах обычно назначают препараты, которые обладают накопительным эффектом. Как правило, она делится на несколько приемов. В *курсовых* дозах назначают препараты с отсроченным терапевтическим эффектом. Для многих препаратов подобраны схемы введения.

Как определяют дозы? На подопытных животных определяют эффективную, токсическую и летальную дозы (доклинические испытания). *Эффективная доза ED* – доза, вызывающая желаемый эффект. *Токсическая доза TD* – приводит к развитию токсических осложнений. *Летальная доза LD* – доза, приводящая к гибели подопытных животных. Чаще всего определяют ED₁, ED₅₀, ED₉₉, TD₁, TD₅₀, TD₉₉, LD₁, LD₅₀, LD₉₉. Попробуйте догадаться, что это такое? (3). Кроме того, во время доклинических испытаний определяют канцерогенность, мутагенность, тератогенность, эмбриотоксичность лекарственного препарата, а также его влияние на репродуктивные функции.

А сейчас подумайте о том, что такое хороший лекарственный препарат? Запишите требования к нему в виде равенств или неравенств. (4) Чем больше интервал между *ED* и *TD*, тем препарат более безопасный. В каком случае терапевтические дозы препарата не вызывают токсических эффектов? (5) В каком случае терапевтические дозы препарата вызывают токсические осложнения? (6). Лекарственные препараты существенно различаются по токсичности. Например, к низкотоксичным относятся нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), к высокотоксичным – противоопухолевые препараты, препараты для лечения СПИДа, аминогликозидные антибиотики и т.д.

Можно ли на животных выявить все возможные терапевтические и побочные эффекты? Почему? (7) После испытаний на животных проводят клинические испытания на добровольцах. По некоторым данным, лишь 10 % препаратов успешно проходят клинические испытания, по другим данным эта доля еще ниже и составляет только 2%. Почти у половины препаратов, эффективных в доклинических испытаниях, отсутствует эффект при испытании на людях. Примерно третья часть испытуемых лекарственных средств отвергается по причине токсичности или побочных эффектов, около 10-15 % исследуемых препаратов не проходят клинические испытания из-за плохого всасывания, выведения или биотрансформации. Еще 10% разработанных лекарств не появляются на рынке по причине нецелесообразности их производства.

В клинических испытаниях терминология несколько отличается от терминологии доклинических испытаний. *Минимальная терапевтическая доза* – минимальное количество лекарственного препарата, которое необходимо ввести для получения терапевтического эффекта. *Минимальная токсическая доза* – минимальное количество лекарственного вещества, при котором начинается развитие токсических явлений. Сравните термины доз в клинических испытаниях и испытаниях на животных. Тождественны ли они? (8). Разница между минимальной

терапевтической и минимальной токсической дозами – *терапевтический диапазон* (терапевтический коридор, широта терапевтического действия лекарственного вещества). Хорошо, когда он большой или маленький? (9)

Минимальная терапевтическая и токсическая дозы зависят от способа введения лекарственного вещества в организм. От способа введения зависят и биотрансформация, и биодоступность лекарственного препарата. **Биотрансформация** – метаболизм лекарственного препарата в организме. **Биодоступность** – доля введенного лекарственного средства, которая в неизменном виде поступила в целевые органы и ткани. Способ введения влияет на скорость всасывания, начало воздействия лекарственного средства, эффективность и продолжительность действия. Все пути введения делятся на две группы: энтеральные (от греч. *enteron* – кишка) – через желудочно-кишечный тракт и парентеральные (от греч. *para* – около) – не через пищеварительный тракт (таблица 3.2.1). К энтеральным путям введения относятся: пероральный – внутрь, через рот (*peros*), сублингвальный – под язык (*sublingua*), суббуккальный (за щеку), дуоденальный (в двенадцатиперстную кишку), ректальный – через прямую кишку (*rectum*) и др.

Таблица 3.2.1.

Пути введения лекарственных веществ

энтеральный (через ЖКТ)	парентеральный	
	инъекционный	неинъекционный
сублингвальный и суббуккальный	подкожный	ингаляционный
пероральный	внутримышечный	интраназальный (через нос)
дуоденальный	внутривенный	трансдермальный
ректальный	внутриартериальный	в наружный слуховой проход
	внутриполостной (брюшина, плевра, сустав)	
	интратекальный (вокруг спинного мозга)	

Самый удобный, простой и наиболее распространенный способ – пероральный. Всасывание препарата из полости ЖКТ через стенку кишечника может происходить с помощью пассивного или активного транспорта. Пассивная диффузия происходит по градиенту концентрации вещества и описывается первым законом Фика:

$$-dC/dt = k\Delta C \quad (3.2.1)$$

где ΔC – разность концентраций вещества по обе стороны мембраны, k – коэффициент пропорциональности, зависящий от коэффициента диффузии, толщины, площади и проницаемости мембраны (эпителиального барьера кишечника) для данного препарата. Обычно концентрация лекарственного

препарата в крови намного меньше, чем его концентрация в кишечнике, поэтому разность концентраций в уравнении 3.2.1 примерно равна концентрации вещества в кишечнике. Тогда закон Фика примет вид:

$$-dC/dt \approx kC_1 \quad (3.2.2)$$

где C_1 – концентрация лекарственного препарата в кишечнике. На практике действительно оказывается, что процесс всасывания многих лекарственных веществ описывается кинетикой первого порядка. При этом возрастание концентрации в ЖКТ приводит к пропорциональному возрастанию скорости всасывания. Пассивной диффузией могут всасываться небольшие липофильные молекулы (гидрокортизон, $M_r = 362$).

Другая группа лекарственных препаратов не способна проникать через мембрану. Такие вещества попадают в кровь либо с помощью облегченной диффузии (по градиенту концентрации с переносчиками), либо с помощью активного транспорта (против градиента концентрации, с использованием энергии). Путем облегченной диффузии в кровь транспортируются некоторые витамины (тиамин, рибофлавин). С помощью активного транспорта - ионы натрия, кальция, железа, глюкоза, аминокислоты, жирные кислоты. Так как число молекул-переносчиков на мембране ограничено, то скорость всасывания таких веществ имеет предел, обусловленный максимальной загрузкой всех переносчиков. Это состояние, когда все транспортные молекулы насыщены, достигается при высокой концентрации лекарственного вещества и характеризуется максимальной скоростью всасывания. Зависимость скорости всасывания от концентрации лекарственного вещества описывается кинетикой Михаэлиса-Ментен:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max} [C]}{K + [C]} \quad (3.2.3)$$

В этом нет ничего удивительного, т.к. переносчики тоже имеют активный центр, связывающий лекарственное вещество, или, другими словами, ограниченное число центров адсорбции. Из этого следует, что при облегченной диффузии или активном транспорте не имеет смысла значительно увеличивать концентрацию лекарственного вещества. Существенная его часть при этом не успеет всосаться в кровь (см. задачу 6 в разделе 3.1).

