

С.О.КОСТЕРІН, С.О.КАРАХІМ

БІОХІМІЧНА КІНЕТИКА

За редакцією академіка
НАН України та НАМН України
С.В.КОМІСАРЕНКА

ПРОЕКТ
«НАУКОВА КНИГА»

КИЇВ
НАУКОВА ДУМКА
2020

УДК

У міждисциплінарній монографії наведені результати, що були одержані її авторами в галузі розбудови теоретичних основ вибраних проблем ензиматичної кінетики. Вона не є канонічним учбовим посібником чи підручником з класичної кінетики ензиматичних реакцій, навпаки, її читання вимагає попередньої підготовки читачів у галузі формальної (емпіричної, феноменологічної) хімічної кінетики та кінетики біохімічних процесів. В ній описані методи кінетичного аналізу в ензимології, обговорюється низка теоретичних аспектів, які стосуються спеціальних проблем кінетики біохімічних реакцій. Проаналізовані питання щодо так званих істинних та уявних констант Міхаеліса в ензимології. Розглянуто принципову, в практичному аспекті (для експериментальної ензимології), проблему (у форматі «Проба – Контроль») щодо врахування парціального внеску «паралельного» хімічного (неензиматичного) перетворення субстрату в загальну динаміку ензиматичної реакції. Надано універсальне тлумачення важливого класичного параметра ензимологічного процесу – коефіцієнта інгібування I_{50} , який широко використовується в інгібіторному аналізі ензиматичних реакцій, а також описані способи оцінки впливу оборотних інгібіторів на початкову швидкість ензиматичної реакції. Обговорюється питання ідентифікації механізму ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим/переносник – субстрат – ефектор») із використанням співвідношення початкових швидкостей утворення двох продуктів реакції (так званий метод “*ratio*”). Акцентується увага на викладанні технології моделювання кінетики ензиматичних реакцій, що відбуваються за участі активаторів (на прикладі реакції гідролізу нуклеозидтрифосфату АТР «базальною» Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани). Певну увагу приділено опису методів кінетичного аналізу суперскладних кінетичних кривих – на прикладі внутрішньоклітинних кальцієвих транзєнтів та механокінетичних графіків.

Монографію адресовано спеціалістам з біохімії, зокрема ензимології, фізики та фізичної хімії ензиматичного каталізу, теоретичної біофізики та біофізичної хімії, які мають досвід роботи у галузі хімічної та біохімічної кінетики. Вона може бути корисною як для досвідчених науковців, так і для молодих вчених, аспірантів – біохіміків, біофізиків, які проводять теоретичні та експериментальні дослідження з метою з'ясування механізму дії ензимів, вивчення ліганд-рецепторної взаємодії, мембранного транспорту тощо, залучуючи підходи математичного моделювання.

Рецензенти:

академік НАН України професор *Л.А.Булавін*,
завідувач кафедри молекулярної фізики фізичного факультету
Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

член-кореспондент НАН України професор *А.І.Вовк*,
директор Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України;

член-кореспондент НАН України професор *О.Г.Мінченко*,
завідувач відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

*Рекомендовано до друку вченою радою
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
(протокол N 6 від 13 травня 2019 р.)*

ПЕРЕДМОВА

На теперішній час все більше значення у міждисциплінарних біологічних дослідженнях (зокрема, у галузі біохімії, біофізики, молекулярної та системної біології, фізіології та теоретичної медицини) набуває використання математичних методів. Сьогодні, безперечно, можна вести розмову за так звану математичну біологію (біоматематику, математичне біомодельовання), яка широко використовує теорію диференціальних рівнянь, теорію коливних процесів, інформатику, прикладну математику і математичну статистику, а також обчислювальну техніку та комп'ютерні технології для вирішення фундаментальних біологічних проблем, і намагається моделювати природні фізико-хімічні та біологічні процеси (зокрема, ензиматичні реакції) на кількісному рівні. В цілому ж математичну біологію ми повинні сприймати як комплексну міждисциплінарну галузь наукових досліджень, її цілком можна тлумачити як підрозділ обчислювальної біології. Абсолютно очевидним є факт, що методи математичної біології вже добре зарекомендували себе у таких галузях біологічної науки, як біохімічна кінетика (тобто хімічна кінетика ензиматичних та транспортних процесів), а також фармако- та онкокінетика, молекулярна рецепторика, імунологія, біологічна термодинаміка, популяційна та порівняльна генетика, мікробіологія, клітинна нейробиологія, екологія, епідеміологія, біотехнологія, біомедична візуалізація та аналіз зображень тощо.

Клітини, цілісні організми є, по суті, «антиентропійними системами», які функціонують у стані, далекому від стану термодинамічної рівноваги з оточуючим середовищем. Іншими словами, одним з типових проявів ЖИТТЯ на Землі є унікальна здатність живих організмів як відкритих систем кінетично регулювати, з використанням ензимів, протікання метаболічних процесів, завдяки чому жива клітина може функціонувати, не досягаючи стану термодинамічної рівноваги (адже шлях до встановлення такої рівноваги – це «шлях до смерті», який характеризується зростанням внутрішньосистемної ентропії у часі!). І, як відомо, головною метою біохімічної кінетики є кількісна інтерпретація закономірностей протікання

ензиматичних реакцій та одержання інформації щодо молекулярних механізмів дії ензимів. Відповідно, біохімічну кінетику, яка вже давно традиційно використовується дослідниками при вирішенні теоретичних та практичних проблем ензимології, технічної біохімії та мікробіології, ми також цілком можемо розглядати як розділ математичної біології.

Проте треба відверто сказати, що серед біохіміків ставлення до використання хімічної кінетики в науковому пошуку є вельми неоднозначним. Є дослідники, які, внаслідок недостатнього знання математики та фізичної хімії, відверто ігнорують кінетичний підхід в біохімії («...я не можу цього зрозуміти, тому мені це зовсім непотрібно!...»), хоча вже на початковому етапі експериментальних біохімічних досліджень кінетикою цілком можна займатися, навіть маючи елементарну математичну підготовку. Навпаки, деякі фахівці, які застосовують кінетичний підхід до досліджень як з метою кількісної інтерпретації біохімічних реакцій, так і маючи на увазі з'ясування механізмів та створення математичних моделей їхнього протікання, невиправдано ідеалізують та абсолютизують його.

Але, як завжди, істина є такою, якою вона є! Адже цілком справедливо відзначити, що кінетичний підхід, звичайно за умов його коректного використання, за своєю універсальністю дійсно майже не має обмежень для застосування в біохімії. Наразі, у будь-якому випадку, методи хімічної та біохімічної кінетики, у поєднанні з сучасними експериментальними хіміко-аналітичними, препаративними і фізико-хімічними методами та комп'ютерними технологіями, активно залучаються науковцями не лише в біохімії, але й у біофізиці, біофізичній хімії, молекулярній та системній біології, молекулярній фізіології, імунології, радіобіології, мікробіології, фармакології, нанобіотехнології, до вивчення, наприклад, механізму ензиматичного каталізу, ліганд-рецепторної взаємодії, взаємодії «антиген-антитіло», внутрішньоклітинних сигнальних мереж, мембранного транспорту речовин, при дослідженні проблем біосенсорики тощо.

В Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України систематичний науковий пошук із застосуванням методів біохімічної кінетики розпочався з 1973 р. з

приходом до Інституту Сергія Олексійовича Костеріна – наразі академіка НАН України, професора.

У відділах біохімічної кінетики та біохімії м'язів Інституту ним та його колегами були проведені дослідження у галузі вивчення кінетики та енергетики енергонезалежних та енергозалежних (перш за все, Mg^{2+} , АТР-залежних) Ca^{2+} -транспортувальних систем, переважно на прикладі тканин скелетних та гладеньких м'язів (див., зокрема, монографії: Курский М.Д., Костерин С.А., Воробець З.Д. *Регуляція внутриклеточной концентрації кальція в м'язах.*– Киев. Наукова думка, 1987.– 144 с.; Костерин С.А. *Транспорт кальція в гладких м'язах.*– Київ. Наукова думка, 1990.– 216 с.; Kosterin S.A. et al. *Mechanisms of Ca^{2+} transport in myometrium. Chapter 6. In: Control of Uterine Contractility.*– CRC Press, Boca Raton, USA, 1994.– P. 129–154; Костерін С.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г., Данилович Ю.В., Векліч Т.О., Мазур Ю.Ю. *Біохімічні властивості та регуляція Ca^{2+} -транспортувальних систем гладеньком'язових клітин.*– Наукова думка, 2016.– 210 с.). У той же час у зазначених відділах були розроблені нові методи кінетичного аналізу різноманітних біохімічних та біофізичних явищ (ензиматичний каталіз, мембранний транспорт речовин, ліганд-рецепторна взаємодія, внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація, скорочення-розслаблення м'язів тощо). Так, були запропоновані підходи до:

- визначення констант спорідненості у випадку зв'язування лігандів з неоднорідною адсорбційною поверхнею протеїнів та біомембран;
- розрахунку початкової швидкості, характеристичного часу та максимального накопичення продукту ензиматичної реакції;
- тлумачення та визначення коефіцієнту субстратного протектування в ензиматичному каталізі;
- узагальнення поняття коефіцієнту інгібування I_{50} в кінетиці ензиматичних реакцій;
- аналізу термодинамічних закономірностей, властивих для системи «ензим – субстрат – оборотний ефектор»;

– розробки універсального методу «ratio» для з'ясування механізму дії оборотного інгібітора в системі «ензим/транспортний протеїн – субстрат/речовина, що транспортується – оборотний інгібітор»;

– створення методу кількісного аналізу внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів та кривих «скорочення – розслаблення» м'язів;

– розбудови кінетичної моделі внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в гладеньких м'язах;

– розвитку термодинамічної теорії формування рівноважного потенціалу Гіббса-Доннана в системі «мембранні везикули – середовище розведення».

Також, С.О.Костерінім, у співпраці з акад. НАНУ В.О. Беліцером та д.б.н. Т.В. Варецькою, було розбудовано кінетичну модель механізму гальмування полімеризації фібрину фібриногеном та його активними фрагментами.

Наразі відділ біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, разом із колегами з Інституту органічної хімії НАН України (академік НАН України В.І. Кальченко), активно займається дослідженням кінетичних закономірностей та біофізикохімічних механізмів впливу макроциклічних сполук – каліксаренів на трансмембранний обмін Ca^{2+} та внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз в гладеньких м'язах (див., наприклад, монографії: *Komisarenko S.V., Kosterin S.O., Lugovskoy E.V., Kalchenko V.I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes. In: Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine. Edited by Prof. Serhiy Komisarenko. – K.: Publishing House Moskalenko O.M., 2013. – P. 293–327; Комисаренко С.В., Кальченко В.И., Костерин С.А., Луговской Э.В., Лабынцева Р.Д., Черенок С.А., Бевза А.В. Каликс[4]аренметилен-бисфосфоновые кислоты – перспективные наноэфффекторы биохимических процессов – В кн.: Нанотехнология. – Киев: Наукова думка, 2014. – С. 455-473; Кальченко В.И., Костерин С.А., Веклич Т.А., Родик Р.В., Шкрабак А.А., Мазур Ю.Ю., Слинченко Н.Н. Синтез новых перспективных утеростимуляторов на основе каліксаренсульфоніламидинов и их биохимическая активность. В кн.: Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва. – Київ: Академперіодика, 2016. – С. 224-235; Костерін С.О., Кальченко*

В.І., Векліч Т.О., Бабіч Л.Г., Шликов С.Г. Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. – Київ: Наукова думка (у друці)).

Необхідно підкреслити, що у відділах біохімічної кінетики та біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України методи кінетичного аналізу завжди традиційно активно залучалися при підготовці кандидатських (В. Фомін, Н. Браткова, О. Шинлова, Н. Ровенець, Л. Борисова, Т. Векліч, І. Черниш мол., Г. Данилович, О. Вадзюк, О. Пономаренко, О. Шелюк, О. Шкрабак, Н. Кочешкова, А. Бевза, Н. Наумова, О. Коломієць, Ю. Мазур) та докторських (С. Шликов, Л. Бабіч, Ю. Данилович) дисертацій; готуються до захисту докторських дисертацій О. Цимбалюк, Т. Векліч та Г. Данилович, які широко залучували методи хімічної та біохімічної кінетики при виконанні своїх досліджень.

Я також не можу тут не відзначити й те, що вперше в Україні С.О. Костеріним та колегами було написано фундаментальний учбовий посібник з кінетики біохімічних реакцій для університетів (*Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.К. Биохимическая кинетика. – К.: Вища школа, 1977. – 264 с.*), який і наразі активно використовується студентами – біохіміками та біофізиками. Сергієм Олексійовичем вже тривалий час читається відповідний систематичний курс лекцій на кафедрах біофізики та біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка (з 1977 р.), а також на кафедрі біології Національного університету «Києво-Могилянська академія» (з 1996 р.), професором яких він є.

Втім, наразі перед мною рукопис своєї монографії, що присвячена вибраним теоретичним питанням формальної біохімічної кінетики, опису методів кінетичного аналізу в ензимології, над вирішенням яких тривалий час працювали академік НАН України професор С.О. Костерін та його колега к.х.н С.О. Карахім. Ці питання цілком можна назвати «ексклюзивними», бо раніше вони переважно не були розглянуті на сторінках монографій та підручників, присвячених проблемам біохімічної кінетики.

Ось деякі, з моєї точки зору, особливості цієї монографії:

– вона невимушено наочно ілюструє не лише корисність використання математичних підходів до опису ензиматичних реакцій, але й взагалі демонструє

суперпозиційний взаємозв'язок природничих наук у форматі міждисциплінарної тріади «БІОХІМІЯ + БІОФІЗИКА + МАТЕМАТИКА»;

– мені навіть здається, що зазначену монографію, «рухаючись» посторінково за думкою авторів, читачі зможуть використати з метою вдосконалення індивідуальної техніки кінетичних розрахунків у випадку кількісної інтерпретації різноманітних біохімічних та біофізичних явищ;

– на сторінках монографії автори активно пропагують так звану «культуру графічної інтерпретації» експериментальних результатів в біохімічних дослідженнях (зокрема, з використанням лінеаризованих графіків). І це суттєво, бо графічне трактування одержаних даних в «лінійному» форматі, наприклад, в ензимології, є вкрай наочним та важливим для тлумачення механізму ензиматичної реакції, розрахунку кінетичних констант;

– на прикладі вибраних питань (аналіз нетривіальних кінетичних кривих – у випадку механокінетики м'язевого скорочення, внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів) читачі зможуть здобути навички самостійного емпіричного опису складних динамічних залежностей, що віддзеркалюють протікання різноманітних біохімічних, біофізичних та фізіологічних процесів (в даному випадку – «скорочення – розслаблення» м'язів, внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація).

І тут мабуть доречно згадати відомі вислови видатних особистостей на кшталт: *«Велику книгу природи написано математичними символами» (Галілей)*, чи *«В кожній природничій науці вміщено стільки істини, скільки в ній є математики» (Кант)*. Втім, у наш час бурхливого прогресу біологічної науки, можливо й не варто абсолютизувати ці вислови. Проте я дійсно сподіваюся, що монографія С.О. Костеріна та С.О. Карахіма приверне до себе увагу як досвідчених фахівців у галузі математичної біології, зокрема, ензиматичної кінетики, а також біофізичної хімії, технічної біохімії, інженерної ензимології, так і студентів і аспірантів, які цікавляться застосуванням математики в біохімії та біофізиці (перш за все – у випадку феноменів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту речовин, біологічної рецепторики).

Наприкінці я хотів би нагадати читачам відомий вислів Платона: «*Хіба ти не помітив, що здатний до математики є здібним до усіх наук в Природі?*». Бажаю усім дослідникам, які зосереджують свою увагу на вирішенні нагальних міждисциплінарних теоретичних та прикладних проблем сучасної фізико-хімічної біології, цікавих дослідів, плідних наукових ідей, спряжених з ефективним застосуванням математичних підходів при аналізі результатів своїх експериментів.

Директор Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
академік НАН та НАМН України професор С.В. Комісаренко.