Пероральный способ введения не требует стерилизации, медицинского персонала и технического оснащения. Таким путем можно вводить большинство лекарственных средств (жидкие и твердые лекарственные формы). Однако при этом лекарственное вещество всасывается не полностью, его действие развивается только через определенный промежуток времени (20–30 мин), когда оно достигнет места своего назначения. При этом возможно его расщепление или модификация ферментами пищеварительного тракта и печени. Например, пенициллин и аспирин метаболизируются в ЖКТ, нитроглицерин практически полностью всасывается из кишечника, но при прохождении через печень разрушается более чем на 90%. Сделайте вывод о том, в каких дозах используют препараты для перорального введения, и в каких случаях они не подходят (10)?

При сублингвальном способе введения препарат поступает в кровь, минуя печень, за 2-3 минуты. Этот способ введения может использоваться при нарушении

всасывания определенных веществ и при экстренной помощи. При внутривенном введении лекарственные вещества быстро поступают в кровоток, они обладают высокой биодоступностью. Назовите минусы препаратов для внутривенного введения (11). При инъекционном подкожном введении скорость поступления лекарственного вещества уменьшается, но их биодоступность такая же высокая, как и при внутривенном введении. Так, инсулин при инсулинзависимой форме сахарного диабета вводят подкожно для постепенного, медленного и достаточно равномерного поступления препарата. Однако это наиболее болезненный способ, т.к. под кожей имеется много нервных окончаний. Энтеральное введение инсулина невозможно из-за полного разрушения его в ЖКТ.

3.2.3. Однокамерные фармакокинетические модели

Основной параметр, влияющий на эффективность лекарственного препарата – его концентрация в органах-мишенях или тканях, в которых требуется его воздействие. Поэтому важно поддерживать определенную концентрацию препарата в месте его воздействия. Как правило, измерить концентрацию вещества в ткани практически невозможно. Но известно, что концентрации большинства лекарственных веществ в органах и тканях связаны с их концентрациями в плазме крови. Поэтому, измеряя концентрации веществ в плазме крови, можно судить об изменении концентрации лекарственных средств в тканях-мишенях. Для описания изменения концентрации лекарственных веществ в организме используются фармакокинетические модели. Точное описание всех процессов, изменения концентраций лекарственного препарата и его метаболитов в различных тканях – исключительно сложная, практически невозможная задача. Самое главное в таких случаях выбрать основные параметры, влияющие на эффективность действия препарата, и отбросить второстепенные показатели. Сложность заключается еще и в том, что у конкретного пациента невозможно постоянно измерять концентрацию препарата в ткани-мишени. Большинство моделей предполагает, что концентрация лекарственного вещества в целевом органе пропорциональна концентрации этого вещества в плазме (или моче).

Как и всякая модель, **фармакокинетическая модель** – очень упрощенное математическое описание того, как изменяется концентрация лекарственного вещества в организме. При этом делается много допущений, в которых не учитываются адсорбция, метаболизм, проникновение веществ из одной камеры в другую, особенности организма и его состояния, обратные связи и т.д. Однако и упрощенные модели дают полезную информацию для исследования влияния лекарственного средства на организм, подбора дозы вещества, пути и периодичности введения и т. д.

В фармакокинетических моделях предполагается, что лекарственное вещество распределено в ограниченных областях организма (камерах), а переход из одной камеры в другую описывается линейным дифференциальным уравнением. Такое моделирование называется камерным (компарментным). Каким бы сложным ни был процесс, существует такой промежуток времени, в течение которого процесс будет линейным. **Камера** (компармент) представляет собой ограниченный в пространстве объем жидкости (ткани): кровь, лимфа, межтканевая жидкость и жидкость отдельных органов. При этом концентрация лекарственного вещества во всех точках камеры предполагается одинаковой. В большинстве случаев одна из камер представляет собой плазму крови, т.к. в ней удобнее всего определять

концентрации веществ и, кроме того, все ткани обмениваются веществами с плазмой крови. Лекарственный препарат обычно представляет собой небольшие молекулы, которые легко проникают через стенки капилляров в ткани.

Еще один важный фармакокинетический параметр: **объем распределения**. Это условный объем жидкости организма, рассчитанный исходя из предположения о том, что вся введенная доза лекарственного препарата распределилась по данному объему с концентрацией, равной его концентрации в плазме крови. Чем больше объем распределения, тем большая часть лекарственного препарата поступает в ткани и клетки. При этом для конкретного лекарственного вещества объем распределения не зависит от введенной дозы. То есть, если доза препарата увеличена в 2 раза, то в 2 раза возрастает концентрация вещества в ткани, а объем распределения остается постоянным. Такая зависимость концентрации лекарственного вещества от введенной дозы препарата представляет собой пример линейной фармакокинетики.

Простейшие фармакокинетические модели являются однокамерными. Они хорошо описывают, например, кинетику лекарственных препаратов в плазме крови после быстрого (болюсного) внутривенного введения. В однокамерной модели предполагается, что в начальный момент времени во всей камере объема V_d введенная доза лекарственного препарата m распределена равномерно с концентрацией C . В начальный момент времени в окружающих камеру тканях данное вещество отсутствует. Скорость выведения препарата из камеры пропорциональна его количеству в камере (рис. 3.2.1).

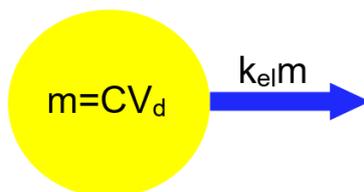


Рис. 3.2.1. Однокамерная фармакокинетическая модель. V_d (мл) – кажущийся объем распределения (distribution) лекарственного вещества, C (мг/мл) – концентрация вещества в камере, m (мг) – масса вещества в камере, k_{el} (мин⁻¹) – константа элиминации (выведения) лекарственного вещества

Как будет изменяться концентрация вещества (масса) в камере? Вспомним основной закон химической кинетики, он же закон действующих масс:

$$dC/dt = -k_{el}C \quad (3.2.4)$$

Проинтегрируем обе части уравнения 3.2.4. Зависимость в интегральной форме:

$$\begin{aligned} \ln C &= \ln C_0 - k_{el}t \\ C &= C_0 \exp(-k_{el}t) \end{aligned} \quad (3.2.5)$$

Как определить константу элиминации и начальную концентрацию лекарственного вещества? (12) Масса введенного лекарственного вещества m_0 равна введенной дозе препарата. Измеряют концентрацию вещества в плазме

крови в различные моменты времени и строят график в полулогарифмических координатах $\ln C(t)$ (выражение 3.2.5).