*«Лише час належить нам...»
Сенека Луцій Анней*

*«Ключ до пізнання ензимів
лежить у вивченні швидкостей
реакцій, а не рівноваг»*

Дж.Б.С.Холдейн

ВСТУП

Кінетика (від грець. κίνησις – рух) являє собою науковий напрям, що пов'язаний із вивченням явищ природи в динаміці їхнього розвитку, тобто у часі (втім, що таке є час – це особливе питання!... Як тут не згадати вислів Августина Аврелія *«Я чудово знаю, що таке час, доки не думаю про це. Але варто мені замислитися – і ось я вже не знаю, що таке час!»*) [1–7]. Проте виявляється, що відстеження зміни властивостей та параметрів фізичних, хімічних, фізико-хімічних чи біологічних явищ у часі дає змогу надати кількісну інтерпретацію їхнього розвитку, розрахувати важливі характеристичні («паспортні») константи різноманітних процесів, передбачити закономірності їхнього протікання у майбутньому, наблизитись до розуміння механізмів реалізації цих процесів. У зв'язку з тим, що практично усі реальні процеси, які існують у абіогенній та біогенній ПРИРОДІ, реалізуються у часі, стає зрозумілим універсальність методології кінетичного підходу у його застосуванні до опису розвитку та з'ясування механізмів протікання та функціонування різноманітних фізико-хімічних [8–20] та біологічних явищ та систем [21–25]. Більше того, в останній час також активно розробляються й підходи, що спрямовані на створення кінетичних моделей соціальних та суспільних процесів [26–32].

Очевидно, що кінетика є трансдисциплінарним науковим напрямом. Вона – кількісна дисципліна, бо тісно пов'язана з вищою математикою, зокрема, з теорією диференціальних рівнянь, теорією графів. Взагалі кажучи, кінетичний опис елементарних процесів, які реалізуються на рівні фізико-хімічних та біофізикохімічних явищ, неможливий без залучення положень фізичної хімії, молекулярної фізики, перш за все – термодинаміки та статистичної фізики [33–40].

Використання кінетики при інтерпретації біологічних явищ на молекулярному рівні та на рівнях клітин, органів, організмів і популяцій звичайно потребує від дослідника знань у галузі фундаментальних біологічних наук, а саме – біохімії, біофізики, молекулярної та клітинної біології, фізіології, екології тощо. До того ж у галузі біології кінетичне дослідження часто-густо вимагає залучення специфічних уявлень із інших найсучасніших «перехресних» галузей природознавства – біонеорганічної, біоорганічної, біоколоїдної та супрамолекулярної хімії, фізики і хімії поверхні, біомембранології, біосенсорики, нанотехнології тощо.

І, нарешті, на теперішній час важко собі уявити кінетичне моделювання реальних фізико-хімічних та біологічних процесів без використання сучасних комп'ютерних та інформаційних технологій [41–53]. При такому моделюванні найважливішим моментом є досягнення адекватного відтворення на рівні простої моделі найбільш суттєвих рис досліджуваного процесу (як відзначив Альберт Ейнштейн, *«все варто спрощувати до тих пір, доки це можливо, але не більше того»*).

Остання обставина дозволяє, проводячи порівняння результатів моделювання з експериментальними даними, перевіряти та уточнювати наші уявлення про фундаментальні основи протікання хімічного чи біохімічного процесу, що вивчається. І, звичайно, для коректно розбудованої кінетичної моделі вкрай важливою рисою є наявність у неї так званого «потенціалу передбачення». Дійсно, проф. Стівен Хокінг стверджував, що *«...будь-яка теорія є доброю, якщо вона задовольняє, як мінімум, двом вимогам: точно описує великий клас спостережень на основі моделі, яка містить лише декілька елементів; дозволяє робити точні передбачення щодо результатів майбутніх спостережень»*.

В цілому ж спрямована і систематична робота при проведенні кінетичних експериментів потребує від дослідника (чи групи дослідників) фундаментальних знань із різних природничих наук і наукових напрямів.

Взагалі кінетику як таку можна диференціювати на три головні наукові напрями.

Фізична кінетика. Фізична кінетика є розділом теоретичної фізики, по-суті це – мікроскопічна теорія процесів, що протікають у нерівноважних середовищах [54–56].

При вирішенні задач фізичної кінетики методами квантової чи класичної статистичної фізики вивчають процеси переносу енергії, імпульсу, заряду та маси у різних фізичних системах (газах, плазмі, рідинах, твердих тілах) та вплив на них зовнішніх полів. На відміну від двох інших розділів теоретичної фізики – термодинаміки нерівноважних процесів [57–58] і електродинаміки суцільних середовищ [59–60] – фізична кінетика ґрунтується на уявленнях щодо молекулярної будови цих середовищ; останнє дає можливість розрахувати різні кінетичні коефіцієнти, важливі характеристики суцільних середовищ (наприклад, діелектричні та магнітні проникності тощо). Фізична кінетика включає в себе: кінетичну теорію газів, що складаються з нейтральних атомів чи молекул [61–63]; статистичну теорію нерівноважних процесів у плазмі [64–66]; теорію явищ переносу в твердих тілах (діелектрики, метали та напівпровідники) і рідинах [67–68]; кінетику магнітних процесів [69]; теорію кінетичних явищ, що пов'язані з проходженням швидких частинок через речовину [70]; теорію процесів переносу в квантових рідинах та надпровідниках [71–72]; кінетику фазових переходів [73–74]. Іншими словами, у широкому розумінні фізична кінетика тлумачиться як мікроскопічна теорія статистично нерівноважних систем.

Хоча фізична кінетика – це розділ теоретичної фізики, проте методи, методологія та математичний апарат фізичної кінетики також успішно використовуються при вирішенні важливих проблем сучасної теоретичної біофізики [75–77], наприклад, при дослідженні пасивного та активного транспорту речовин, зокрема, іонів, через поляризовані біологічні мембрани [78–81], механізмів м'язового скорочення [82–83], внутрішньоклітинної сигналізації [84–87], фолдингу протеїнів [88–89] тощо.

Хімічна кінетика. Хімічна кінетика – це наука про закономірності протікання у часі хімічних реакцій, їх швидкості та механізми [90–93]. Вона є класичним розділом фізичної хімії [94–96].

В основу хімічної кінетики покладено декілька універсальних принципів (закон діючих мас, принцип збереження загальної концентрації речовини в ізольованій хімічній системі (пробірка, кювета), принцип незалежного протікання реакцій, принципи стаціонарних концентрацій Боденштейна-Семенова та рівноважного наближення [97], принцип ізоляції, принцип лімітуючої стадії тощо), які мають значний ступінь узагальнення і, взагалі кажучи, можуть бути використані при описі динаміки будь-якого хімічного процесу. Головні положення хімічної кінетики описані у великій кількості підручників та монографій, наводимо посилання на деякі з них [98–119].

Одне із найважливіших завдань хімічної кінетики – розрахунок значення швидкості хімічної реакції, а також з'ясування залежності цієї швидкості від умов проведення досліду: від концентрації реагентів, рН, діелектричної проникності, іонної сили, в'язкості, дії електромагнітного поля та радіоактивного випромінювання, температури та тиску, а також інших фізико-хімічних факторів. Суттєво важливим у хімічній кінетиці є й друге завдання, яке тісно пов'язане з першим: з'ясування механізму хімічної реакції [120–122]. Розділ хімічної кінетики, у якому розглядаються методи знаходження залежностей швидкості хімічної реакції від концентрацій речовин, що реагують, одержав назву *формальної хімічної кінетики*; цей розділ є вкрай важливим для з'ясування механізму хімічної реакції.

Механізмом хімічної реакції вважають детальний шлях перетворення вихідних речовин (реагентів) у її продукти із ідентифікацією елементарних проміжних стадій, виявленням проміжних сполук, що утворюються у ході її протікання, розрахунком характеристичних кінетичних та енергетичних параметрів, властивих для кожної елементарної стадії [123–125]. Отже механізм хімічної реакції можна трактувати як складну сукупність елементарних хімічних процесів за участю молекул, атомів, вільних радикалів, іонів, збуджених частинок.

Впливаючи різними факторами середовища інкубації на швидкість хімічної реакції, можна одержати цікаві дані щодо її властивостей. Так, результати дослідження впливу концентрації реагентів на швидкість хімічної реакції можуть надати важливу інформацію щодо її механізму. Вивчення впливу концентрації

протонів на швидкість хімічної реакції часто-густо лежить в основі тестування іоногенних процесів, що супроводжують її протікання (у випадку специфічного кислотного чи лужного каталізу, при відщепленні чи приєднанні протонів).

Вивчаючи вплив іонної сили та діелектричної проникності середовища інкубації на швидкість хімічного процесу можна одержати інформацію щодо різних типів іонних та дипольних взаємодій між реагентами. Іноді корисним для розуміння механізму хімічної реакції є вивчення впливу в'язкості на швидкість її протікання.

Шлях до розуміння енергетичних закономірностей протікання хімічної реакції та розрахунку її термодинамічних характеристик лежить через вивчення впливу температури на її швидкість. Якщо будь-який хімічний процес супроводжується зміною загального об'єму компонентів реакції, то тиск буде здійснювати певний вплив на її швидкість; відповідні експериментальні дані можуть виявитися корисними для вивчення молекулярних механізмів реакції та змін у структурі розчинника.

По-суті, у типовому варіанті у хімічній кінетиці аналізуються часові (суто «кінетичні») залежності концентрацій реагентів та миттєвої швидкості реакції від часу її протікання та концентраційні залежності швидкості (зокрема, початкової) реакції від концентрацій реагентів.

Математичний апарат хімічної кінетики ґрунтується, головним чином, на використанні диференціальних рівнянь та алгебраїчних співвідношень, а при теоретичному та експериментальному кінетичному дослідженні активно використовуються різноманітні методи графічної інтерпретації одержаних результатів, зокрема метод графічної лінеаризації функціональних кінетичних залежностей («найкраща крива то є пряма!»). Взагалі, «культура графічної інтерпретації» експериментальних результатів в хімічній кінетиці має виключно важливе значення. На теперішній час активне комп'ютерне супроводження кінетичних досліджень є їхнім неодмінним атрибутом [126–128].

Принципово суттєвим є тлумачення динаміки протікання та опису механізму хімічних реакцій в термінах так званих характеристичних («паспортних») параметрів (константи швидкості, константи рівноваги тощо), які не залежать від

«суб'єктивізму» дослідника (тобто не залежать від часу інкубації та початкової концентрації реагентів, які обирає експериментатор). Саме такий підхід дає можливість найбільш об'єктивно кількісно характеризувати хімічні реакції, особливо в порівняльному аспекті [129–130].

Хоча, як вже відзначалося, хімічна кінетика є канонічним розділом фізичної хімії, втім, її методи, методологія та математичний апарат мають фундаментальне значення для вирішення різноманітних динамічних задач в біології (див. нижче), зокрема, в біохімії та біофізиці [131–135], та використовуються для моделювання хімічних та каталітичних реакцій [136–139], хімічних реакторів [140–142] та біологічних процесів [143–146]. Іноді кінетичний опис складних біофізикохімічних процесів (наприклад, у випадку розгляду пасивного та активного транспорту іонів через поляризовану біологічну мембрану) потребує сукупного залучення методів як фізичної, так і хімічної кінетики.

Біологічна кінетика. Біологічна кінетика займається вивченням динамічних закономірностей протікання біологічних процесів на різних рівнях організації живих систем – як на молекулярному, субклітинному та клітинному рівнях, так і на рівнях органів, організмів та популяцій [147–150].

В основі кінетичного аналізу біологічних процесів часто-густо лежить застосування саме методів хімічної кінетики.

Коротко окреслимо найважливіші напрями біологічної кінетики.

– *Біохімічна кінетика.* Біохімічна кінетика – це переважно хімічна кінетика ензиматичних реакцій [151–153] та ліганд-рецепторної взаємодії [154–156]. По суті, це – класичний розділ біохімії (перш за все – ензимології). Типовими задачами біохімічної кінетики є вивчення впливу концентрацій ензиму, субстратів, ефекторів (інгібіторів, активаторів), різноманітних фізико-хімічних факторів (концентрації протонів, діелектричної проникності, іонної сили, в'язкості, дії електромагнітного поля та радіоактивного випромінювання, температури тощо) на швидкість біохімічного процесу. А взагалі ж – вирішення всіх зазначених тактичних експериментальних задач спрямовано на досягнення стратегічної мети – пізнання механізму біохімічного процесу [157–160].

– *Біофізична кінетика*. Біофізична кінетика займається вивченням динамічних закономірностей протікання біофізичних процесів. Приклади типових задач, властивих для неї: дослідження кінетики пасивного та активного транспорту речовин (зокрема, іонів) через біологічні мембрани [161–165], вивчення механокінетики скорочення-розслаблення м'язів [166–171], динаміки внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів [172–174], розповсюдження нервового імпульсу [175–176] тощо.

– *Фармакокінетика*. Фармакокінетика вивчає кінетичні закономірності хімічних та біологічних процесів, що відбуваються з лікарськими сполуками в організмі [177-179]. Головними фармакокінетичними процесами є всмоктування, розподіл, метаболізм та екскреція ліків [180–183]. Слід відрізнити фармакокінетику [184–188] від фармакодинаміки [189]: якщо перша вивчає дію організму на ліки, то друга – дію ліків на організм [190–194]. Фармакокінетика разом із фармакодинамікою є розділами фармацевтики [195–198].

– *Кінетика клітинного росту*. Займається кількісною інтерпретацією росту клітинної маси, вивчає кінетичні закономірності дії різноманітних фізико-хімічних факторів та речовин на динаміку росту клітин [199–200].

– *Мікробіологічна кінетика* (її можна розглядати як частковий випадок *кінетики клітинного росту*). Розбудовує математичні моделі росту мікроорганізмів та утворення продуктів біосинтезу і утилізації різноманітних продуктів біосинтезу. В основу більшості моделей росту мікроорганізмів покладені рівняння хімічної та біохімічної кінетики [201–203]. Дослідження з мікробіологічної кінетики є важливими для вирішення нагальних практичних задач у галузі медицини, харчової промисловості, сільського господарства, технічної біохімії, біотехнології, шкіряної промисловості.

– *Онкокінетика*. У фокусі її уваги – вивчення динамічних закономірностей та кількісна характеристика процесів росту пухлин, дослідження впливу різноманітних фізико-хімічних факторів (наприклад, випромінювання, температури), хімічних чинників та фармакологічних препаратів на кінетику пухлинного росту [204–207].

Цей напрям біологічної кінетики має суттєве значення для розробки підходів, спрямованих на боротьбу з онкозахворюваннями.

– *Макробиологічна кінетика*. По-суті, це – кінетика зміни феноменологічних параметрів цілісних організмів (лінійних характеристик, ваги) – рослин, тварин, людини – в процесі їхнього росту. Має тісний зв'язок з термодинамікою живих систем. Важлива для вирішення актуальних практичних питань сільського господарства та медицини [208–209].

– *Екологічна кінетика*. Це – кінетика зміни кількості осіб в рослинних та тваринних популяціях (наприклад, у форматі «хижак – жертва»). Є вкрай важливою для оцінки стану та охорони довкілля, збереження оточуючого середовища, живої Природи в цілому [210–217].

Звичайно, у певному розумінні вищенаведена класифікація напрямів біологічної кінетики є достатньо умовною. Дійсно, часто-густо вони пов'язані між собою (наприклад, біохімічна кінетика та біофізична кінетика; біохімічна кінетика та мікробиологічна кінетика; кінетика клітинного росту, онкокінетика та фармакокінетика тощо) [218–223].

Вище були сформульовані, у так званому «класичному» форматі, наші уявлення щодо біологічної, зокрема, біохімічної кінетики. Головні положення біологічної, перш за все її класичної складової – біохімічної кінетики, віддзеркалені у великій кількості монографій, підручників та посібників (наводимо посилання на деякі з них: [224–239]).

Втім, нагадаємо ще раз: за що ми цінуємо кінетичний підхід, зокрема, у галузі формальної хімічної кінетики, у біохімічних та біофізичних дослідженнях?

1. Застосування методів кінетичного аналізу дає можливість надати строгу кількісну інтерпретацію (в термінах характеристичних констант) реакцій, процесів, явищ, що вивчаються.

2. Кінетика – це потужний універсальний засіб, що є вкрай корисним при з'ясуванні механізмів біофізикохімічних процесів.

3. Кінетичний підхід є в основі створення математичних моделей та кількісних теорій біохімічних та біофізичних процесів.

Вищенаведене цілком відповідає твердженню Е. Гуггенгейма: «Найбільш вдалі досліді виявляться некорисними, якщо експериментатору не вдасться належним чином обробити дані, що були одержані».

Звичайно, кінетичний аналіз протікання біологічних процесів передбачає активне залучення до інтерпретації експериментальних результатів статистичних методів (див., наприклад: *Прилуцький Ю.І., Ільченко О.В., Цимбалюк О.В., Костерін С.О. Статистичні методи в біології.* – К.: Наукова думка, 2017.– 215 с.).

Що ж стосується розвитку кінетичних досліджень в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, в якому працюють автори монографії, то ці дослідження були започатковані у 1973 р. переважно у відділі біохімії м'язів з приходом до Інституту С.О. Костеріна. У 1988 р. в Інституті рішенням Вченої ради було створено відділ біохімічної кінетики, який очолив докт. біол. наук С.О. Костерін, кінетичні дослідження у цьому відділі виконувалися головним чином при вивченні ензиматичних реакцій гідролізу АТФ та трансмембранного обміну іонів Ca^{2+} в м'язевій тканині. У липні 1996 р. рішенням Вченої ради Інституту відділ біохімії м'язів було розформовано, а відділ біохімічної кінетики було перейменовано у відділ біохімії м'язів.

В світовій літературі маємо велику кількість монографій, підручників, посібників, присвячених висвітленню питань хімічної та біохімічної кінетики. Відповідно, у читачів може виникнути цілком слушне запитання: чи є потреба у виданні ще однієї книжки, присвяченій біохімічній кінетиці? Втім, автори цієї монографії повинні відзначити, що вона не є канонічним учбовим посібником чи підручником з класичної біохімічної кінетики, навпаки, її читання вимагає попередньої підготовки у галузі хімічної кінетики та кінетики ензиматичних процесів. Адже в цій монографії не акцентується увага на основах хімічної та біохімічної кінетики, а обговорюється низка теоретичних питань, які стосуються спеціальних проблем кінетики ензиматичних процесів; ці проблеми переважно не знайшли віддзеркалення у класичних учбових виданнях з ензиматичної кінетики. По суті, в монографії наведені результати, що були одержані її авторами в галузі розбудови теоретичних основ вибраних проблем формальної ензиматичної кінетики.

Отже, монографію адресовано достатньо підготовленим фахівцям – спеціалістам з фізики ензиматичного каталізу, теоретичної біофізики та біофізичної хімії, які мають досвід роботи у галузі теоретичної хімічної та біохімічної кінетики.

Монографія, яку присвячено, по суті, викладанню методів кінетичного аналізу в ензимології, складається з восьми розділів.

У розділі 1 аналізується питання щодо так званих істинних та уявних констант Міхаеліса в ензимології.

Розділ 2 присвячений неканонічному тлумаченню, із застосуванням елементів теорії інформації (в термінах ентропії Шеннона), найважливішого параметру кількісної ензимології – константи Міхаеліса.

Розділ 3 спрямований на трактування принципового, в практичному аспекті (для експериментальної ензимології), питання: врахуванню парціального внеску «паралельного» хімічного (неензиматичного) перетворення субстрату в загальну динаміку ензиматичної реакції.

В розділі 4 надане універсальне тлумачення важливого класичного параметра ензимологічного процесу – коефіцієнта інгібування I_{50} , який широко використовується в інгібіторному аналізі ензиматичних реакцій.

У розділі 5 описані способи оцінки впливу оборотних інгібіторів на швидкість ензиматичних реакцій та представлений алгоритм розрахунку кінетичних констант.

Розділ 6 присвячений ідентифікації механізму ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим/переносник – субстрат – ефектор») із використанням співвідношення початкових швидкостей утворення двох продуктів реакції (так званий метод «ratio»).

В розділі 7 зроблений акцент на викладанні технології моделювання кінетики ензиматичних реакцій, що відбуваються з участю активаторів (на прикладі реакції гідролізу нуклеозидтрифосфату АТР «базальною» Mg^{2+} -АТРазою плазматичної мембрани).

І, нарешті, у розділі 8 описані вибрані методи кінетичного аналізу суперскладних кінетичних кривих – на прикладі внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів та механокінетичних графіків.

Отже, як вже відзначалося, автори сподіваються, що ця монографія зможе бути корисною для колег, які професійно працюють у галузі розробки теоретичних основ біохімічної та біофізичної кінетики. Вона може являти інтерес й як для досвідчених науковців, так і для молодих вчених, аспірантів – біохіміків, біофізиків, фахівців у галузі молекулярної та математичної біології, а також фізичної і біофізичної хімії, які проводять експериментальні дослідження, залучуючи підходи математичного моделювання при вирішенні актуальних питань ензиматичного каталізу, ліганд-рецепторної взаємодії, мембранного транспорту тощо.

Вдячність авторів науковому редактору монографії директору Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України академіку НАН України професору Комісаренку С.В. за систематичну багаторічну підтримку інтересів авторів у галузі біохімічної кінетики. Дякуємо також професору Жуку П.Ф. та к.ф.-м.н Горчеву В.Ф. за активне обговорення одержаних авторами результатів у галузі застосування математичних підходів до опису ензиматичних перетворювань.

Цінні зауваження щодо вдосконалення тексту рукопису монографії висловили її рецензенти – академік НАН України професор Булавін Л.А., член-кореспондент НАН України професор Вовк А.І. та член-кореспондент НАН України професор Мінченко О.Г., яким автори висловлюють свою особливу подяку.

РОЗДІЛ 1

ПРО ІСТИННІ ТА УЯВНІ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА В ЕНЗИМОЛОГІЇ *

Рівняння Міхаеліса-Ментен є одним з найбільш фундаментальних, а тому й найчастіше вживаних рівнянь ензиматичної кінетики. Простота цього рівняння і детально розроблені методи його застосування є найбільшою перевагою при аналізі експериментальних результатів в ензимології. Проте використання цього рівняння та його лінеаризованих форм для дослідження широкого спектру ензиматичних реакцій, механізми яких часто набагато складніші, ніж механізм, запропонований Міхаелісом-Ментен [1] і Бріггсом-Холдейном [2], несе в собі певну небезпеку, пов'язану з тим, що для складних реакцій не так просто дати правильну інтерпретацію одержаних результатів.

Ми б хотіли привернути увагу дослідників до того, що завжди необхідно чітко відрізняти уявні константи Міхаеліса від істинних констант. Нашою метою є продемонструвати, в яких випадках при розрахунку кінетичних параметрів з експериментальних даних можна отримати уявні константи Міхаеліса, а в яких – істинні, за якими ознаками визначити, істинна це константа чи уявна, та чому потрібно мати правильне уявлення про природу розрахованої константи Міхаеліса.

* Основні результати з представлених в розділі 1 були опубліковані в статтях:

Карахим С.А. Об истинных и кажущихся константах Михаэлиса в энзимологии. I. Отличительные признаки // Укр. біохім. журн.– 2011.– Т. 83, № 5.– С. 94–109.

Карахим С.А. Об истинных и кажущихся константах Михаэлиса в энзимологии. II. Выполняется ли уравнение $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$ для энзиматических реакций с участием активаторов? // Укр. біохім. журн.– 2012.– Т. 84, № 2.– С. 93–104.

Карахим С.А. Об истинных и кажущихся константах Михаэлиса в энзимологии. III. Существует ли линейная зависимость между кажущейся константой Михаэлиса и предельной скоростью и можно ли с ее помощью определить величину субстратной константы? // Укр. біохім. журн.– 2012.– Т. 84, № 3.– С. 95–110.

1.1. Рівняння Міхаеліса-Ментен та умови проведення експерименту

Рівняння Міхаеліса-Ментен було одержано для найпростішої ензиматичної реакції, в якій ензим утворює з субстратом лише один ензим-субстратний комплекс ES ; можна навіть сказати «для модельної реакції», оскільки на даний час невідомі ензими, які б перетворювали субстрат за простим механізмом (1) [3, 4])



Очевидно, що для того, щоб розрахувати концентрації всіх реагуючих речовин, необхідно знайти розв'язок системи з 4 диференціальних рівнянь, кожне з яких виражає зміну концентрації одного з учасників реакції у часі.

Завдяки використанню принципу збереження загальної концентрації речовин в реакції [5], диференціальні рівняння, що описують зміни концентрацій ензиму E та субстрату S , перетворюються в алгебраїчні, які показують, що сумарна концентрація всіх частинок, які містять даний компонент реакції, дорівнює його загальній початковій концентрації. Записавши зміну концентрації продукту у часі, як швидкість реакції v , отримаємо систему рівнянь в наступному вигляді [5, 6]:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (2)$$

$$[S] = [S]_0 - [ES] - [P] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (4)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (5)$$

Фактично всі умови проведення експериментальних досліджень ензиматичних процесів погоджені зі спрощеннями, прийнятими для виводу рівняння Міхаеліса-Ментен. Таке погодження дозволяє дослідникам застосовувати теоретичне рівняння для описання експериментальних результатів.

Кінетичні дослідження проводять при малих ступенях перетворення субстрату на продукт, тобто вимірюють так звану початкову швидкість реакції v_0 ; це дозволяє не враховувати оборотність другої стадії та впливу продукту P на хід реакції, а

також не враховувати концентрацію продукту P в рівнянні (3). Дослідження проводять при великому надлишку субстрату над ензимом ($[S]_0 \gg [E]_0$) – це дозволяє ще більше спростити рівняння (3), не беручи до уваги концентрацію комплексу ES , яка виявляється суттєво меншою, ніж концентрація субстрату $[S]_0$. Вимірювання початкової швидкості v_0 проводять в умовах, коли концентрація продукту реакції P зростає лінійно в часі t (рис. 1), що відображає постійність концентрації комплексу ES в цих умовах – такий підхід (тобто застосування принципу стаціонарності [5–7]) дає можливість прирівняти рівняння (4) нулеві.

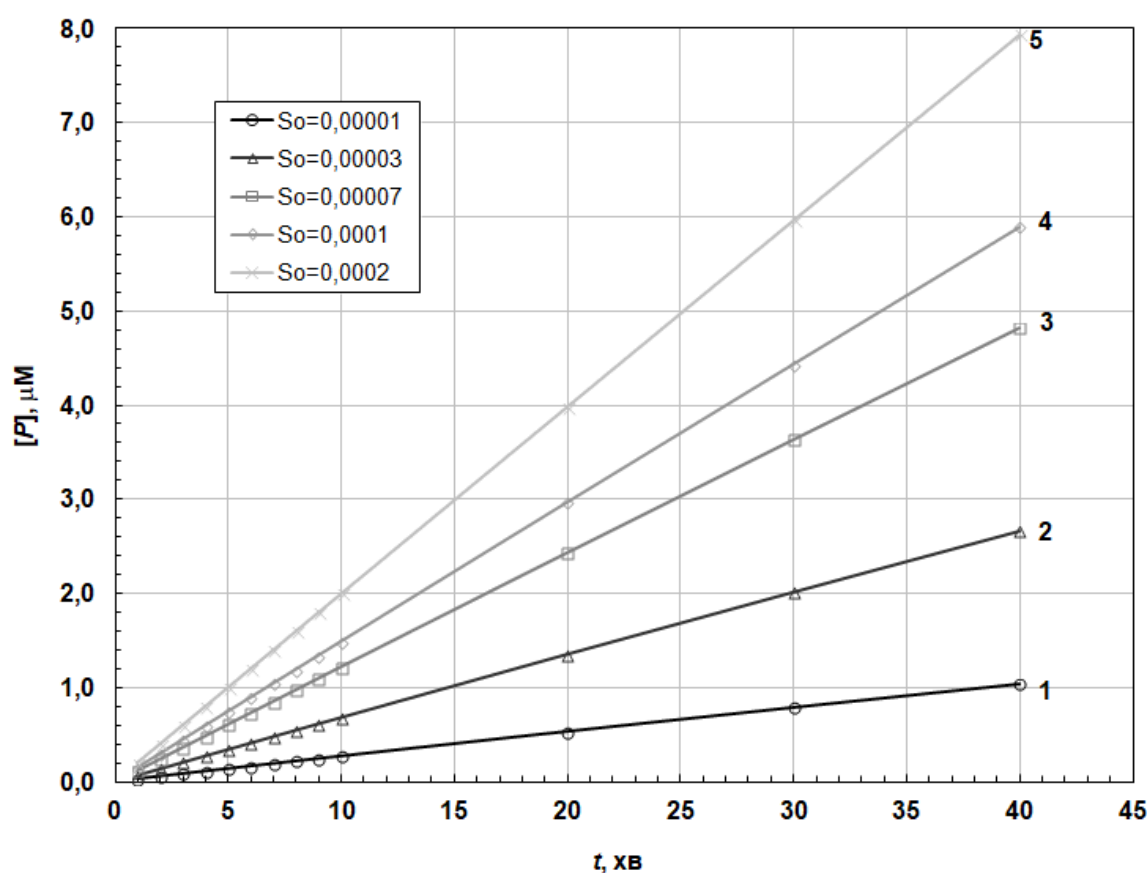


Рис. 1. Лінійна залежність утворення продукту реакції P від часу t для ензиматичної реакції, що відбувається за механізмом Міхаеліса-Ментен (1) при різних значеннях загальної концентрації субстрату $[S]_0$ (μM): 1 – 10; 2 – 30; 3 – 70; 4 – 100; 5 – 200. Для розрахунків використовували наступні значення констант швидкості: $k_2 = 3 \text{ хв}^{-1}$; $k_1 = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ хв}^{-1}$; $k_{-1} = 1000 \text{ хв}^{-1}$. Початкова (загальна) концентрація ензиму – $0,1 \mu\text{M}$.

Завдяки таким уявленням вдається значно спростити систему рівнянь (2)–(5) для того, щоб знайти її рішення і отримати результат в аналітичному вигляді. Рішення приводить до відомого рівняння Міхаеліса-Ментен:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}} \quad (6)$$

яке часто записують в наступній формі:

$$v_0 = \frac{V[S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad (7)$$

Таким чином, для ензиматичної реакції, що протікає у відповідності до механізму (1), константа Міхаеліса K_m є відношенням суми констант швидкості розпаду комплексу ES (k_{-1} і k_2) до константи швидкості його утворення (k_1) [8–12] (таке співвідношення утворюється в процесі виводу рівняння (6)):

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (8)$$

а гранична швидкість V – це добуток константи швидкості розпаду комплексу ES до продукту P (k_2) та загальної концентрації ензиму $[E]_0$:

$$V = k_2[E]_0 \quad (9)$$

Ці два параметри (K_m , V) визначають поведінку ензиматичної системи (1) і їх розрахунок є основною метою кінетичного експерименту. Оскільки Номенклатурний комітет Міжнародного союзу з біохімії та молекулярної біології (IUBMB) рекомендував відмовитись від застосування назви «максимальна швидкість» для V на користь назви «гранична швидкість» [13], бо V визначає не максимум, а межу в математичному сенсі, ми також надалі будемо користуватись для V назвою гранична швидкість.

Підкреслимо ще раз, що рівняння (6) і співвідношення (8) і (9) одержані в результаті розв'язку системи рівнянь (2)–(5), яка описує кінетику реакції, що відбувається у відповідності до механізму (1). Константи k_1 , k_{-1} і k_2 в моделі Міхаеліса-Ментен мають зрозумілий фізичний зміст як константи швидкості утворення ензим-субстратного комплексу ES з незв'язаних ензиму E і субстрату S , розпаду комплексу ES на вільний ензим E і вільний субстрат S , розпаду комплексу ES на вільний ензим E і продукт реакції P відповідно, і є істинними.

1.2. Істинні константи

Про істинні константи в багатостадійних реакціях можна говорити тільки в зв'язку з теоретичними уявленнями, заснованими на певних моделях, що описують механізм досліджуваного процесу. Тому істинність констант швидкості знаходиться в прямій залежності від істинності запропонованого механізму досліджуваної реакції, тобто від того, наскільки точно механізм реакції, представлений нами на папері, відповідає реальному – тому, що дійсно має місце.

В хімічній кінетиці поняття істинних констант швидкості стосується констант швидкості окремих елементарних стадій. Якщо запропонований механізм відповідає реальному, то всі константи швидкості кожної стадії в такому механізмі будуть істинними і будуть мати чіткий фізичний зміст.

Всі ці константи швидкості (елементарних стадій), у відповідності з законом діючих мас, є незалежними від концентрацій реагуючих речовин (тобто не змінюються протягом часу) та інших сполук, в тому числі і тих, які можуть взаємодіяти з реагуючими речовинами (наприклад, інгібіторів, активаторів, іонів металів та водню) [14], а також від того, відбуваються чи ні в даній системі одночасно й інші елементарні реакції [4, 5]. В якості незмінних коефіцієнтів (для даної температури)* вони входять у рівняння швидкості для кожної елементарної стадії (як, наприклад, у рівняння (4) та (5)), а також у рівняння, що пов'язують

початкову швидкість реакції з концентраціями реагуючих речовин (як, наприклад, у рівняння (6)).