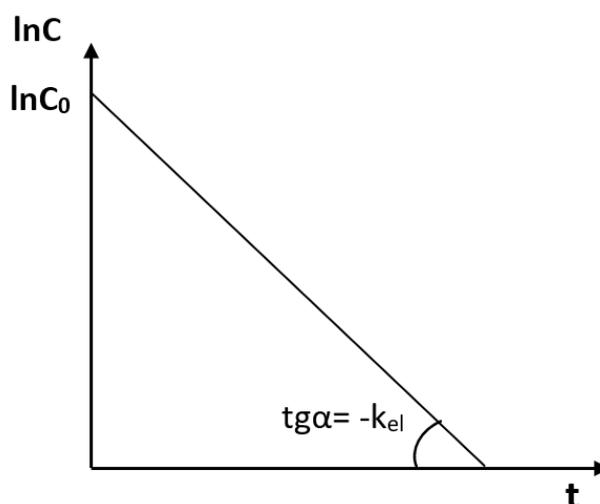


Рис. 3.2.2. Определение начальной концентрации лекарственного вещества и константы элиминации

По точке пересечения с осью ординат находим $\ln C_0$ и определяем начальную концентрацию лекарственного средства C_0 . Зная введенную дозу препарата m_0 , рассчитываем объем камеры V_d , (кажущийся объем распределения лекарственного вещества)

$$V_d = m_0 / C_0 \quad (3.2.6)$$

Если при введении в кровь объем распределения составляет менее 0,05 л/кг (или менее 5% всего объема организма), то лекарственное вещество находится только в крови. Если 0,15 л/кг, то препарат распределяется во внеклеточной жидкости. Объем распределения 0,5-0,6 л/кг свидетельствует о том, что лекарственное вещество распределяется в жидких средах всего организма (общий объем жидкости в организме составляет около 60% от массы тела, т.е. для человека массой 70 кг объем жидкости составляет 42 л). Может ли рассчитанный объем оказаться больше объема организма? (13).

Тангенс угла наклона прямой равен константе элиминации со знаком минус. Разберем ее смысл. Из выражения 3.2.4 следует:

$$k_{el} = -\frac{dC}{C dt} \quad (3.2.7)$$

То есть, константа элиминации (как и всякая константа скорости первого порядка) показывает, какая часть вещества выводится в единицу времени.

Выражения 3.2.4-3.2.5 показывают уменьшение концентрации вещества в камере при постоянном объеме распределения вещества. Можно представить модель по-другому. Можно предположить, что концентрация вещества в камере остается постоянной, но объем распределения уменьшается. Так как масса вещества

$$m = C \cdot V_d \quad (3.2.8)$$

очевидно, что одинакового уменьшения массы лекарственного вещества в камере можно достичь как за счет снижения его концентрации, так и за счет уменьшения объема камеры. Причем, во сколько раз уменьшается концентрация лекарственного средства при постоянном объеме, во столько же раз должен уменьшаться объем распределения при постоянной концентрации вещества. Поэтому, аналогично закону действующих масс (3.2.4), можно записать изменение объема распределения:

$$dV_d/dt = -k_{el}V_d \quad (3.2.9)$$

Скорость изменения кажущегося объема распределения (dV_d/dt) называют **клиренс**. Тогда клиренс равен:

$$Cl = k_{el}V_d \quad (3.2.10)$$

Определите размерность клиренса (14). Клиренс характеризует суммарную эффективность систем выведения (элиминации) лекарственного вещества из организма легкими, кожей, печенью, почками и т.д. Если у какого-то организма клиренс меньше, чем у большинства других, о чем это говорит? (15)

Рассмотрим пример определения параметров фармакокинетической модели.

Задача 1 [2]

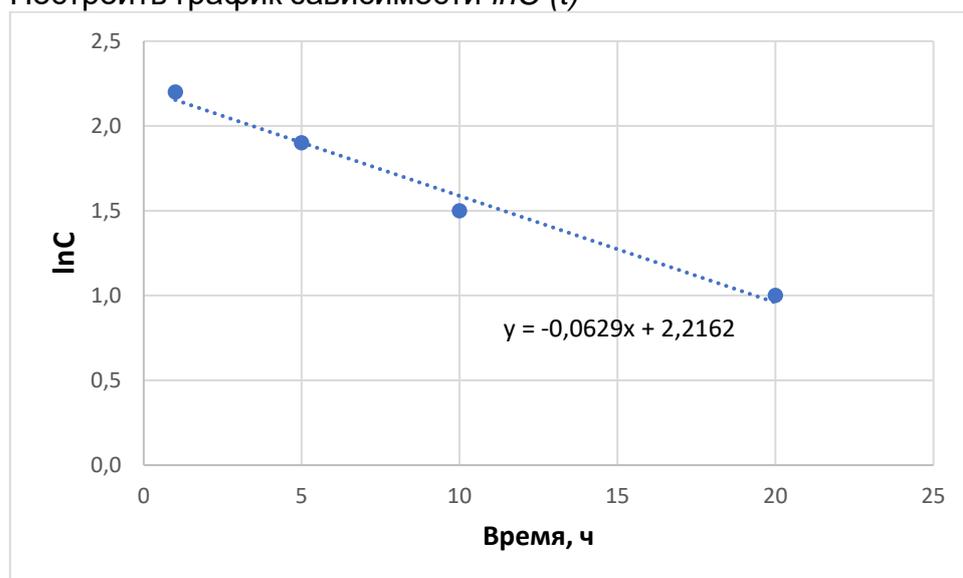
Изучали фармакокинетику диазоксида, вводимого внутривенно детям в дозе 2 мг.

Время, ч	C, мкг/мл
1	9,03
5	6,69
10	4,48
20	2,72

Определить параметры фармакокинетической модели (C_0 , V_d , k_{el} , Cl). Подумайте, где находится введенное лекарственное вещество? Плотность тела примерно равна плотности воды.

Решение.

1. Построить график зависимости $\ln C(t)$



2. По графику определить начальную концентрацию и константу элиминации
 $\ln C_0 = 2,22$
 $C_0 = e^{2,22} = 9,21$ мкг/мл
 $k_e = 0,063$ ч⁻¹
3. Определить объем распределения по формуле 3.2.4
 $V_d = m_0 / C_0 = 2000 / 9,21 = 217$ мл
4. Определить клиренс
 $Cl = k_e V_d = 0,063 \cdot 217 = 13,7$ мл/ч
5. Где находится диазоксид после введения? Пусть средняя масса детей составляет около 30 кг. Так как плотность тела примерно равна плотности воды, следовательно, средний объем тела ребенка равен
 $V_t = m/\rho = 30 \text{ кг} / 1 \text{ кг/л} = 30$ л
Делим объем распределения V_d на полный объем тела, получаем:
 $\phi = (V_d / V_t) \cdot 100\% = 0,22 / 30 \cdot 100\% = 0,7\% < 5\%$
Следовательно, введенный лекарственный препарат распределяется только в крови.

3.2.4. Период полувыведения лекарственного препарата

Время полувыведения, так же как и период полураспада, очень часто используют для характеристики скорости процесса. Что означает понятие: время полувыведения лекарственного вещества? Выведите его из уравнения 3.2.5. От чего оно зависит? (16)

Период полувыведения характеризует длительность воздействия лекарственного препарата и, следовательно, влияет на выбор частоты введения препарата (интервалов времени между введениями).

3.2.5. Другие фармакокинетические модели

Мы рассмотрели простейшую фармакокинетическую модель и научились определять ее параметры: начальную концентрацию лекарственного вещества, константу элиминации, кажущийся объем камеры, клиренс, период полувыведения, а также предполагать область распространения лекарственного препарата. Во многих случаях измеренная концентрация лекарственного вещества не соответствует процессу, описываемому с помощью простейшей однокамерной модели. В этих случаях требуются более сложные модели. Кратко охарактеризуем некоторые из них.

1. Однокамерная модель с всасыванием.