Приклад: якщо в систему (1) додати інгібітор I , що зв'язується з ензимом E з утворенням комплексу EI^{**} , то концентрація вільного ензиму зміниться, що приведе до того, що швидкість реакції і її кінетика зміняться (рис. 2), проте всі константи швидкості (k_1, k_{-1}, k_2) при цьому залишаються незмінними.

Однак в якості істинних констант можуть виступати також і інші константи, які є функціями констант швидкості окремих стадій. Наприклад, істинними константами є константи рівноваги елементарних стадій, виражені через співвідношення констант швидкості прямої і зворотної реакцій, або константи дисоціації, виражені через співвідношення констант швидкості зворотної і прямої реакцій. Істинною константою є також константа рівноваги хімічної реакції, виражена через співвідношення добутку констант швидкості прямих реакцій і добутку констант швидкості зворотних реакцій. Ці константи, як і константи швидкості, не залежать ні від концентрацій реагуючих і сторонніх речовин, ні від наявності інших реакцій у системі.

До таких істинних констант, які є функцією елементарних констант швидкості, можна віднести і константу Міхаеліса. Виражена через константи швидкості (за рівнянням (8)), константа Міхаеліса виявляється (подібно до констант швидкості) також незалежною від концентрацій реагуючих і сторонніх речовин, а також від того, відбуваються чи ні в даній системі одночасно й інші елементарні реакції.

* Крім температури на швидкість реакції можуть справляти певний вплив також і інші фактори: тиск, рН, іонна сила, в'язкість, діелектрична проникність, полярність середовища інкубації. Проте закон діючих мас не враховує в явному вигляді впливу цих факторів, а стверджує, що швидкість пропорційна лише добутку концентрацій речовин, що безпосередньо приймають участь в досліджуваному процесі, тобто цей закон заснований на припущенні, що всі інші фактори, які можуть впливати на величину константи швидкості залишаються незмінними як в ході одного експерименту, так і в межах серії експериментів. В таких умовах величина константи швидкості має залишатись незмінною, але включати результат дії всіх вищеперахованих факторів. Тому подальший виклад, відповідно до так званого *принципу ізоляції*, базується на припущенні, що експериментальні дослідження проводять при постійних тиску та температурі, за цих умов також підтримують на незмінному рівні в'язкість, іонну силу і рН середовища інкубації, а також слідкують за тим, щоб об'єм реакційної суміші не змінювався значно в ході проведення експерименту.

** Див. механізм (18).

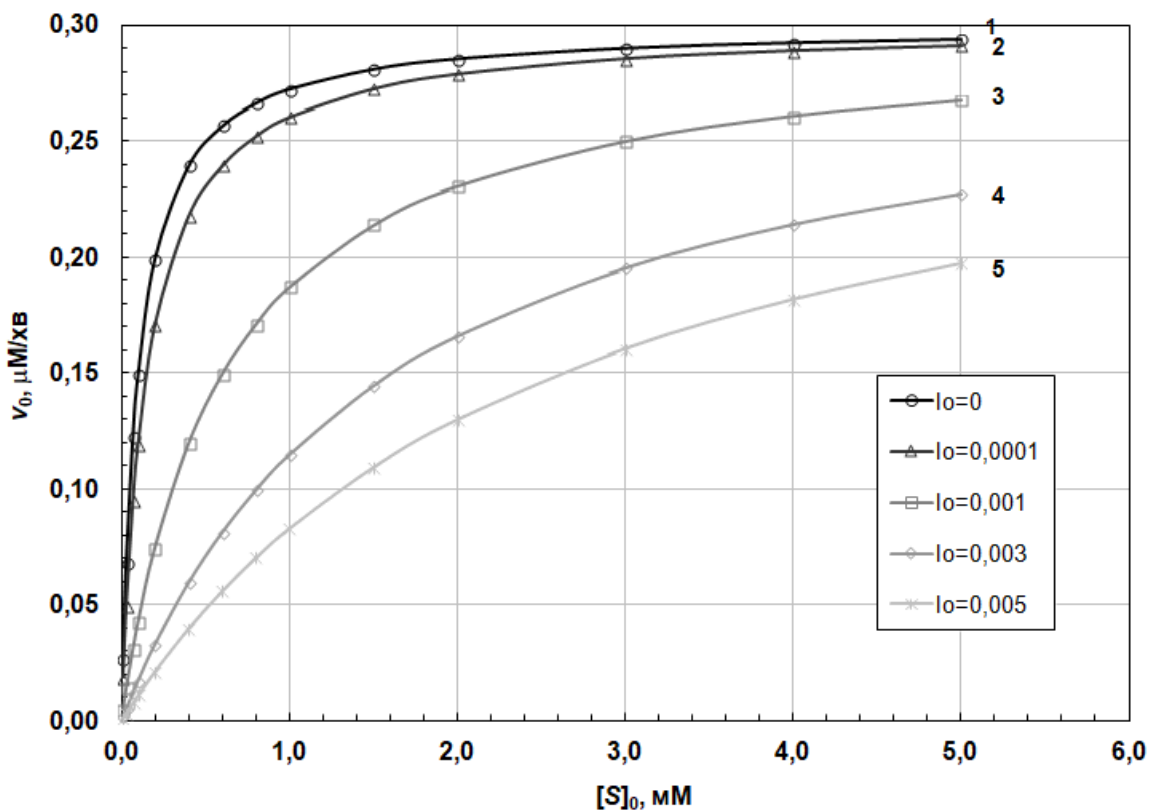


Рис. 2. Гіперболічні залежності початкової швидкості v_0 від концентрації субстрату $[S]_0$ для ензиматичної реакції, що відбувається у відповідності з механізмом (18) при різних концентраціях інгібітора $[I]_0$ (мМ): 1 – 0; 2 – 0,1; 3 – 1,0; 4 – 3,0; 4 – 5,0. Для розрахунків використовували наступні значення констант швидкості: $k_{-1} = 1000 \text{ хв}^{-1}$; $k_1 = 1 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1}\text{хв}^{-1}$; $k_2 = 3 \text{ хв}^{-1}$; $k_{-3} = 200 \text{ хв}^{-1}$; $k_3 = 1 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1}\text{хв}^{-1}$. Початкова концентрація ензиму – 0,1 $\mu\text{М}$. Час інкубації – 5 хв.

Фізичний зміст істинної константи Міхаеліса в моделі Міхаеліса-Ментен (механізм (1)) можна виявити в результаті аналізу рівняння (4) в умовах стаціонарності [11, 15]:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (10)$$

Порівнюючи цей вираз з рівнянням для істинної константи дисоціації K_s комплексу ES , можна побачити, що K_m є фактично константою дисоціації комплексу ES (в умовах стаціонарності, тобто постійності концентрації комплексу ES), коли у нього є можливість розпаду у двох напрямках – не тільки до початкових речовин, але й до продукту реакції [15]. Якщо ж можливості розпаду до продукту немає (тобто $k_2 = 0$), то умови стаціонарності швидко перетворюються в умови рівноваги, а K_m перетворюється в K_s . В умовах, коли комплекс ES дуже повільно розпадається до продукту (при $k_2 \ll k_{-1}$), між ES та E і S досить швидко встановлюється рівновага (яку часто називають квазі-рівноважним станом, або станом швидкої рівноваги) і значення K_m стає практично рівним значенню K_s .

Завдяки своїй незмінності істинні константи швидкості є характеристичними для даної елементарної стадії, що дозволяє проводити розрахунки швидкості витрачання реагентів і швидкості утворення продуктів в будь-який момент часу і при будь-яких концентраціях реагентів і продуктів.

Таким чином, для реакцій, що відбуваються у відповідності до механізму (1), константа Міхаеліса K_m і константа швидкості розпаду комплексу ES k_2 є істинними константами, тобто їх значення не змінюються ні в залежності від загальних концентрацій ензиму $[E]_0$ і субстрату $[S]_0$, ні в залежності від присутності інгібіторів, активаторів, наявності протонування ензиму, субстрату або ензим-субстратного комплексу, ні в залежності від концентрацій інших сторонніх речовин, тобто тих, які не взаємодіють ні з ензимом, ні з субстратом, ні з ензим-субстратним комплексом, ні від наявності інших реакцій в ензиматичній системі.

1.3. Уявні константи

Оскільки, як було відмічено раніше, реакції, що відбуваються у відповідності до простого механізму (1), практично не зустрічаються, на практиці дослідникам доводиться вивчати реакції з набагато більш складними механізмами. Вони часто зустрічаються з наступними ситуаціями: досліджується нова реакція з невідомим механізмом; досліджується реакція зі складним механізмом, для якого не вдається отримати залежність початкової швидкості реакції від концентрації реагуючих

речовин в явному вигляді; механізм досліджуваної реакції відомий, рівняння початкової швидкості реакції від концентрації реагуючих речовин в явному вигляді отримане, але в реакційному середовищі присутні домішки, про які дослідник не знає (або знає, але вважає їх не реакційноздатними), що можуть впливати на хід реакції. В результаті досліджень таких реакцій отримують експериментальні залежності початкової швидкості від концентрації субстрату, форма яких часто є рівнобічною гіперболою (як на рис. 2). Такі залежності описуються рівняннями вигляду (де y – швидкість, x – концентрація субстрату)

$$y = \frac{cx}{d + x} \quad (11)$$

Підібравши константи c і d можна досить точно знаходити для кожного значення x відповідне значення y . Однак рівняння (11) є математичною абстракцією, що не має ніякого зв'язку з механізмом досліджуваної реакції. Його константи c і d не мають ніякого фізичного змісту, а є, за своєю суттю, підгінними коефіцієнтами, що забезпечують формалізований зв'язок між x та y . В хімічній та ензиматичній кінетиці такі константи, що не мають зрозумілого фізичного змісту, та забезпечують лише формальний зв'язок між x і y незалежно від досліджуваного механізму, називаються ефективними або уявними. С.Д. Варфоломеев і К.Г. Гуревич дають таке визначення уявної константи швидкості: це така константа швидкості складної реакції, яка спостерігається при описанні її (цієї складної реакції) рівнянням простої реакції [3]. Це визначення можна поширити також і на константи рівноваги та дисоціації, а також на константу Міхаеліса.

Рівняння подібного вигляду часто зустрічаються в дослідженнях адсорбційних процесів, наприклад, залежність кількості адсорбованої речовини на однорідній поверхні a від тиску адсорбата P описується рівнянням Ленгмюра [16]:

$$a = \frac{a_m b P}{1 + b P} = \frac{a_m P}{\frac{1}{b} + P} \quad (12)$$

де b – адсорбційний коефіцієнт; a_m – ємність мономолекулярного шару.

Формула для закону Рауля має схожий вигляд: наприклад, для розчину, що складається з n_1 молей розчинника і n_2 молей розчиненої речовини, тиск розчинника над розчином p_1 дорівнює [16]:

$$p_1 = \frac{n_1 p_0}{n_1 + n_2} \quad (13)$$

де p_0 – тиск розчинника над чистим розчинником.

Рівняння (11) за формою аналогічне також рівнянню Міхаеліса-Ментен (7) і може бути записане у відповідності з термінологією моделі Міхаеліса-Ментен:

$$v_0 = \frac{V^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (14)$$

Рівняння (14) може розглядатись як аналог рівняння (11) для використання в ензиматичній кінетиці, в якому c змінено на V^{app} , а d – на K_m^{app} . В такому випадку параметри V^{app} і K_m^{app} мають розглядатись як ефективні, оскільки вони не зв'язані з певним механізмом (хоча іноді рівняння (14) пов'язують з узагальненим механізмом*, аналогічним механізму (1), але, як буде показано далі, для цього немає достатніх підстав), і не мають чіткого фізичного змісту, а є лише підгінними коефіцієнтами (наприклад, коефіцієнт c , в залежності від того, який процес описують рівнянням (14), може мати зміст ємності мономолекулярного шару, тиску розчинника над чистим розчинником або граничної швидкості).

Фізичний зміст може виявитись тільки після аналізу реального механізму досліджуваної реакції і математичного виводу рівняння для початкової швидкості реакції у вигляді, аналогічному рівнянню (14). Як було показано вище, для механізму (1) такий аналіз був проведений Міхаелісом і Ментен, а також Бріггсом і Холдейном. Отримане ними рівняння (7), яке в повному вигляді виражається рівнянням (6), повністю співпадає з рівнянням (14).

* Тобто з механізмом (17)

Тому, якщо ми досліджуємо реакцію з невідомим механізмом і за допомогою рівняння (14) розраховали для неї V^{app} і K_m^{app} , а потім встановили, що механізм досліджуваної реакції описується схемою (1), то розраховані нами ефективні параметри чисельно рівні константам V і K_m з рівняння (7):

$$K_m^{app} = K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (15)$$

$$V^{app} = V = k_2[E]_0 \quad (16)$$

Якщо ж ми досліджуємо реакцію, заздалегідь знаючи, що її механізм описується схемою (1), то, застосовуючи рівняння (7), зразу розраховуємо значення констант V і K_m .

Проте, як було зазначено раніше, реальні механізми ензиматичних реакцій виявляються набагато складнішими, ніж модель Міхаеліса-Ментен, що представлена схемою (1). Тому застосування для їх аналізу рівняння (14) приводить до того, що розраховані константа Міхаеліса і гранична швидкість будуть уявними (згідно визначення уявних констант за Варфоломеевим і Гуревичем [3]). Уявна константа Міхаеліса може бути рівною за величиною істинній для механізмів, для яких аналіз залежності початкової швидкості від концентрації субстрату покаже, що уявна константа Міхаеліса підпорядковується рівнянню (8). Найчастіше V^{app} і K_m^{app} , розраховані за рівнянням (14), не будуть співпадати з параметрами V і K_m , вираженими у формі рівнянь (8) та (9), що впливають з рівнянь (6) і (7), якщо взагалі ці константи (V і K_m) можна розрахувати (тобто, якщо в складній реакції є стадії, які можна описати з допомогою констант k_1 , k_{-1} , k_2 , що характеризують механізм (1)). Це означає, що для реальних механізмів рівність (15) і (16) в більшості випадків виконуватись не буде.

Незважаючи на однаковий вигляд, рівняння (7) і (14) є різними рівняннями з точки зору фізичного змісту кінетичних параметрів V і K_m , що входять в них. В рівнянні (7) ці параметри мають значення, виражені рівняннями (8) і (9), а в рівнянні (14) вони можуть бути виражені різними способами в залежності від механізму

досліджуваного процесу. Тому, рівняння (7), яке в повному вигляді записується, як рівняння (6), може бути застосоване тільки для дослідження реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом (1), в той час як рівняння (14) може використовуватись для дослідження будь-яких реакцій, що підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен (тобто реакцій, для яких спостерігається гіперболічна залежність початкової швидкості від концентрації субстрату), оскільки в нього входять ефективні параметри, не пов'язані прямо з механізмом досліджуваної реакції.

Як було відзначено вище, визначенням істинної константи Міхаеліса (її суттю), що впливає з моделі Міхаеліса-Ментен, є рівняння (8). А способом її розрахунку, заснованим на властивості рівняння (7), є знаходження такої концентрації субстрату, при якій початкова швидкість реакції дорівнює половині її максимального граничного значення – при цьому величина константи Міхаеліса рівна за величиною цій концентрації [5, 9–12].

А ось в рекомендаціях Номенклатурного комітету Міжнародного союзу з біохімії і молекулярної біології (як і в інших джерелах [17, 18]), що стосуються термінології в ензиматичній кінетиці [13], в розділі, присвяченому кінетиці Міхаеліса-Ментен, наводиться інше визначення константи Міхаеліса: константою Міхаеліса є концентрація субстрату, при якій $v_0 = 0,5 V$. При цьому для константи Міхаеліса застосовується позначення K_m , як для істинної константи, оскільки уявна константа позначається K_m^{app} (в розділі, присвяченому двохсубстратним реакціям). Навіть наводиться правило, як визначити істинну константу Міхаеліса з уявної у випадку двохсубстратних реакцій: константа Міхаеліса для A , K_{mA} , є значенням уявної константи Міхаеліса для A , коли концентрації всіх субстратів, крім A , екстрапольовані до безкінечності.

З іншого боку відзначається, що оскільки кількість механізмів, що підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен, велика, не існує загального визначення K_{mA} для конкретних механізмів, вираженого через константи швидкості елементарних стадій. Як ми можемо бачити, визначення константи Міхаеліса через концентрацію субстрату, при якій $v_0 = 0,5 V$, відразу ж приводить до висновку, що

такі константи неможливо навіть виразити однаковим чином за допомогою констант швидкості елементарних стадій [19].

Стає зрозумілим, що визначення констант Міхаеліса, згідно рекомендацій Номенклатурного комітету, стосується уявних констант Міхаеліса. Втім, для уявних констант Міхаеліса неможливо надати визначення з точки зору фізичного сенсу. Тому доводиться давати визначення цих констант через спосіб розрахунку і називати константу Міхаеліса «концентрацією субстрату».

Хоча константа Міхаеліса і має розмірність M (моль/дм³), проте вона не має ніякого відношення до концентрації субстрату (наприклад, субстратну або інгібіторну константи не називають концентраціями субстрату або інгібітора, хоча вони також вимірюються в M). Навпаки, присутність уявної константи Міхаеліса у знаменнику рівняння початкової швидкості є наслідком того, що у знаменнику відбувається розділення параметрів: окремо виділяється концентрація субстрату, а всі інші константи швидкості разом з концентраціями ефекторів утворюють уявну константу Міхаеліса. Тому вона не може бути концентрацією субстрату (про це свідчить, наприклад, рівняння (8), або інші рівняння, що будуть наведені далі в даній роботі), але може бути рівною за величиною [9, 11, 12] тій концентрації субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині граничної.

Можна дати наступне визначення: уявна константа Міхаеліса – це константа у рівнянні для початкової швидкості ензиматичної реакції, що описує гіперболічні залежності, яка має наступну властивість: при концентрації субстрату, яка за величиною рівна значенню цієї константи, початкова швидкість дорівнює половині від граничної.

Незважаючи на те, що K_m та K_m^{app} мають однакові назви і розмірність та ведуть своє походження з рівняння Міхаеліса-Ментен – це абсолютно різні фізичні величини, а, відповідно, вони мають і різний фізичний зміст.

Істинна константа Міхаеліса K_m характеризує виключно механізм (1) чи аналогічний реакційний фрагмент у складі більш складного механізму*, тобто, стан

* Див., наприклад, реакцію (18)

ензим-субстратного комплексу ES з врахуванням швидкостей його утворення (визначається константою швидкості другого порядку взаємодії пари реагуючих речовин) і розпаду (визначається константами швидкості першого порядку розпаду комплексу до продуктів і до початкових речовин).

Ефективна константа Міхаеліса K_m^{app} може бути розрахована методами лінеаризації (див., наприклад, рис. 3) та комп'ютерного підбору для будь-якої складної ензиматичної реакції (а тому не має чіткого фізичного змісту), яка підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен, тобто описується рівнянням (14).

При цьому часто можна розраховувати константу Міхаеліса не тільки по субстрату, але також і по активатору*. І якщо для уявної константи Міхаеліса по субстрату ми можемо формально уявити собі найпростішу схему механізму, який вона характеризує [20]



то для константи Міхаеліса по активатору навіть такої формальної схеми уявити неможливо, оскільки активатор ензиматично не перетворюється з утворенням продукту. Тому константи Міхаеліса по активатору не можуть бути істинними (з точки зору фізичного змісту), а вони є завжди уявними.

* Наприклад:
$$v_0 = \frac{\frac{k_2[E]_0[S]_0}{(K_m^{EMS} + [S]_0)}[M]_0}{[M]_0 + \frac{\left(\frac{k_2[S]_0 + K_m^{EMS} K_s^M}{k_3}\right)}{(K_m^{EMS} + [S]_0)}} = \frac{V_m^{app}[M]_0}{[M]_0 + K_m^{app}}; \quad v_0 = \frac{\frac{k_2[E]_0[S]_0}{\left([S]_0 + \frac{k_2}{k_1}\right)}[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS} \frac{(K_s + [S]_0)}{\left([S]_0 + \frac{k_2}{k_1}\right)}} = \frac{V_m^{app}[M]_0}{[M]_0 + K_m^{app}}$$

$$v_0 = \frac{k_1[E]_0[S]_0[M]_0}{[M]_0 + \left(\frac{k_1[S]_0 + k_{-1}}{k_2}\right)} = \frac{V_m^{app}[M]_0}{[M]_0 + K_m^{app}}; \quad v_0 = \frac{\frac{[E]_0[S]_0}{\left(\frac{[S]_0 + \frac{K_s}{k_3} + \frac{1}{k_1}\right)}[M]_0}{\left([S]_0 + K_s K_s^{ES} + K_s^{ES}[S]_0\right)}}{[M]_0 + \frac{k_2 \left(\frac{[S]_0 + \frac{K_s}{k_3} + \frac{1}{k_1}\right)}{k_3}} = \frac{V_m^{app}[M]_0}{[M]_0 + K_m^{app}} \quad \text{відповідно для}$$

реакцій (30), (40), (79) та (87), що розглянуті нижче.

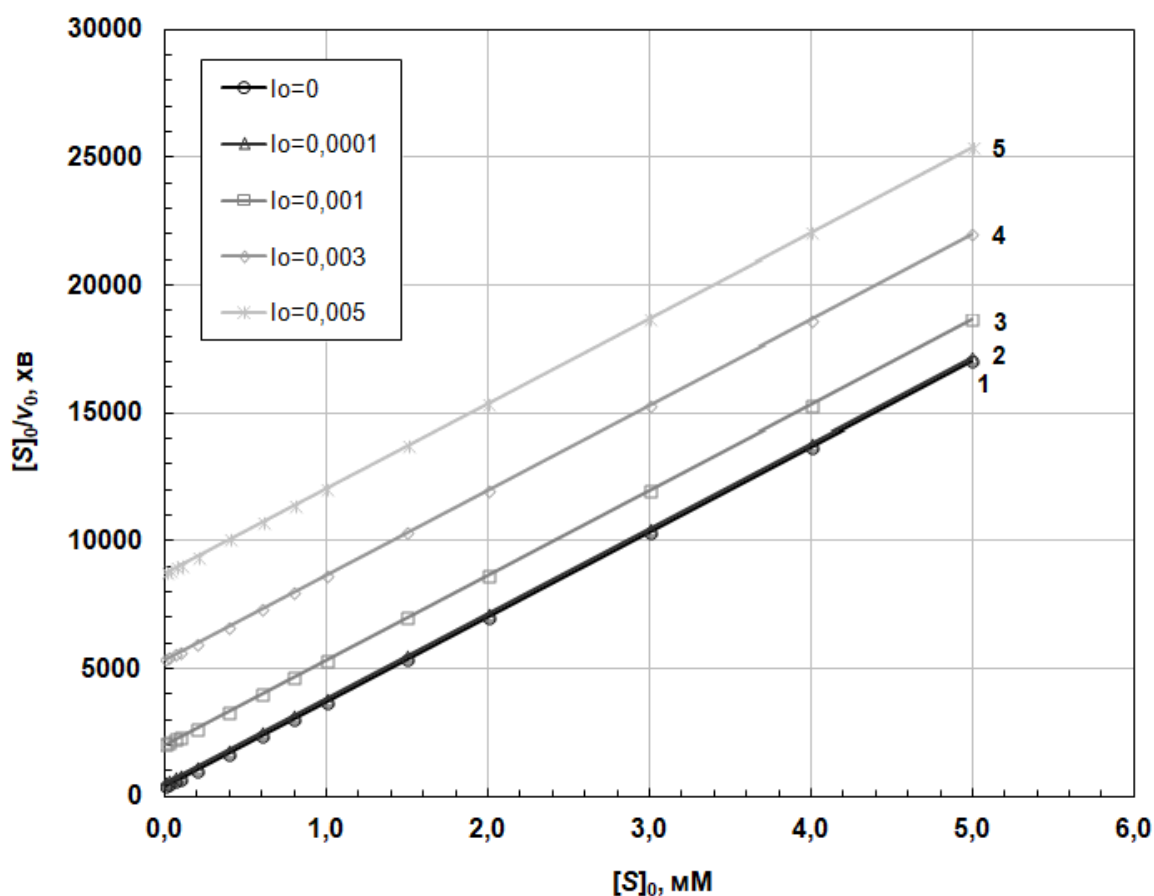


Рис. 3. Лінеаризація кривих, показаних на рис. 2, за методом Хейнеса в координатах

$\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$. На осі ординат відсікається відрізок, чисельно рівний $\frac{K_m^{app}}{V^{app}}$, а тангенс

кута нахилу прямих дорівнює $\frac{1}{V^{app}}$. V^{app} не змінюється при додаванні інгібітора

($V^{app} = k_2[E]_0 = 3,00 \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$), в той час як K_m^{app} збільшується зі зростанням концентрації інгібітора: 0,10; 0,15; 0,60; 1,61 і 2,61 мМ для концентрацій інгібітора 0 (крива 1); 0,1 (крива 2); 1,0 (крива 3); 3,0 (крива 4) та 5,0 мМ (крива 5) відповідно.

Таким чином, уявна константа Міхаеліса K_m^{app} може суттєво перевищувати істинну константу Міхаеліса K_m (яка в даному випадку дорівнює 0,1003 мМ) і субстратну константу K_s (що дорівнює 0,1000 мМ).

В загальному випадку уявні константи Міхаеліса і граничні швидкості є постійними тільки для даних експериментальних умов [4], тобто дозволяють описувати тільки експериментальні залежності початкової швидкості від концентрацій реагентів, одержані в строго ідентичних умовах (іншими словами: описують тільки одну експериментальну криву; див., наприклад, рис. 2). На противагу істинній константі уявна константа Міхаеліса K_m^{app} в більшості випадків є функцією різних параметрів ензиматичної системи (констант швидкості різних стадій, концентрацій інгібіторів, активаторів, кофакторів, іонів водню або металів) [21] і, як впливає з методу її визначення, відповідає концентрації субстрату, при якій гранична швидкість зменшується вдвоє. Тому уявні константи в загальному випадку не є константами (з точки зору незмінності, постійності) [19] (рис. 4). Константами вони можуть бути названі тільки тоді, коли є функціями тільки констант швидкості окремих стадій реакції, але не концентрацій реагуючих речовин.

Внаслідок того, що назва константи Міхаеліса розповсюдилась (через схожість рівнянь (7) і (14)) з істинної константи (рівняння (8)) на уявну, а потім і на константи, що розраховуються з ефективних констант (подібно до K_m^{EP} , K_m^{ES} , K_m^{EMS} з наведених нижче прикладів), часто буває не просто розібратись, про яку константу Міхаеліса йде мова і яким є її фізичний зміст. Іноді навіть важко словами виразити різницю в змісті констант, що визначаються, які є різними, а називаються однаково.

Було б набагато простіше для сприйняття, якби різні константи Міхаеліса називалися б по-різному. Наприклад, можна було б назвати істинну константу Міхаеліса, що виражається рівнянням (8), константою Бріггса-Холдейна (позначивши її K_{BH}), за уявною константою Міхаеліса (розрахунок якої виконується за рівнянням (14)) залишити назву уявної константи Міхаеліса (K_M^{app}), а якщо уявна константа Міхаеліса для конкретного механізму виявляється функцією тільки констант швидкості елементарних стадій і виявляє властивості істинної – називати її істинною константою Міхаеліса (K_M). Істинні ж константи Міхаеліса, розраховані з уявних (виду $K = \frac{k_{-n} + k_{n+1}}{k_n}$) і не співпадаючі за фізичним сенсом з константою

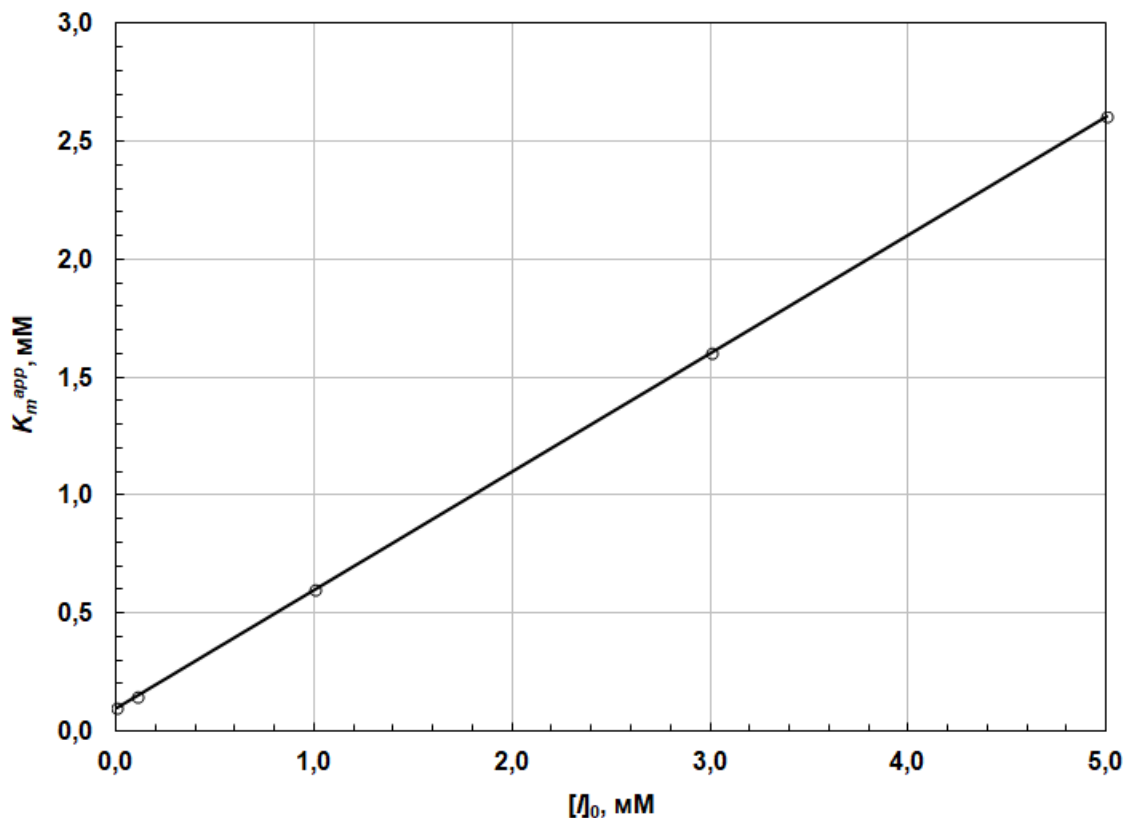


Рис. 4. Графік залежності K_m^{app} від концентрації інгібітора $[I]_0$, побудований за даними, отриманими з рис. 3. На осі ординат пряма відсікає відрізок, чисельно рівний істинній константі Міхаеліса K_m , а тангенс кута нахилу прямої дорівнює відношенню K_m та K_i . Розраховані з графіка значення дорівнюють: $K_m = 0,1008$ мМ і $K_i = 0,201$ мМ. Розраховані, виходячи з констант швидкості, значення цих параметрів складають: $K_m = 0,1003$ мМ і $K_i = 0,200$ мМ. В результаті додавання інгібітора уявна константа Міхаеліса K_m^{app} змінюється (зростає пропорційно концентрації інгібітора), а істинна K_m залишається незмінною.

Бріггса-Холдейна (такі як K_m^{EP} , K_m^{ES} , K_m^{EMS} з наведених нижче прикладів), можна називати константами двонаправленої дисоціації конкретного комплексу (комплексу EAS , що утворюється з субстрату S і комплексу ензиму з активатором EA – K_{2dS}^{EAS} ; комплексу EAS , що утворюється з ензиму E і комплексу субстрату з активатором AS – K_{2dAS}^{EAS} ; комплексу ES , що утворюється з ензиму E і субстрату S , але розпадається не до продуктів, а іншим шляхом – K_{2dS}^{ES}).

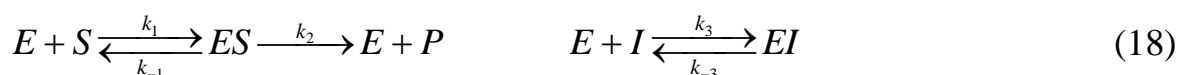
Термін «константа Міхаеліса» викликає асоціації із взаємодією ензиму E з субстратом S , недарма її часто намагаються використовувати для характеристики спорідненості ензиму з субстратом [9, 10] (хоча це і помилково). А коли швидкість розпаду комплексу ES до продукту значно менша, ніж швидкість його утворення з вільних ензиму та субстрату, то константа Міхаеліса наближається за величиною до константи дисоціації ензим-субстратного комплексу K_s , що дійсно характеризує спорідненість ензиму з субстратом (скажемо точніше: спорідненість ензиму та субстрату, що знаходяться в розчині у вільному стані, тобто не зв'язаному з іншими компонентами ензиматичної системи).