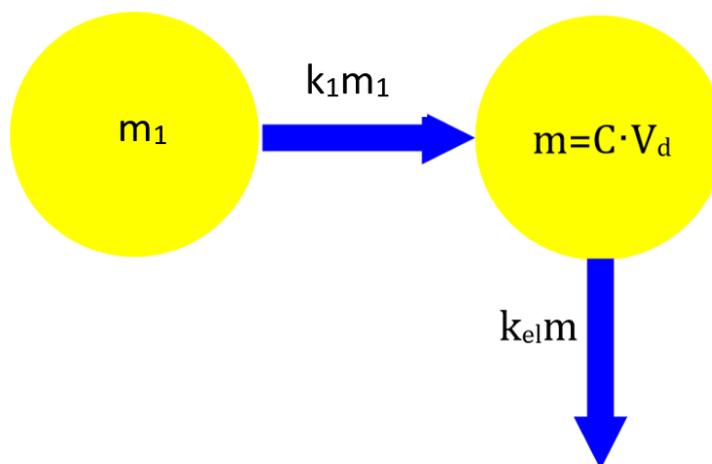


Рис. 3.2.3. Однокамерная модель с всасыванием

В начальный момент времени в самой камере объема V_d лекарственного вещества нет. Оно поступает в камеру из некоторого депо (либо вводится в камеру извне постоянной инъекцией) со скоростью $v=k_1m_1$. Параметры модели зависят уже от двух констант скоростей: всасывания и выведения. И зависимость концентрации от времени описывается:

$$C = C_0 [\exp(-k_{el}t) - \exp(-k_1t)] \quad (3.2.11)$$

$$C_0 = Mk_1 / [V_d(k_1 - k_{el})] \quad (3.2.12)$$

где M – масса введенного лекарственного вещества (доза), k_1 – константа скорости всасывания, k_{el} – константа скорости элиминации препарата. Обратите внимание, что C_0 в данном случае не является реальной начальной концентрацией вещества в камере, т.к. по условию модели в начальный момент времени концентрация вещества в камере равна нулю. C_0 характеризует кажущуюся величину начальной концентрации в камере, если процесс изменения концентрации в ней описывается выражением 3.2.11. Видно, что зависимость нелинейная и не линеаризуется в логарифмических координатах. Как всегда, при описании нелинейных функций, исследуем поведение функции при крайних значениях переменной (времени). Как правило, константа скорости всасывания намного больше константы скорости элиминации. Поэтому при малых временах наиболее существенен процесс всасывания, а элиминацией можно пренебречь (показатель экспоненты $(-k_{el}t) \gg (-k_1t)$, ближе к 0, а $e^0 = 1$).

$$C_{t \rightarrow 0} = C_0 [1 - \exp(-k_1 t)] \quad (3.2.13)$$

И наоборот, при больших временах протекания процесса лекарственный препарат всосался и процесс практически полностью определяется элиминацией (показатель экспоненты $(-k_1 t)$ ближе к $-\infty$, а $e^{-\infty} \sim 0$).

$$C_{t \rightarrow \infty} = C_0 \exp(-k_{el} t) \quad (3.2.14)$$

При малых значениях t экспоненту можно разложить в ряд Тейлора: $\exp(-k_1 t) \approx 1 - (-k_1 t)$. Тогда выражение 3.2.13 упростится:

$$C_{t \rightarrow 0} = C_0(1 - 1 + k_1 t) = C_0 k_1 t \quad (3.2.15)$$

Тогда константу скорости всасывания удобно находить по уравнению 3.2.15, построив график в координатах $(C/C_0 \text{ от } t)$ при небольших значениях t (рис. 3.2.4). Видно, что константа скорости всасывания равна тангенсу угла наклона начального участка кривой. Однако, в данной модели мы не знаем кажущуюся начальную концентрацию C_0 , поэтому ее надо будет сначала найти из графика для больших значений t .

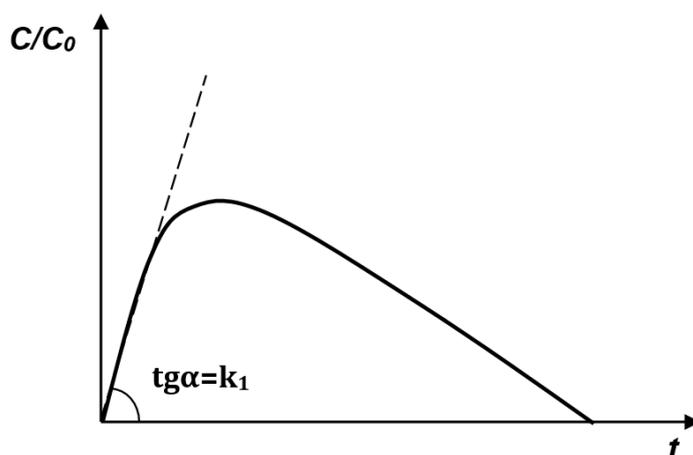


Рис. 3.2.4. Определение константы скорости всасывания для однокамерной модели с всасыванием

Константу элиминации и C_0 находим по уравнению 3.2.14, но сначала приведем его к линейному виду. Прологарифмируем его:

$$\ln C = \ln C_0 - k_{el} t \quad (3.2.16)$$

Строим график в координатах $\ln C(t)$ (рис. 3.2.5). Из выражения 3.2.16 следует, что константа скорости элиминации равна тангенсу угла наклона, взятому с обратным знаком, для больших значений времени. $\ln C_0$ находим по точке пересечения прямой с осью ординат.

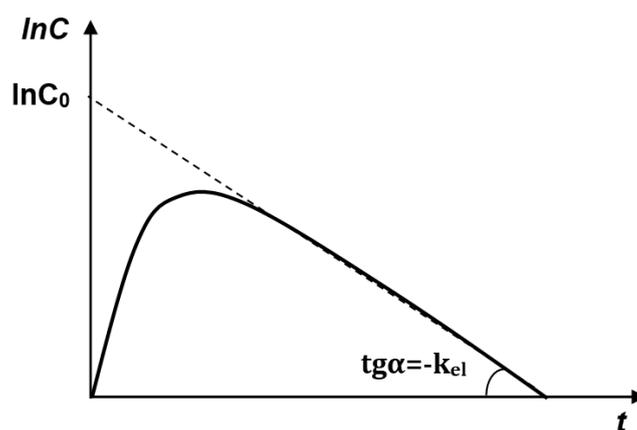


Рис. 3.2.5. Определение кажущейся начальной концентрации и константы скорости элиминации для однокамерной модели с всасыванием

Находим значение кажущейся начальной концентрации C_0 , рассчитываем значения C/C_0 для каждого момента времени и строим график в координатах $C/C_0(t)$ при небольших значениях t (рис. 3.2.4). Для правильного определения показателей экспонент на каждую из них должно приходиться не менее 4 точек.

Задача 2 [2]

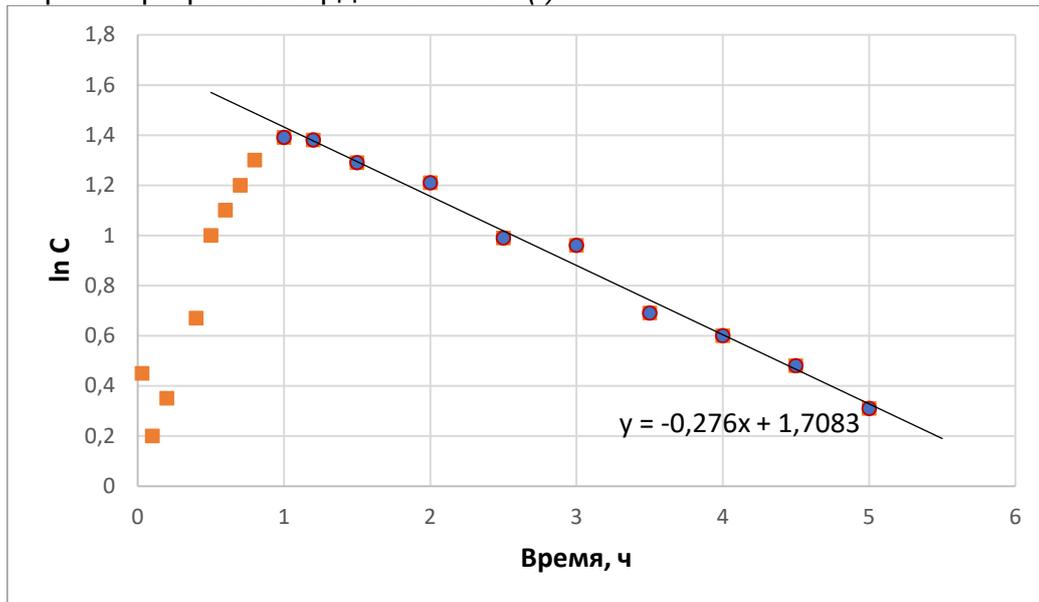
В таблице приведены данные по фармакокинетики цефалексина в крови мышей, получивших этот препарат перорально в дозе 40 мкг/кг. Определите параметры фармакокинетической модели и область распределения препарата (константы скорости всасывания и элиминации, кажущуюся начальную концентрацию в камере, объем распределения)

Время, ч	ln C, мкг/мл	C, мкг/мл
0,03	0,45	1,57
0,1	0,2	1,22
0,2	0,35	1,42
0,4	0,67	1,96
0,5	1	2,72
0,6	1,1	3,01
0,7	1,2	3,32
0,8	1,3	3,67
1	1,39	4,02
1,2	1,38	3,98
1,5	1,29	3,64
2	1,21	3,36

2,5	0,99	2,69
3	0,96	2,61
3,5	0,69	1,99
4	0,6	1,82
4,5	0,48	1,62
5	0,31	1,36

Решение.

1. Строим график в координатах $\ln C(t)$.



2. По тангенсу угла наклона прямой при больших значениях времени находим константу элиминации.

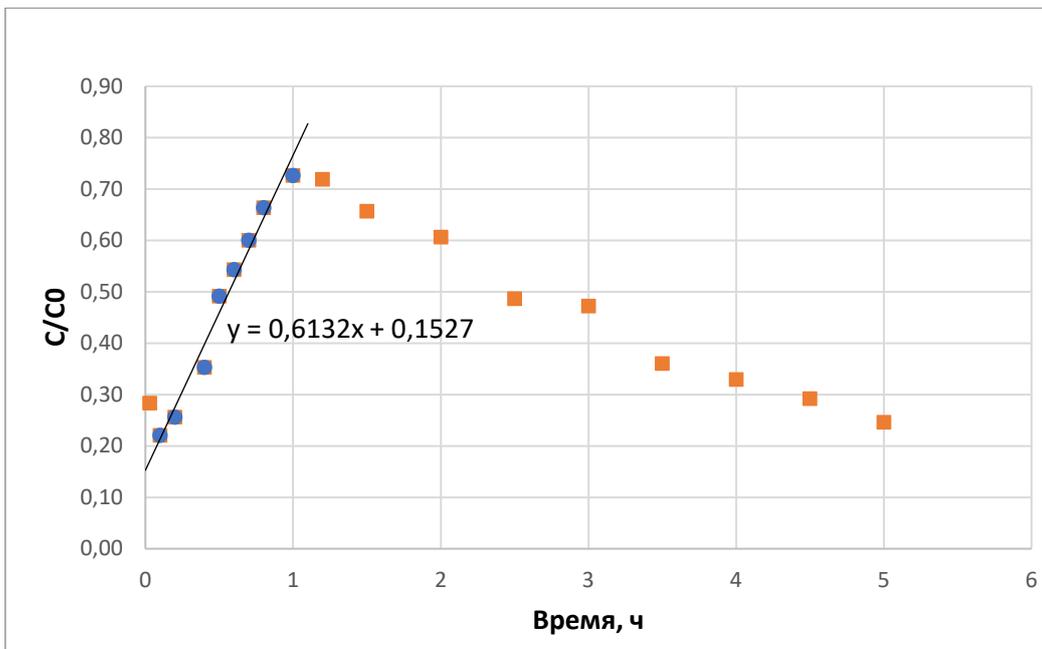
$$k_{el} = 0,276$$

3. По точке пересечения касательной с осью ординат находим $\ln C_0$ и рассчитываем значение кажущейся начальной концентрации C_0 .

$$\ln C_0 = 1,71$$

$$C_0 = e^{1,71} = 5,53$$

4. Строим график в координатах $C/C_0(t)$. По тангенсу угла наклона начального участка кривой находим константу скорости всасывания



$$k_1=0,613$$

5. Средний вес мыши 20 г, тогда масса введенного лекарственного вещества $M = 40 \cdot 0,02 = 0,8$ мкг. По формуле 3.2.12 рассчитываем объем распределения:

$$V_d = Mk_1 / [C_0 (k_1 - k_{el})]$$

$$V_d = 0,8 \cdot 0,613 / 5,53 \cdot (0,613 - 0,276)$$

$$V_d = 0,26 \text{ мл}$$

6. Аналогично задаче 1, сделайте вывод об области распределения препарата

2. Двухкамерные фармакокинетические модели

Иногда зависимость концентрации вещества в плазме крови от времени описывается кривой с резким изгибом.

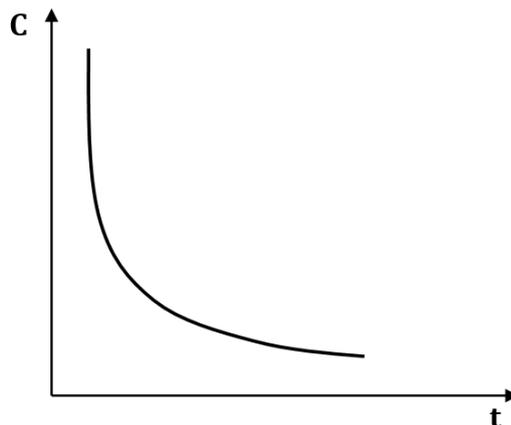


Рис. 3.2.6. Кинетика лекарственного вещества в двухкамерной модели.

Для описания такой зависимости используют двухкамерную фармакокинетическую модель. В этой модели организм представляют в виде двух сообщающихся между собой камер. Центральная камера (камера 1) – модель плазмы крови и (или) хорошо перфузируемых органов (сердце, печень, почки,

легкие, мозг, эндокринные железы). Периферическая камера (камера 2) соответствует плохо перфузируемым тканям (кожа, жировая, мышечная ткань). Либо, возможны такие пары: кровь – печень, плазма крови – белки плазмы и т.д.