Саме поняття спорідненості є еквівалентним константі рівноваги K_p . Константа рівноваги (як і константа дисоціації) характеризує енергію зв'язку E з S (оскільки існує зв'язок K_p зі стандартним потенціалом Гіббса ΔG^0 : $\Delta G^0 = -RT \ln K_p$ [17]): чим вище значення K_p (або чим менше значення K_s), тим сильніша взаємодія ензиму і субстрату, або, як кажуть, вище їх спорідненість чи афінитет. Чим вище значення K_p (або чим менше значення K_s), тим більш суттєво константа швидкості прямої реакції перевищує константу швидкості зворотної реакції, і тим більша кількість комплексу ES утворюється при досягненні реакцією рівноважного стану.

1.4. Ознаки уявних констант, що відрізняють їх від істинних

Для того щоб краще зрозуміти, за якими ознаками можна відрізнити уявну константу Міхаеліса від істинної, розглянемо декілька прикладів.

1. Повне конкурентне інгібування:



При умові, що $[S]_0 \gg [E]_0$ й $[I]_0 \gg [E]_0$, реакції, які відбуваються у відповідності до даного механізму, швидко переходять у стаціонарний режим, в якому концентрації комплексів залишаються протягом відносно довгого часу

практично незмінними, що дозволяє прирівняти нулю похідні $\frac{d[ES]}{dt}$ та $\frac{d[EI]}{dt}$

(такий підхід до розв'язку систем диференціальних рівнянь називають квазістаціонарним наближенням):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S]_0([E]_0 - [ES] - [EI]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (19)$$

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_3[I]_0([E]_0 - [ES] - [EI]) - k_{-3}[EI] = 0 \quad (20)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (21)$$

і в результаті вивести рівняння для початкової швидкості

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 + \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right)\left(1 + \frac{k_3[I]_0}{k_{-3}}\right)} = \frac{V[S]_0}{[S]_0 + K_m\left(1 + \frac{[I]_0}{K_i}\right)} = \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (22)$$

де: $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ та $K_i = \frac{k_{-3}}{k_3}$ – істинна константа Міхаеліса та константа інгібування

відповідно. У відповідності з запропонованими позначеннями $K_m = K_{BH}$, $K_m^{app} = K_M^{app}$.

Залежність початкової швидкості від концентрації субстрату є гіперболічною, тобто підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен (рис. 2).

З рівняння (22) видно, що K_m^{app} є функцією істинної константи Міхаеліса K_m , константи інгібування K_i і концентрації інгібітора $[I]_0$. В даному випадку з набору K_m^{app} , розрахованих при різних концентраціях інгібітора, ми можемо розрахувати і істинну константу Міхаеліса K_m за відрізком, що відсікається на осі ординат прямою, побудованою в координатах $K_m^{app} - [I]_0$ (рис. 4).

Залежність уявної константи Міхаеліса K_m^{app} від концентрації інгібітора говорить про те, що насправді ця константа константою не є, оскільки вона змінює своє значення в залежності від концентрації одного з реагентів (див. рис. 3–4). Така поведінка є однією з ознак уявних констант. При цьому істинна константа Міхаеліса залишається незмінною при будь-яких концентраціях ензиму, субстрату і інгібітора (у відповідності з рівнянням (8)) (рис. 4).

З рівняння (22) також випливає, що уявна гранична швидкість V^{app} , розрахована із залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату, не змінюється в залежності від концентрацій субстрату і інгібітора (рис. 3), і за фізичним змістом відповідає граничній швидкості V , що входить в рівняння Міхаеліса-Ментен (див. рівняння (9)). Однак граничну швидкість, що входить в рівняння Міхаеліса-Ментен (7), виражену за допомогою рівняння (9), не можна назвати істинною константою (з точки зору фізичного змісту) і взагалі константою (з точки зору незмінності), оскільки вона також залежить від концентрації однієї з реагуючих речовин – від концентрації ензиму, тобто вона є по суті уявною константою. Тому, не приймаючи до уваги відповідних концентрацій ензиму, немає сенсу порівнювати два значення граничної швидкості. Можна порівнювати тільки співвідношення граничної швидкості і відповідної концентрації ензиму, тобто константи швидкості k_2 , які є істинними константами. Істинна константа k_2 є характеристичною для другої (необоротної) стадії механізму (1) або аналогічної стадії в складі більш складного механізму, такого як (18), тобто вона є питомою швидкістю спонтанного розпаду ензим-субстратного комплексу ES до конкретного продукту P . Як істинна константа швидкості вона не залежить ні від концентрації комплексу ES , ні від концентрацій інших речовин.

Уявна гранична швидкість V^{app} (як і уявна константа Міхаеліса K_m^{app}) часто є функцією різних параметрів ензиматичної системи. Вона показує, яку найвищу швидкість утворення продукту можна досягти в рамках досліджуваної ензиматичної реакції. Проте значення V^{app} в більшості випадків відрізняється від V , що виражена рівнянням (9), оскільки внаслідок більш складного механізму досліджуваної реакції, виявляється неможливим перевести увесь початковий ензим

в ензим-субстратний комплекс навіть при значному перевищенні загальної концентрації субстрату над загальною концентрацією ензиму, тому що останній витрачається не тільки на зв'язування з субстратом, але також й на зв'язування з іншими учасниками реакції. Іншим фактором, що зумовлює розбіжність між значеннями V^{app} та V , є те, що ензим-субстратний комплекс може розпадатись до продукту не прямо (в одну стадію) з константою швидкості k_2 , як наведено на схемі (1), а через декілька стадій. Тому ефективну граничну швидкість часто виражають наступним чином [21]:

$$V^{app} = k_{cat} [E]_0 \quad (23)$$

де k_{cat} є параметром, який враховує всі вищевказані впливи на граничну швидкість досліджуваної реакції.

Як було зазначено, якщо $k_{-1} \gg k_2$, то істинну константу Міхаеліса K_m можна розглядати як константу дисоціації комплексу ES (див. схему (1)) [2–8, 18, 21, 22]:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (24)$$

Деякі дослідники вважають, що співвідношення $k_{-1} \gg k_2$ є справедливим для більшості ензиматичних реакцій, а тому константа Міхаеліса K_m за своєю величиною практично співпадає з константою дисоціації K_s [12, 21]. Проте такий висновок може стосуватись тільки реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом (1) (якщо надійно встановлено, що $k_{-1} \gg k_2$). Його не можна застосовувати до реакцій з більш складними механізмами (тобто у випадку тлумачення в термінах уявних констант Міхаеліса), хоча, іноді стверджують зворотнє [21].

Це можна перевірити на прикладі реакцій, що протікають за механізмом (18). З рівняння (22) випливає, що уявна константа Міхаеліса K_m^{app} може бути набагато більшою, ніж істинна константа Міхаеліса K_m , і, відповідно, і субстратна константа K_s . При великих концентраціях інгібітора, коли $[I]_0 \gg K_i$, навіть при дотриманні

умови, що $k_{-1} \gg k_2$, K_m^{app} може значно перевищувати K_s (наприклад, з рис. 3 випливає, що при концентрації інгібітора 5 мМ K_m^{app} перевищує K_s в 26 разів).

Константа інгібування K_i за змістом аналогічна субстратній константі K_s – це також константа дисоціації, але, зрозуміло, не ензим-субстратного комплексу ES , а комплексу ензим-інгібітор EI . Важливість цих констант полягає в тому, що вони дозволяють оцінити спорідненість ензиму до відповідного компоненту ензиматичної реакції. Однак величину спорідненості ми можемо оцінити тільки за значеннями істинних констант K_i і K_s (тобто констант, що відносяться до елементарних стадій утворення відповідних комплексів). Недостатньо чітке уявлення про те, з якими константами, істинними чи уявними, ми маємо справу, може привести нас до неправильної інтерпретації одержаних результатів та до помилкових висновків. Як приклад, розглянемо статтю В. Рогожина і Т. Рогожиної [23].

Метою даної роботи було дослідження впливу індоліл-3-оцтової кислоти (ИУК) на пероксидазне окислення, зокрема, о-дианізидину (ОДН) у широкому діапазоні рН.

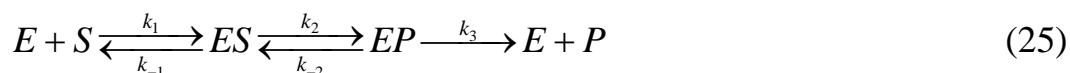
Автори відзначають: «Связывание ИУК с пероксидазой зависит от рН среды. Так в реакциях пероксидазного окисления ОДН величина K_i при рН 4,5–7,0 изменяется в диапазоне от 9,6 до 0,72 мкМ, т.е. с возрастанием рН сродство ингибитора к энзиму может повышаться в 13,3 раза» (схожу фразу можна прочитати також, наприклад, і в роботі [24]). Як ми відмічали вище, спорідненість інгібітора до ензиму можна оцінювати тільки за значенням істинної константи інгібування, розрахунок якої і є метою досліджень з використанням оборотних інгібіторів [25, 26]. Проте істинна константа інгібування не може залежати від концентрацій інших учасників ензиматичного процесу: субстратів, інгібіторів, активаторів, кофакторів, іонів металів і протонів (тобто рН): вона повинна бути незмінною константою. У авторів статті вона змінюється в залежності від рН, а це означає, що вони мають справу з уявною константою інгібування, яка є функцією концентрації іонів водню [27].

Уявну константу інгібування автори отримують тому, що для її розрахунку використовують просту схему, що відповідає конкурентному інгібуванню

аналогічну (18), оскільки такий тип інгібування був встановлений для даної реакції на основі побудови графіків в координатах Лайнуївера-Берка, в той час як істинний механізм досліджуваної реакції набагато складніший. Як пишуть автори, ИУК є субстратом ензиму пероксидази (а в досліджуваному випадку автори розглядають ИУК тільки як інгібітор), а окислення ИУК пероксидазою відбувається через утворення потрійного комплексу ензим-ИУК-кисень. Крім того, як ми бачили раніше, на швидкість реакції суттєвий вплив справляє також рН. Природньо, що проста схема (18) не може адекватно описувати такий складний механізм, а, тому, за рівнянням (22) неможливо розрахувати істинну константу інгібування. Уявна ж константа інгібування не може бути мірою спорідненості, тому що є функцією концентрації протонів (а, можливо і інших учасників реакції). Внаслідок залежності від концентрацій реактантів, абсолютна величина уявної константи дисоціації може значно відрізнятись від істинної.

Далі автори знову використовують той же підхід: «Показано, что увеличение гидрофобности аминокислоты повышает сродство ауксина (ИУК) к энзиму». За уявними константами дисоціації не можна оцінювати спорідненість, а, тому, і висновок, зроблений авторами, що «преимущественным местом связывания ИУК и ОДН в активном центре пероксидазы, по-видимому, должна быть гидрофобная область», виявляється таким, що не має під собою вагомих підстав.

2. Трьохстадійна реакція, що підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен [6]:



При умові, що $[S]_0 \gg [E]_0$, в квазістаціонарному наближенні можна розв'язати систему рівнянь, що описують реакції, які протікають за даним механізмом

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S]_0 ([E]_0 - [ES] - [EP]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}[EP] = 0 \quad (26)$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[EP] - k_3[EP] = 0 \quad (27)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_3[EP] \quad (28)$$

і вивести рівняння початкової швидкості

$$v_0 = \frac{k_3[E]_0[S]_0}{[S]_0(1 + K_m^{EP}) + \left[\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}\right)K_m^{EP} - \frac{k_{-2}}{k_1}\right] \frac{k_3[E]_0}{(1 + K_m^{EP})}[S]_0} = \frac{V^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (29)$$

де: $K_m^{ES} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$; $K_m^{EP} = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}$. У відповідності з запропонованими позначеннями

$$K_m^{app} = K_M, K_m^{ES} = K_{2dS}^{ES}, K_m^{EP} = K_{2dES}^{EP}.$$

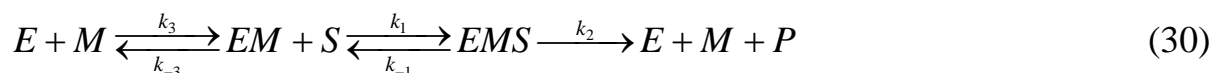
З рівняння (29) видно, що K_m^{app} є функцією тільки констант швидкості, а тому її величина не змінюється в залежності від концентрацій реагуючих речовин. З цієї точки зору (постійності, незалежності від концентрацій) вона може бути названа істинною константою, але не істинною константою Міхаеліса K_m (якщо це виражати у запропонованій термінології, то уявна константа Міхаеліса K_m^{app} для даного механізму є істинною K_M і немає необхідності уточнювати, що вона не є константою Бріггса-Холдейна K_{BH}), оскільки має інший фізичний зміст: інший фізичний зміст є ще однією ознакою уявних констант.

Ми можемо бачити, що в склад уявної константи Міхаеліса K_m^{app} входить константа K_m^{ES} (істинна константа, оскільки є функцією тільки констант швидкості елементарних стадій), яка з першого погляду схожа на істинну константу Міхаеліса, виражену рівнянням (8). Проте, зі схеми (25) видно, що на стадії, яка характеризується константою швидкості k_2 , відбувається не розпад ензим-субстратного комплексу до продукту, як у випадку моделі Міхаеліса-Ментен, а перетворення його в інший комплекс. Тому константа K_m^{ES} не є істинною константою Міхаеліса в сенсі рівняння (8) (в запропонованій термінології K_m^{ES} є константою двонаправленої дисоціації комплексу ES , а не K_{BH}).

Внаслідок відсутності стадії розпаду комплексу ES до продукту, істинна константа Міхаеліса K_m в сенсі рівняння (8) (в запропонованій термінології K_{BH}) для досліджуваного механізму розрахованою бути не може. В даному механізмі є тільки одна стадія (перша), відповідність якій можна знайти в моделі Міхаеліса-Ментен, тому при дослідженні реакції, що відбувається за даним механізмом (25), в ідеальному випадку можна визначити значення тільки двох констант швидкості k_1 і k_{-1} (або їх співвідношення), які знаходять своє відображення в механізмі (1).

З ефективною граничною швидкості V^{app} також можна розрахувати константу $k_{cat} = \frac{k_3}{1 + K_m^{EP}}$, яка має інший фізичний зміст, ніж істинна константа k_2 в моделі Міхаеліса-Ментен, а тому також є уявною.

3. Трьохстадійна реакція з участю активатора M , що також підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен [28]:



Реакції, що протікають за цим механізмом, описуються системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_3[E][M] + k_{-3}[EM] + k_2[EMS] \quad (31)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_3[E][M] + k_{-3}[EM] + k_2[EMS] \quad (32)$$

$$\frac{d[EM]}{dt} = k_3[E][M] - k_{-3}[EM] - k_1[EM][S] + k_{-1}[EMS] \quad (33)$$

$$\frac{d[EMS]}{dt} = k_1[EM][S] - k_{-1}[EMS] - k_2[EMS] \quad (34)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[EM][S] + k_{-1}[EMS] \quad (35)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EMS] \quad (36)$$

В квазістаціонарному наближенні для такого механізму можна отримати наступне рівняння початкової швидкості (якщо $[S]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \gg [E]_0$):

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0\left(1 + \frac{k_2}{k_3[M]_0}\right) + K_m^{EMS}\left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0}\right)} = \frac{\frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0}{k_3 [M]_0 + k_2} [S]_0}{[S]_0 + \frac{k_3 ([M]_0 + K_s^M)}{k_3 [M]_0 + k_2} K_m^{EMS}} = \frac{V^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (37)$$

де: $K_m^{EMS} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$; $K_s^M = \frac{k_{-3}}{k_3}$. У відповідності з запропонованими позначеннями

$$K_m^{app} = K_M^{app}, \quad K_m^{EMS} = K_{2dS}^{EMS}.$$

Співставивши два механізми (30) і (1) можна побачити, що в них немає жодної однакової стадії. Тому в результаті дослідження реакції, що відбувається у відповідності з механізмом (30), ми не зможемо розрахувати ні константи швидкості утворення ензим-субстратного комплексу ES з ензиму і субстрату (точніше, з вільних ензиму і субстрату), ні констант швидкості розпаду цього комплексу до ензиму і субстрату та до продукту, а, внаслідок цього, й істинну константу Міхаеліса у відповідності з рівнянням (8) (тобто K_{BH}). Незважаючи на це, кінетика досліджуваної реакції відповідає кінетиці Міхаеліса-Ментен і, як впливає з рівняння (37), для неї ми можемо розрахувати уявну константу Міхаеліса K_m^{app} .