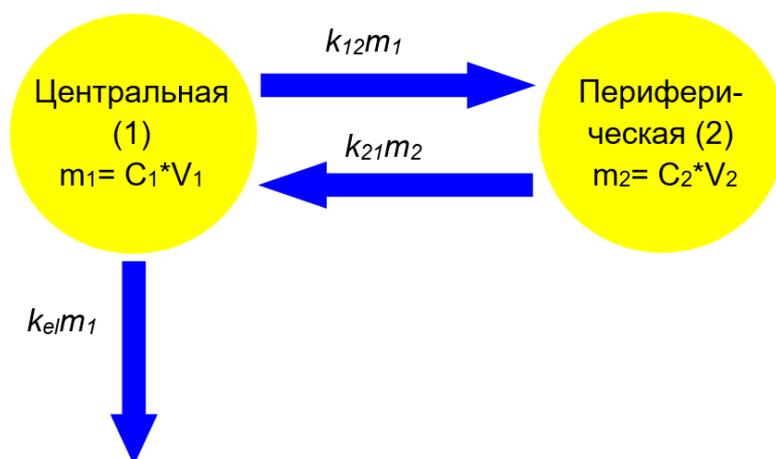


Рис. 3.2.7. Двухкамерная фармакокинетическая модель

Лекарственный препарат вводят в центральную камеру объема V_1 , где он сразу же распределяется с одинаковой концентрацией C_1 и начинает проникать в периферическую камеру с константой скорости k_{12} , а также выводиться из камеры 1 с константой скорости элиминации k_{el} . Обе скорости пропорциональны массе вещества в первой камере.

Как только первые порции лекарственного вещества проникли в периферическую камеру, оно сразу же начинает выводиться из нее обратно в центральную камеру с константой скорости k_{21} . То есть количество лекарственного препарата во второй камере определяется по разности скоростей поступления и выведения его из этой камеры. Элиминироваться из периферической камеры оно не может.

Скорость элиминации из центральной камеры меньше, чем скорость массопереноса между камерами. При этом лекарственный препарат может оказывать лечебное воздействие в обеих камерах. Либо, если лечебный эффект оказывается в центральной камере, периферическая может служить «депо» - жировая ткань, печень, альбумин крови и т.д. Еще один вариант: лекарственное вещество вводится в кровь (центральная камера), а действует в межтканевой жидкости (периферическая камера).

Фармакокинетика многих лекарственных препаратов описывается еще более сложными многокамерными, перфузионными моделями, учитывающими метаболизм препарата в различных органах. Однако создание таких моделей возможно только на животных, т.к. у человека невозможно постоянно измерять концентрации лекарственного вещества во всех органах.

3.2.6. Фармакокинетическая оптимизация терапии

Основная задача оптимизации лечения – подобрать индивидуальную оптимальную концентрацию лекарственного препарата в нужном месте в течение нужного времени. Фармакокинетическая оптимизация лечения – довольно сложная

и дорогая процедура. Для определения концентрации многих лекарственных средств используются сложные методики, требуется дорогостоящая техника (хроматограф, наборы для иммуноферментного анализа, фотометр и т. д.) и квалифицированный персонал. В каких ситуациях необходимо проводить фармакокинетические исследования по оптимизации фармакотерапии? Средние дозы не подходят для многих групп пациентов, таких как дети, беременные, пожилые, пациенты с заболеваниями ЖКТ, почечной недостаточностью, печеночной недостаточностью, ожирением, тяжелобольные и т.д. Показано, например, что измеренные концентрации фенитоина, введенного в одинаковой дозе на кг веса пациента, различались в 20 раз. Для других лекарственных препаратов отмечали 50-кратные различия в индивидуальных концентрациях при одинаковой дозе на кг веса пациента. Особую важность фармакокинетические исследования имеют для лекарственных препаратов с очень узким терапевтическим диапазоном (сердечные гликозиды дигоксин, дигитоксин, антибиотики аминогликозиды и др.).

Цели фармакокинетической оптимизации:

1. Повысить эффективности терапии.
2. Уменьшить или исключить побочные эффекты.
3. Уменьшить количество вводимого препарата.

Исследуемые (оптимизируемые) параметры:

1. Концентрация лекарственного вещества, поддерживаемая в месте назначения в ходе лечения
2. Максимальная концентрация, достигаемая в камере после введения. Она должна быть меньше индивидуальной токсической концентрации.
3. Время от момента введения препарата до достижения максимальной концентрации в месте назначения.
4. Минимальная терапевтическая (эффективная) концентрация лекарственного средства.
5. Время, в течение которого концентрация лекарственного вещества в камере не опускается ниже эффективной величины.
6. Общее количество лекарственного вещества, достигшее места назначения.

Исходя из целей оптимизации терапии видно, что основная задача – подобрать такую дозу лекарственного препарата и режим дозирования, чтобы его концентрация в ткани-мишени обеспечивала эффективную терапию и при этом побочные эффекты были минимальны. Как практически проводят оптимизацию лечения? Измеряют концентрацию лекарственного вещества в крови, моче, спинномозговой жидкости и т.д. в определенные моменты времени после приема препарата. Понятно, что в данном случае необходимо получить максимум информации при минимальном количестве измерений. При этом предполагается, что концентрация лекарственного препарата в целевом органе пропорциональна его концентрации в исследуемой жидкости. Фармакокинетические исследования показали, что наибольший индивидуальный разброс параметров наблюдается для объема распределения лекарственного препарата, времени его поступления в орган-мишень и времени выведения. В гораздо меньшей степени варьируют индивидуальные показатели минимальной терапевтической и минимальной токсической доз. Поэтому при оптимизации лечения обычно используют стандартные дозы лекарственных веществ и варьируют другие параметры.

Рассмотрим некоторые практические вопросы фармакокинетической оптимизации лечения.

Подбор первой дозы лекарственного вещества. Известно, что концентрация лекарственного препарата в целевом органе (ткани) зависит от введенной дозы препарата и изменяется во времени. На рисунке 3.2.8 показаны эти зависимости для однокамерной модели с всасыванием.

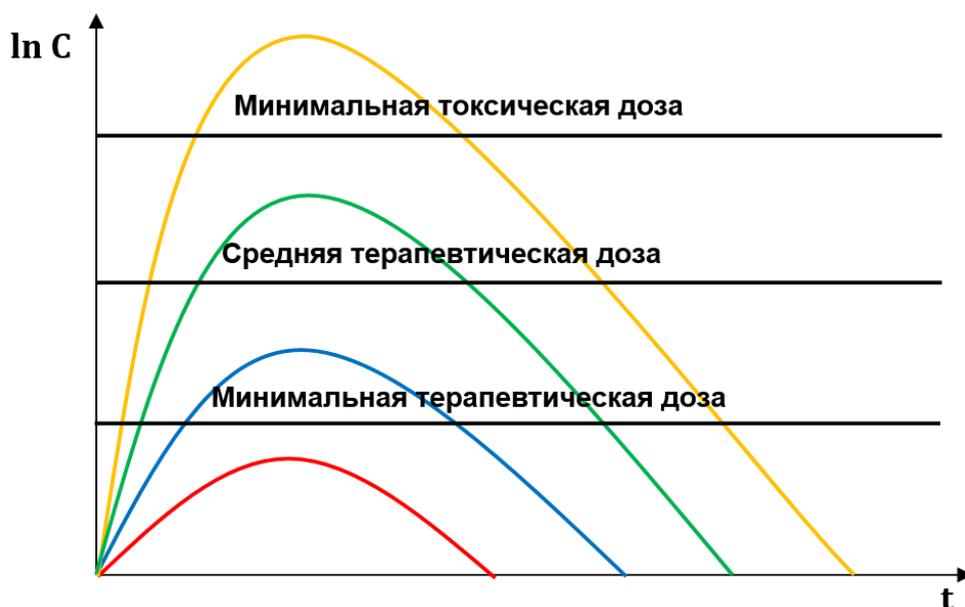


Рис. 3.2.8. Зависимость концентрации лекарственного вещества в камере от времени и от введенной дозы