Знаючи, що досліджувана реакція відбувається у відповідності з механізмом (30) і, одержавши для неї рівняння початкової швидкості (37), ми можемо розрахувати дві істинні константи: K_m^{EMS} і K_s^M . Константа K_m^{EMS} є істинною, тому що ми використали для описання експериментальних кінетичних даних рівняння, отримане на основі аналізу коректно встановленого механізму і виявили, що дана константа є функцією тільки констант швидкості елементарних стадій. Однак фізичний зміст істинної константи K_m^{EMS} відрізняється від фізичного змісту істинної константи Міхаеліса K_m , що впливає з моделі Міхаеліса-Ментен (K_{2dS}^{EMS} не є K_{BH}). Зокрема, в даному випадку субстрат зв'язується не безпосередньо з ензимом (вільним ензимом E), а з комплексом ензим-активатор EM .

Якщо розрахувати уявну константу Міхаеліса K_m^{app} для ензиматичної реакції з невідомим механізмом за рівнянням (14), то, як нам здається, у багатьох дослідників ця константа буде асоціюватися з утворенням-розпадом ензим-субстратного комплексу ES , хоча, як у випадку з реакцією, що відбувається у відповідності з механізмом (30), такий комплекс може взагалі не утворюватись і, відповідно, не розпадатись.

Звичайно, комплекс будь-якої складності можна назвати ензим-субстратним, оскільки в нього входять і ензим, і субстрат. Часто називають ензимом не тільки ензим у вільному (незв'язаному) стані, але також і протонований чи депротонований його форми, і навіть зв'язані з активаторами чи інгібіторами. Наприклад, часто використовують вираз: «присутствие ингибитора влечет за собой уменьшение сродства энзима к субстрату» [5]. Це означає, що спорідненість субстрату S до ензим-інгібіторного комплексу EI менша, ніж до вільного ензиму E (на наш погляд, в такому вигляді вираз більш точно передає зміст цитати).

Вважається, що комплекси субстрату з металами також іноді можуть виступати в якості субстрату, наприклад, показано, що комплекс АТР з магнієм ($MgATP$) є субстратом багатьох ензимів (гексокінази, піруваткарбоксилази, креатинкінази [29], Ca^{2+} -АТРози саркоплазматичного ретикулуму, Na^+ , K^+ -АТРози з різних джерел [30]). З такої точки зору можна розглядати, наприклад, в якості ензиму комплекс $EHCa$, утворений протонованою формою Ca^{2+} -АТРози (EH) з Ca^{2+} , а в якості субстрату – комплекс $MgATP$, утворений двічі депротонованою формою АТР (ATP^{2-}) з Mg^{2+} . Тоді утворений комплекс $EHCa-MgATP$ формально можна назвати ензим-субстратним, хоча, на нашу думку, це не зовсім правильно, тому що, хоча в даний комплекс і входять ензим і субстрат, однак вони не зв'язуються безпосередньо один з іншим. В будь-якому випадку, незалежно від термінології, дослідники повинні чітко уявляти, з чим вони мають справу.

Ми так докладно зупиняємось на відмінностях істинних і уявних констант Міхаеліса тому, що в літературі немає чіткого визначення істинної і уявної константи Міхаеліса, в більшості випадків неможливо зрозуміти про яку константу Міхаеліса йде мова (про істинну чи уявну), а недостатньо чітко розуміння різниці

між істинною і уявною константами Міхаеліса може привести до прийняття невірних рішень в плануванні експерименту, до неправильної інтерпретації одержаних результатів і помилкових висновків, про що й піде мова далі.

**1.5. Чи виконується рівняння $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$
для ензиматичних реакцій з участю активаторів?**

Схоже, що джерелом плутанини є уявлення, що механізм будь-якої реакції, яка підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен, формально можна описувати схемою (17) [20], з якої аналогічно підходу Бріггса-Холдейна [2] можна отримати рівняння (14) в якому уявна константа Міхаеліса виражається наступним чином [20, 21]:

$$K_m^{app} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1} \quad (38)$$

Ми бачимо, що рівняння (38) аналогічне рівнянням (8) і (10), за виключенням того, що замість істинної константи k_2 воно включає уявну константу швидкості k_{cat} розпаду комплексу ES . Складається враження, що саме в цій уявній константі швидкості і містяться всі відмінності реального механізму досліджуваної реакції від механізму Міхаеліса-Ментен (1). Тобто всі стадії, за якими ензим-субстратний комплекс розпадається до продуктів, формально показуються однією стадією, що характеризується константою швидкості k_{cat} , яка, в свою чергу, є функцією констант швидкості пропущених стадій і, часто, концентрацій проміжних комплексів та інших учасників реакції. Таким чином складається враження, що для всіх реакцій, що підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен, за рівнянням (38) можна розрахувати константу Міхаеліса, а рівняння (8) є окремим випадком більш загального рівняння (38).

Хоча логіка такого розгляду здається вірною, проте, знаючи природу уявних констант, можна піддати сумніву справедливість рівняння (38). Перший сумнів з'являється при погляді на рівняння (14), а ще краще, на рівняння (11): воно не дає

жодних підстав очікувати, що константи c і d можуть бути пов'язані якою-небудь функціональною залежністю. Більше того, рівняння (13) дає нам всі підстави стверджувати, що такої залежності немає, оскільки важко знайти взаємозв'язок між кількістю молей розчиненої речовини n_2 і тиском розчинника над чистим розчинником p_0 .

Другий сумнів з'являється під час аналізу схеми (17).

По-перше, як було показано вище, можуть існувати механізми, в рамках яких ензим-субстратний комплекс ES не утворюється (як, наприклад, у випадку механізму (30)), а кінетика описується рівнянням (14): в такому випадку незрозумілий зміст всіх констант, що входять у рівняння (38).

По-друге, навіть якщо комплекс ES утворюється, які стадії, що ведуть до його розпаду до продуктів, можуть бути об'єднані уявною константою k_{cat} ? Формально – будь-які. Але тоді можна використовувати схему (17) для описання більшості реакцій, навіть таких, які не підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен (як, наприклад, зробив Ченс [31]). Зрозуміло, що це неправильно. Навіть якщо ми будемо використовувати схему (17) для описання реакцій, що підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен, таких, наприклад, які потребують для перебігу активатора, то постає питання: чи буде швидкість реакції визначатись концентрацією ензим-субстратного комплексу ES , якщо реакція відбувається з утворенням потрібного ензим-активатор-субстратного комплексу?

Як ми можемо бачити, важко дати однозначні відповіді, виходячи тільки з логіки, а тому спробуємо перевірити справедливість рівняння (38) для різних механізмів. Але, щоб ця перевірка не виглядала відірваним від життя дослідженням, зробимо її в рамках аналізу реальної експериментальної роботи, яка має безпосереднє відношення до проблеми, що розглядається нами.

В книзі Келеті [22, стор. 117-118] в розділі, присвяченому аналізу природи константи Міхаеліса в рівнянні Міхаеліса-Ментен, автор пише: «При изменении условий реакции значение K также может измениться. Так, например, в случае пероксидазы при высокой концентрации донора протонов эта константа является кинетической константой K_k , при уменьшении концентрации донора протонов

константа превращается в константу Михаэлиса K_m , а при очень низких уровнях донора протонов получаем константу диссоциации K_s ». Аналогічний приклад наведений також і в інших підручниках [4–5]. Ця інформація викликала зацікавлення, оскільки вона протирічить уявленням про властивості істинної константи Міхаеліса, що впливають з рівняння (8), а в даному розділі підручника автор, здається, веде мову саме про істинну константу Міхаеліса, яку він виражає саме у вигляді рівняння (8). Звернення до першоджерела [31] дозволило розібратись в цьому питанні і привести цей приклад, як зразок, щоб на конкретному дослідженні показати різницю між істинними та уявними константами і як недостатньо чітко розуміння різниці між ними може відбитись на результатах роботи.

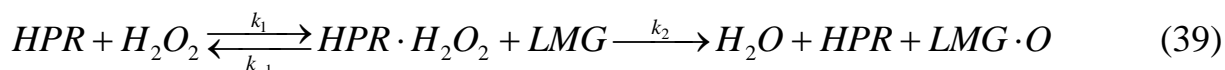
Метою дослідження, проведеного Ченсом [31], було: визначити константи швидкості, що складають константу Міхаеліса K_m , кожен окремо; використовуючи їх, за рівнянням (38) розрахувати величину K_m ; показати, що теорія Міхаеліса адекватно відображає механізм ензиматичної реакції.

Для дослідження була обрана реакція пероксидази (HPR) з пероксидом водню (H_2O_2) в присутності лейко-форми малахітового зеленого (LMG) як акцептора кисню (чи донора водню). Ця реакція дозволяє з допомогою оптичної спектроскопії одночасно реєструвати концентрацію ензим-субстратного комплексу ($HPR-H_2O_2$) і продукту реакції (малахітового зеленого). З цього боку вона була зручною, але з іншого боку її вибір важко назвати вдалим: ця ензиматична реакція не відпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен, а тому не може бути описана ні за допомогою рівняння (14), ні за допомогою рівнянь (6) та (7). В рекомендаціях Номенклатурного комітету Міжнародного союзу з біохімії і молекулярної біології [13] чітко визначено, що тільки реакція, кінетика якої описується рівнянням (14) (тобто реакція, початкова швидкість якої прагне до граничного максимального значення при безкінечному збільшенні концентрації субстрату), може називатись реакцією, що підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен. Більше того, рекомендується не використовувати термін «константа Міхаеліса» і символ K_m для реакцій, що не підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен. Пропонується використовувати символ $[S]_{0,5}$ для концентрації субстрату, при якій початкова

швидкість дорівнює половині максимальної швидкості (що визначається у точці, де вона досягає максимального значення v_{max}). Тому сьогодні константу Міхаеліса, значення якої розраховував Ченс для цієї реакції, константою Міхаеліса називати не можна: зараз це $[S]_{0,5}$ чи $[H_2O_2]_{0,5}$. Це зроблено правильно, тому що, зустрічаючи символи K_m і V , відразу уявляється кінетика, як кажуть, «з насиченням», а досить часто це зовсім не так.

В реакціях, що не підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен, часто початковий відрізок залежності швидкості від концентрації субстрату (до концентрації субстрату, після якої починається зниження швидкості) досить непогано описується рівнянням (14) і лінеаризується в координатах Лайнуївера-Берка, Едді-Хофсті та Хейнеса. Тому для описання такої «висхідної» частини графіка використовують модель Міхаеліса-Ментен і розраховують для неї константи K_m і V , які (у відповідності з моделлю) називають константою Міхаеліса і граничною швидкістю. Тепер ці параметри рекомендують позначати символами $[S]_{0,5}$ та v_{max} [13] і називати концентрацією субстрату, при якій початкова швидкість зменшується вдвоє у порівнянні з мексимальною, та максимальною швидкістю відповідно.

В статті [31] автор не приводить залежностей початкової швидкості від концентрації H_2O_2 в присутності лейко-форми малахітового зеленого, не приводить також повної схеми механізму досліджуваної реакції, тому із самої статті важко зрозуміти, чи підпорядковується досліджувана реакція кінетиці Міхаеліса-Ментен, чи ні. Спрощена схема механізму, за яким, як вважає автор, відбувається реакція



схожа на механізми (40) та (79), що будуть розглянуті нами в подальшому: така реакція повинна підпорядковуватись кінетиці Міхаеліса-Ментен [28] (тобто описуватись рівнянням (14)). В додатку ж, де представлені рівняння, використані для аналізу досліджуваної реакції, мова йде виключно про механізм Міхаеліса-Ментен в інтерпретації Бріггса-Холдейна (константа швидкості другої незворотної стадії позначена автором k_2 , але за змістом статті можна зрозуміти, що це уявна

константа k_{cat}) та про константу Міхаеліса у вигляді, репрезентованому рівнянням (38). Розраховані значення «константи Міхаеліса» (будемо використовувати лапки для позначення тієї константи, яку розраховував автор, щоб не плутати її з істинною константою Міхаеліса K_m та з уявною константою Міхаеліса K_m^{app} , що визначається за половиною граничної швидкості) автор порівнює зі значенням константи Міхаеліса, що наводиться в статті Манна [32]. Так ось, Манн представляє графік залежності початкової швидкості від концентрації H_2O_2 . Графік свідчить, що з підвищенням концентрації H_2O_2 початкова швидкість спочатку зростає, при концентрації біля $1 \cdot 10^{-4}$ М вона досягає максимального значення, а при подальшому збільшенні концентрації H_2O_2 – різко знижується практично до нуля. Поясненню цієї оборотної інактивації пероксидази й присвячена більша частина роботи Манна. З наведеного графіку залежності початкової швидкості від концентрації H_2O_2 Манн визначив значення константи Міхаеліса (уявної) за концентрацією субстрату, при якій максимальна швидкість зменшилась вдвічі (тобто за сучасною термінологією це $[H_2O_2]_{0,5}$).

Ні у Ченса, ні у Манна не приведена залежність початкової швидкості від концентрації LMG, але Манн наводить графік залежності швидкості від концентрації іншого субстрата-відновника – гваякола. На цьому графіку також видно зниження початкової швидкості при великих концентраціях гваякола. Можна припустити, що й для малахітового зеленого може бути характерною така залежність.

З цих даних можна зробити висновок, що кінетика досліджуваної Ченсом реакції не може бути описана моделлю Міхаеліса-Ментен, а відповідно, й рівнянням (14), оскільки її початкова швидкість зі збільшенням концентрації субстрату (а, можливо, і активатора) спочатку зростає, а потім знижується практично до нуля.

Незважаючи на це, Ченс застосовує для описання цієї реакції саме модель Міхаеліса-Ментен. Схоже, що на питання про те, які стадії, що ведуть до розпаду комплексу ES до продуктів, можуть бути об'єднані уявною константою швидкості k_{cat} (яка у Ченса позначена, як k_2), Ченс відповів однозначно – будь-які. Навіть, якщо

вони є складовою частиною механізму, що не підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен.

Можливість утворення потрійного комплексу Ченс також не розглядає, а тому вважає, що швидкість реакції пропорційна концентрації ензим-субстратного комплексу ES . Сьогодні вважається, що механізм двохсубстратних реакцій включає утворення потрійних комплексів [7, 22], а тому швидкість реакції пропорційна концентрації цього комплексу, а не ензим-субстратного комплексу ES . Узагальнена кінетична схема Боттса-Моралеса [33], що описує механізм дії оборотних ефекторів на ензиматичний процес, також передбачає утворення потрійного комплексу, який разом з ензим-субстратним комплексом також може перетворюватись на продукт. Наскільки це може мати вплив на результати розрахунків константи Міхаеліса, ми побачимо далі, а тут хотілось би відзначити, що при дослідженні реакцій з невідомим механізмом для отримання об'єктивної картини процесу необхідно аналізувати декілька можливих механізмів.

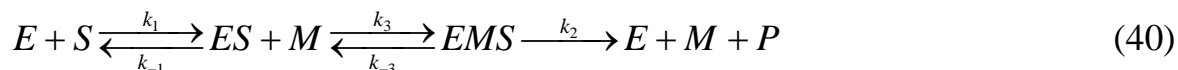
Реакції з участю активаторів, що показують кінетику з гальмуванням по субстрату і по активатору, повинні мати більш складний механізм, ніж розглядається Ченсом (як, наприклад, показано у статті [28]), і рівняння, наведені в додатку мають бути іншими. Зокрема, якщо в реакції утворюється потрійний комплекс ензим-активатор-субстрат, в результаті розпаду якого утворюються продукти, то для описання такої реакції недостатньо двох диференційних рівнянь, і швидкість такої реакції буде визначатись концентрацією потрійного комплексу, а не ензим-субстратного комплексу ES .

Незважаючи на це, Ченс розраховує «константу розпаду ензим-субстратного комплексу» виходячи з рівнянь, що описують модель Міхаеліса-Ментен. Отримана таким чином константа є уявною, яку сьогодні позначають як k_{cat} (доказом того, що вона уявна, є її залежність від концентрації малахітового зеленого). В подальшому він використовує її значення для того, щоб розрахувати «константу Міхаеліса», застосовуючи рівняння (38) для одного конкретного значення концентрації малахітового зеленого. Отримане значення «константи Міхаеліса» виходить в 10 разів менше, ніж значення уявної константи Міхаеліса у Манна ($[H_2O_2]_{0,5}$), але при

концентрації малахітового зеленого в 10 разів нижчій, ніж у Манна. А оскільки величина константи Міхаеліса, у відповідності з уявленням Ченса, пропорційна концентрації малахітового зеленого, автор вважає, що його результати співпадають з результатами Манна.