По рисунку 3.2.8 выберите оптимальную дозу препарата и поясните выбор (17). Из выражений 3.2.5, 3.2.11, 3.2.12 следует, что в однокамерных моделях концентрация лекарственного вещества в камере линейно зависит от введенной дозы. Следовательно, первую дозу подбирают исходя из требуемой концентрации вещества в камере. Во сколько раз мы хотим изменить концентрацию вещества в камере, во столько же раз надо изменить дозу лекарственного препарата.

Далее препарат вводится в той же дозе. Но необходимо подобрать интервалы времени между введением препарата. В идеале, концентрация препарата в камере должна быть постоянной. Поэтому, чем меньшими дозами и чаще вводить препарат, тем лучше. Это позволяет уменьшить вероятность возникновения осложнений и приводит к более эффективному лечению. Однако это не всегда удобно, болезненно и т.д. Поэтому последующие введения назначаются так, чтобы концентрация препарата в камере при введении каждой дозы не превышала минимальную токсическую дозу и никогда не опускалась ниже минимальной терапевтической дозы. Время введения каждой последующей дозы подбирается с учетом многих факторов, в том числе оно зависит от широты терапевтического диапазона (рис. 3.2.9.) и скорости метаболизма или выведения препарата из камеры (рис. 3.2.10)

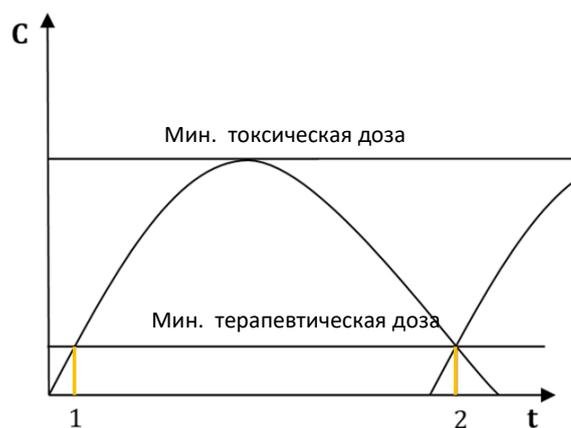
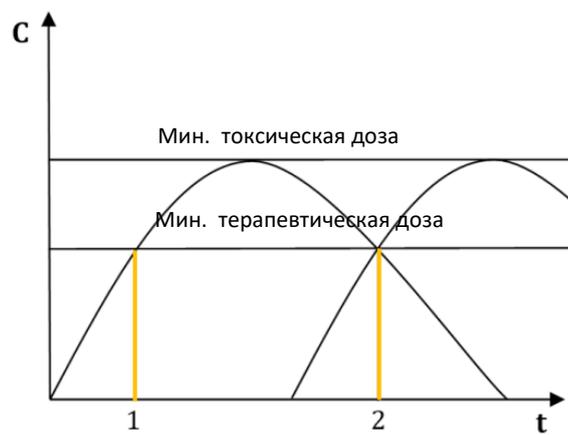
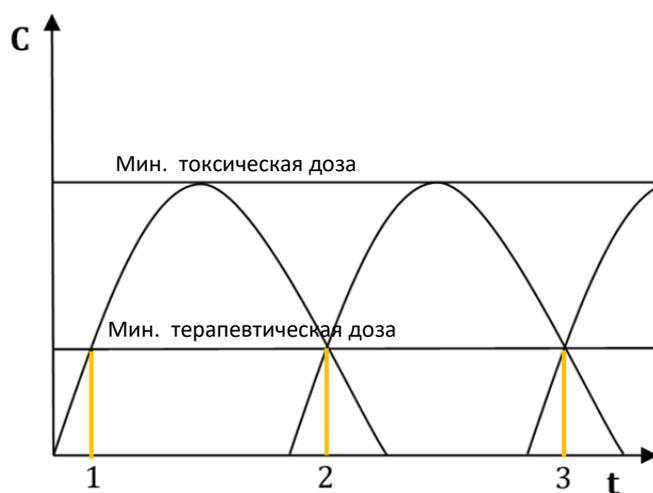


Рис.3.2.9. Влияние широты терапевтического диапазона на частоту введения препарата (скорость выведения одинакова)

По рисунку 3.2.9 видно, что чем уже терапевтический диапазон, тем чаще требуется вводить лекарственный препарат.



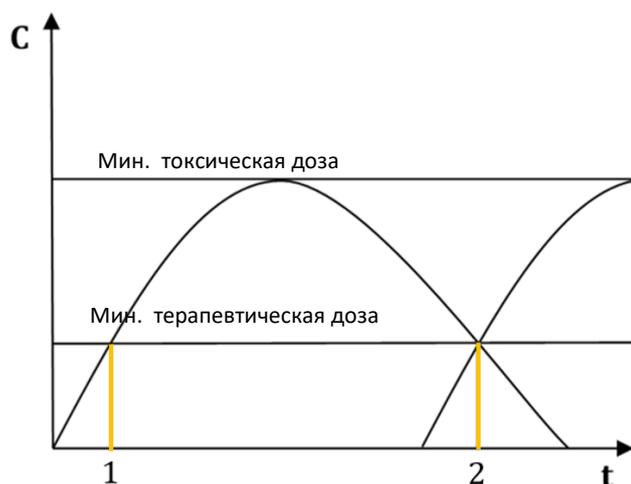


Рис. 3.2.10. Влияние скорости выведения препарата на частоту введения

Чем медленнее метаболизируется и выводится препарат, тем больше интервал времени между введениями препарата.

Покажите на рисунке как будет выглядеть зависимость концентрации лекарственного препарата в плазме крови от времени, если он вводится в одинаковой дозе через одинаковые промежутки времени, меньшие, чем требуется время для элиминации данной дозы препарата. (18)

Самым сложным вопросом в оптимизации лечения является определение концентрации лекарственного вещества в эффекторной ткани. В подавляющем большинстве случаев она неизвестна. Также практически невозможно определить индивидуальную чувствительность ткани к данному препарату, скорость метаболизма и выведения лекарственного средства. Несмотря на все эти ограничения, применение фармакокинетики в оптимизации лечения показывает значимые результаты. Например, при лечении больных астмой было показано, что у пациентов, которым режим дозирования теофиллина рассчитывали индивидуально на основе фармакокинетических моделей, частота побочных эффектов была снижена в 3 раза, и существенно ускорилось выздоровление. Подобный эффект наблюдался и при лечении сердечными гликозидами. Эффективность фармакокинетической оптимизации лечения была показана для антибактериальной терапии, химиотерапии и для многих других групп препаратов.

Методы фармакокинетического моделирования развиваются, как и во многих других областях науки, во многом благодаря внедрению новых физико-химических, иммунохимических и других методов анализа веществ и программно-аппаратного обеспечения. Сейчас перед учеными стоит задача разработки многокамерных моделей для комбинированной фармакокинетики лекарственных препаратов, взаимовлияющих друг на друга. Особенно важны такие модели для трансплантологии, в терапии СПИДа, химиотерапии, комплексной антибиотикотерапии и др. Применение фармакокинетических моделей сделает сложную терапию комплексом лекарственных препаратов более эффективной и безопасной.

Вопросы для подготовки к семинару:

1. Какие физиологические жидкости вы знаете?
2. Что назначают в *разовых* дозах?
3. Дайте определения терминам: ED1, ED50, ED99, TD1, TD50, TD99, LD1, LD50, LD99
4. Что такое хороший лекарственный препарат? Сформулируйте требования в виде уравнений или неравенств
5. В каком случае терапевтические дозы препарата не вызывают токсических эффектов?
6. В каком случае терапевтические дозы препарата вызывают токсические осложнения?
7. Можно ли на животных выявить все возможные терапевтические и побочные эффекты? Почему?
8. Сравните термины доз в клинических испытаниях и испытаниях на животных. Равны ли они?
9. Хорошо, когда терапевтический диапазон большой или маленький?
10. Сделайте вывод о том, в каких дозах используют препараты для перорального введения и в каких случаях они не подходят?
11. Назовите минусы препаратов для внутривенного введения.
12. Как определить константу элиминации и начальную концентрацию лекарственного вещества?
13. Может ли рассчитанный объем распределения препарата оказаться больше объема организма?
14. Определите размерность клиренса.
15. Если у какого-то организма клиренс меньше, чем у большинства других, о чем это говорит?
16. Что означает понятие: время полувыведения лекарственного вещества? Выведите его из уравнения 3.2.3. От чего оно зависит?
17. По рисунку 3.2.8 выберите рекомендуемую дозу препарата и поясните выбор
18. Покажите на рисунке как будет выглядеть зависимость концентрации лекарственного препарата в плазме крови от времени, если он вводится в одинаковой дозе через одинаковые промежутки времени, меньшие, чем требуется время для элиминации данной дозы препарата.

Заключение

Мы рассмотрели основы кинетики и термодинамики биоспецифических взаимодействий. Надеюсь, что материалы данного учебного пособия помогут вам при описании простых и сложных процессов, протекающих в живых организмах. Понимая кинетику и термодинамику взаимодействий макромолекул, вы сможете грамотно планировать эксперименты, обрабатывать результаты и описывать биоспецифические взаимодействия в энзимологии, иммунологии и фармакологии математическим языком. Для более глубокого изучения данной тематики вы можете изучить литературу из списка, представленного в данном пособии.

Список использованной литературы

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во Московского ун-та, 1976. – 320 с.
2. Варфоломеев С.Д., Гуревич К. Г. Биокинетика. Практический курс. М ФАИР-ПРЕСС, 1999 —720с ил. ISBN 5-8183-0050-1
3. Габриелян О.С. Учебник: Химия. 11 класс. Учебник. Базовый уровень. Вертикаль. ФГОС, ISBN: 978-5-358-16907-4
4. Кожевникова О.В. Курс лекций по кинетике и термодинамике ферментативных реакций: <https://distedu.udsu.ru/course/view.php?id=242>
5. Кожевникова О.В. Курс лекций по биоспецифическим взаимодействиям: <https://distedu.udsu.ru/course/view.php?id=1730>
6. Кожевникова О.В. Курс лекций по энзимологии: <https://distedu.udsu.ru/course/view.php?id=243>
7. Молекулярная биология клетки в 3-х томах. Т. 1/ Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. – М. –Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. – 808 с.

Предметный указатель

- Активатор 61
- Активный центр фермента 44
- Аффинность антител 89
- Биодоступность 108
- Биотрансформация 108
- Быстро устанавливающееся равновесие 51
- Второй закон термодинамики 41
- Высокоаффинные антитела 90
- Гетерогенная реакция 35
- Гомогенная реакция 35
- Графическое определение константы Михаэлиса 51
- равновесия 49
- скорости 25
- Доза лекарственного препарата 111
 - Летальная 107
 - Токсическая 107
 - Эффективная 107
- Закон Фика 108
- Ингибирование
 - Бесконкурентное 66
 - Конкурентное 60
 - Неконкурентное 65
 - Необратимое 59
- Обратимое 59
- Ингибитор 37
- Изотерма Ленгмюра 92
- Камера 119
- Каскадная реакция 21

катализатор 37

катализ 37

- полифункциональный 44
- причины, механизмы 44
- эффекты микросреды 44

Кинетика всасывания лекарственного вещества 106

Клиренс 113

Константа ассоциации 89

аффинности 89

диссоциации 51, 53

ингибирования 61

Михаэлиса 51

Равновесия 25

Скорости 24

Элиминации 111, 112

Координаты Лайнуивера-Берка 56

- Скэтчарда 94
- Хилла 96

Максимальная скорость ферментативной реакции 63

- Графическое определение 128

Мгновенная скорость реакции 22

Механизм реакции 19

Начальная скорость реакции 24

Обратимая реакция 21

Объем распределения лекарственного вещества 112

Параллельные реакции 21

Полифункциональный катализ 44

Порядок реакции 24

Предстабионарная стадия ферментативной реакции 53

Принцип стационарности 54
Причины ускорения ферментативных реакций 43–44
Продукт реакции 22
Промежуточные вещества 22
Равновесие 46
Скорость реакции 21
Специфичность антител 89
Средняя скорость реакции 22
Стационарная стадия ферментативной реакции 53
Субстрат реакции 22
Схема Михаэлиса-Ментен 51
Теория переходного состояния 82
Теория столкновений 82
Терапевтический диапазон 108
Уравнение Аррениуса 82
 Вант-Гоффа 79
 Михаэлиса-Ментен 52
 Скэтчарда 94
Фармакокинетика 106
Фармакокинетическая модель 110
 Двухкамерная 120
 Однокамерная 111
 Однокамерная с всасыванием 115
Фермент-субстратный комплекс 51
Циклическая реакция 21
Энергия активации 32
Энергия Гиббса 45
-Энергия Гиббса активации 83
-Стандартная энергия Гиббса 46

Энергия связывания антител 89

Энтропия 42

-Энтропия активации 42

Энтальпия 36

-Энтальпия активации 80

Эффекты микросреды активного центра 44

pK – определение pK ионогенных групп активного центра фермента 77

Учебное издание

О.В. Кожевникова, Е.В. Шиляева

**Кинетика и термодинамика
биоспецифических взаимодействий**

Учебно-методическое пособие

Авторская редакция

Издательский центр «Удмуртский университет»
426034, г. Ижевск, ул. Ломоносова, 4Б, каб. 021
Тел.+ 7 (3412) 916-364, E-mail: editorial@udsu.ru