Проаналізуємо справедливість підходу Ченса до вивчення ензиматичних реакцій з участю активаторів і спочатку розглянемо можливість використання рівняння (38) для розрахунку уявних констант Міхаеліса, а потім і уявлення про те, що величина константи Міхаеліса має змінюватись пропорційно концентрації активатора. При цьому будемо розглядати тільки ті механізми, які сприяють тому, щоб кінетика реакцій підпорядковувалась рівнянню Міхаеліса-Ментен (14), і для яких в квазістаціонарному наближенні можна вивести рівняння, що виражають початкову швидкість реакції через концентрації субстрату й активатора.

Почнемо аналіз з механізму, в рамках якого ензим і субстрат утворюють комплекс ES , який сам не здатен безпосередньо розпадатись з утворенням продукту, але в присутності активатора утворює з ним потрібний ензим-активатор-субстратний комплекс EMS , з якого вже може утворюватись продукт:



Реакції, що відбуваються у відповідності з механізмом (40), описуються наступною системою рівнянь:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_2[EMS] \quad (41)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (42)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_3[ES][M] + k_{-3}[EMS] \quad (43)$$

$$\frac{d[EMS]}{dt} = k_3[ES][M] - k_{-3}[EMS] - k_2[EMS] \quad (44)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_3[ES][M] + k_{-3}[EMS] + k_2[EMS] \quad (45)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EMS] \quad (46)$$

В умовах, коли $[S]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \gg [E]_0$, застосування квазістаціонарного наближення дозволяє отримати рівняння початкової швидкості:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 \left(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}\right) + K_m^{EMS} \frac{K_s}{[M]_0} + \frac{k_2}{k_1}} = \frac{\frac{k_2[E]_0[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} [S]_0}{[S]_0 + \frac{K_s K_m^{EMS} + \frac{k_2}{k_1} [M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (47)$$

де: $K_m^{EMS} = \frac{k_{-3} + k_2}{k_3}$; $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$.

Зробимо так, як Ченс, тобто, додамо K_s до $\frac{k_{cat}}{k_1}$ (у відповідності до рівняння (38)) і перевіримо, чи отримаємо при цьому значення уявної константи Міхаеліса K_m^{app} :

$$\begin{aligned} K_m^{sum} &= \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2[M]_0}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} = \\ &= \frac{k_{-1}([M]_0 + K_m^{EMS}) + k_2[M]_0}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} = \frac{K_s K_m^{EMS} + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} [M]_0}{([M]_0 + K_m^{EMS})} \end{aligned} \quad (48)$$

Порівнюючи результати розрахунку K_m^{sum} з виразом для K_m^{app} , можемо бачити, що в результаті додавання K_s і $\frac{k_{cat}}{k_1}$, ми не отримали величину уявної константи Міхаеліса:

$$K_m^{sum} = K_m^{app} + \frac{K_s [M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} = K_m^{app} + \frac{k_{cat}}{k_1} \left(\frac{k_{-1}}{k_2} \right) = K_m^{app} + K^o \quad (49)$$

З рівняння (48) видно, що ці константи можуть бути близькими за величиною у випадку, якщо виконується хоча б одна з умов: $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ або $k_{-1} \ll k_2$.

Уявну константу Міхаеліса з рівняння (47) також можна виразити через субстратну константу K_s та k_{cat} :

(50)

З даного виразу також видно, що значення K_m^{app} може бути практично рівним сумі $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ при умові, що $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$. Крім того, з рівняння (49) випливає, що константа K_m^{sum} , що є сумою K_s та $\frac{k_{cat}}{k_1}$, завжди більша, ніж K_m^{app} .

Рівняння (50) може бути представлено також в іншому вигляді:

$$K_m^{app} = K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} + \frac{k_{cat}}{k_1} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} \right] \quad (51)$$

Аналогічно можна записати й рівняння (48):

$$K_m^{sum} = K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} + \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) = K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \left(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} \right) + \frac{k_{cat}}{k_1} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{k_{-1}}{k_2} + \frac{k_{-1}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} \right] \quad (52)$$

Порівнюючи одержані рівняння можна побачити, що справді, в загальному випадку $K_m^{sum} > K_m^{app}$, оскільки в рівнянні (52) в квадратних дужках є доданок $\left(\frac{k_{-1}}{k_2} \right)$, якого немає в рівнянні (51). Тому величини констант K_m^{sum} та K_m^{app} можуть бути досить близькими лише тоді, коли внесок цього доданку в K_m^{sum} є набагато меншим, ніж інших (наприклад, при $\frac{k_{-1}}{k_2} \ll 1$, тобто, при $k_{-1} \ll k_2$).

З іншого боку, з рівняння (51) випливає, що значення K_m^{app} може бути близьким до суми $\left(K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}\right)$ тоді, коли $k_{cat} = \frac{k_2[M]_0}{K_m^{EMS}}$ (тобто $\frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} = 1$), а ця умова тим точніше виконується, чим більше K_m^{EMS} перевищує $[M]_0$.

Внесок K_m^{app} в K_m^{sum} можна визначити, якщо поділити K_m^{app} на K^o :

$$\frac{K_m^{app}}{K^o} = \frac{\left(K_s K_m^{EMS} + \frac{k_2}{k_1} [M]_0\right) ([M]_0 + K_m^{EMS})}{([M]_0 + K_m^{EMS}) K_s [M]_0} = \frac{K_s K_m^{EMS} + \frac{k_2}{k_1} [M]_0}{K_s [M]_0} = \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} + \frac{k_2}{k_1} \quad (53)$$

Оцінимо також внески $k_{cat}^D = \frac{k_{cat}}{k_1}$ та $K_s^D = K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$ у величину K_m^{app}

(рівняння (51)):

$$\frac{K_s^D}{k_{cat}^D} = \frac{K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}}{\frac{k_{cat}}{k_1}} = \frac{k_{-1} K_m^{EMS}}{k_2 [M]_0} \quad (54)$$

Аналіз останніх двох рівнянь приводить до наступних висновків:

1. якщо не виконується хоча б одна з умов $K_m^{EMS} \gg [M]_0$, або $k_2 \gg k_{-1}$, $K_m^{sum} \neq K_m^{app}$ і рівняння (38) не виконується;

2. в умовах, коли $K_m^{EMS} \gg [M]_0$, внеском K^o можна знехтувати і вважати, що значення K_m^{sum} та K_m^{app} практично співпадають, при цьому, якщо $k_{-1} > k_2$ (або навіть

$k_{-1} < k_2$, але співвідношення $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$ перевищує $\frac{k_2}{k_{-1}}$ на 2–3 порядки і більше), то K_m^{app}

близький за величиною до K_s (тобто внеском k_{cat}^D в K_m^{app} практично можна знехтувати);

3. в умовах, коли $k_2 \gg k_{-1}$, внеском K^o також можна знехтувати і вважати, що значення K_m^{sum} та K_m^{app} практично співпадають, при цьому, якщо $[M]_0 > K_m^{EMS}$ (або навіть $[M]_0 < K_m^{EMS}$, але співвідношення $\frac{k_2}{k_{-1}}$ перевищує $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$ на 2–3 порядки і більше), то величина K_m^{app} є близькою за своїм значенням до $\frac{k_{cat}}{k_1}$ (тобто внеском K_s^D в K_m^{app} практично можна знехтувати).

Підкреслимо, що при виконанні умов $K_m^{EMS} \gg [M]_0$ і $k_{-1}K_m^{EMS} \gg k_2[M]_0$, або $k_2 \gg k_{-1}$ і $k_{-1}K_m^{EMS} \ll k_2[M]_0$, значення K_m^{app} та суми $\left(K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}\right)$ практично співпадають, незважаючи на те, що при цьому одним з доданків (K_s або $\frac{k_{cat}}{k_1}$) можна знехтувати. Проте так буває не завжди. Наприклад, в умовах, коли $k_2 = k_{-1}$, K_m^{app} перетворюється на K_s , але при цьому $K_m^{app} \neq K_m^{sum}$. В даному випадку уявна константа Міхаеліса K_m^{app} не може бути виражена, як сума $\left(K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}\right)$, в якій доданком $\frac{k_{cat}}{k_1}$ можна знехтувати. Тому при $k_2 = k_{-1}$ рівняння (38) не виконується.

Таким чином, для реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом (40), залежність уявної константи Міхаеліса від K_s і k_{cat} виражається не рівнянням (38), а рівняннями (50), або (51), а в результаті додавання K_s та $\frac{k_{cat}}{k_1}$ отримуємо не уявну константу Міхаеліса K_m^{app} , а константу, яка виражається рівняннями (49), або (52).

Для перевірки одержаних закономірностей будемо порівнювати результати, отримані в аналітичному вигляді при аналізі алгебраїчних рівнянь, з результатами кінетичних розрахунків, що імітують реальний експеримент. Такі розрахунки проведемо для реакцій, що протікають у відповідності з досліджуваними механізмами, розв'язуючи відповідну систему диференціальних рівнянь методом Рунге-Кутта-Ністрема, для отримання залежності зростання концентрації продукта

реакції від часу. Ці залежності необхідні для розрахунку початкових швидкостей реакцій, за допомогою яких розраховуються кінетичні константи V_m^{app} , k_{cat} та K_m^{app}

(методом лінеаризації у координатах $\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$). Розрахунки були проведені з

додержанням умов $[S]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \gg [E]_0$, при цьому співвідношення $\frac{[S]_0}{[E]_0}$ і

$\frac{[M]_0}{[E]_0}$ підтримували, як правило, більшими за $1 \cdot 10^4$. Параметри реакцій, для яких

були проведені такі розрахунки, наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Константи швидкості (k_1 , k_{-1} , k_3 , k_{-3} , k_4 , k_{-4} , k_2), загальна концентрація ензиму $[E]_0$ і діапазони концентрацій субстрату $[S]_0$ й активатора $[M]_0$, використані для розрахунку кінетики утворення продукту в семи реакціях (№ 1–7), що протікають за механізмом (40), в семи реакціях № 8–14, що протікають за механізмом (55), й шістнадцяти реакціях (№ 15–30), що протікають за механізмом (30).

Кінетичні параметри реакцій, що протікають за механізмом (40)								
№	$k_1, M^{-1}xv^{-1}$	k_{-1}, xv^{-1}	$k_3, M^{-1}xv^{-1}$	k_{-3}, xv^{-1}	k_2, xv^{-1}	$[E]_0, M$	$[S]_0, M$	$[M]_0, M$
1.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
2.	$1 \cdot 10^4$	1	$1 \cdot 10^9$	100	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
3.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^9$	10	5	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
4.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	100	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
5.	$1 \cdot 10^3$	1	$1 \cdot 10^5$	100	1	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$
6.	$1 \cdot 10^4$	10	$1 \cdot 10^6$	1	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
7.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$

Продовження таблиці 1.

Кінетичні параметри реакцій, що протікають за механізмом (55) ($[E]_0 = 1 \cdot 10^{-9}$ М)									
№	$k_1, \text{М}^{-1}\text{хв}^{-1}$	$k_{-1}, \text{хв}^{-1}$	$k_3, \text{М}^{-1}\text{хв}^{-1}$	$k_{-3}, \text{хв}^{-1}$	$k_4, \text{М}^{-1}\text{хв}^{-1}$	$k_{-4}, \text{хв}^{-1}$	$k_2, \text{хв}^{-1}$	$[S]_0, \text{М}$	$[M]_0, \text{М}$
8.	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	12	10	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
9.	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^6$	20	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	10	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
10.	$1 \cdot 10^2$	1	10	5	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	1	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
11.	$1 \cdot 10^3$	1	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^7$	1	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
12.	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^7$	10	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	10	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
13.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	20	$5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$
14.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^7$	1	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$
Кінетичні параметри реакцій, що протікають за механізмом (30)									
№	$k_1, \text{М}^{-1}\text{хв}^{-1}$	$k_{-1}, \text{хв}^{-1}$	$k_3, \text{М}^{-1}\text{хв}^{-1}$	$k_{-3}, \text{хв}^{-1}$	$k_2, \text{хв}^{-1}$	$[E]_0, \text{М}$	$[S]_0, \text{М}$	$[M]_0, \text{М}$	
15.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$6,25 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
16.	$3 \cdot 10^4$	1	$1 \cdot 10^5$	1	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
17.	$5 \cdot 10^4$	1	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
18.	$5 \cdot 10^4$	3	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
19.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	10	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
20.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
21.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^{-3}$	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
22.	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^7$	1	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
23.	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
24.	1	1	$1 \cdot 10^2$	10	10	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
25.	$2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^2$	10^3	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
26.	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^7$	5	5	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
27.	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
28.	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^4$	5	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^0$	
29.	$4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	
30.	$1,28 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-1}$	

В табл. 2 приведені значення кінетичних параметрів, розрахованих в результаті чисельного рішення системи диференціальних рівнянь (41) – (46) (параметри з індексом *) та розрахованих за рівняннями (47), (48) та (49).

Таблиця 2. Розраховані значення констант для реакцій № 1–5 (що відбуваються у відповідності до механізму (40) і параметри яких наведені в табл. 1) при різних концентраціях активатора $[M]_0$: константи $^*k_{cat}$, $^*K_m^{app}$, $^*K^o$, $^*K_m^{sum}$ отримані в результаті чисельного рішення системи диференціальних рівнянь (41)–(46) методом Рунге-Кутта-Ністрема (значення $^*k_{cat}$ і $^*K_m^{app}$ розраховані за допомогою лінеаризації рівняння (47) в координатах Хейнеса $\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$, значення $^*K_m^{sum}$ розраховані як сума $\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{^*k_{cat}}{k_1}$, а значення $^*K^o$ розраховане як різниця $^*K_m^{sum} - ^*K_m^{app}$); константи k_{cat} і K_m^{app} розраховані за рівнянням (47), константа K_m^{sum} – за рівнянням (48), а константа K^o – за рівнянням (49).

№	$[M]_0, M$	$^*k_{cat}, xB^{-1}$	$^*K_m^{app}, M$	$^*K^o, M$	$^*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, xB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
1.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,100	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,10010^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,100	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	1,000	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$9,999 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	1,000	$9,999 \cdot 10^{-2}$	$9,999 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9,990	$9,991 \cdot 10^{-2}$	$9,990 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	9,990	$9,991 \cdot 10^{-2}$	$9,990 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	99,01	$9,911 \cdot 10^{-2}$	$9,901 \cdot 10^{-4}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$	99,01	$9,911 \cdot 10^{-2}$	$9,901 \cdot 10^{-4}$	$1,001 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$^*k_{cat}, xB^{-1}$	$^*K_m^{app}, M$	$^*K^o, M$	$^*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, xB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
2.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	4975	$4,976 \cdot 10^{-1}$	$2,537 \cdot 10^{-5}$	$4,976 \cdot 10^{-1}$	4975	$4,976 \cdot 10^{-1}$	$4,975 \cdot 10^{-5}$	$4,976 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9083	$9,083 \cdot 10^{-1}$	$4,550 \cdot 10^{-5}$	$9,084 \cdot 10^{-1}$	9083	$9,083 \cdot 10^{-1}$	$9,083 \cdot 10^{-5}$	$9,084 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9900	$9,901 \cdot 10^{-1}$	$5,050 \cdot 10^{-5}$	$9,901 \cdot 10^{-1}$	9900	$9,900 \cdot 10^{-1}$	$9,900 \cdot 10^{-5}$	$9,901 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9990	$9,991 \cdot 10^{-1}$	$5,005 \cdot 10^{-5}$	$9,991 \cdot 10^{-1}$	9990	$9,990 \cdot 10^{-1}$	$9,990 \cdot 10^{-5}$	$9,991 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$^*k_{cat}, xB^{-1}$	$^*K_m^{app}, M$	$^*K^o, M$	$^*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, xB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
3.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	4,993	$6,519 \cdot 10^{-6}$	$9,985 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	4,993	$6,490 \cdot 10^{-6}$	$9,985 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	4,999	$5,168 \cdot 10^{-6}$	$9,998 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	4,999	$5,149 \cdot 10^{-6}$	$9,999 \cdot 10^{-4}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,000	$5,030 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	5,000	$5,015 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	5,000	$5,029 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$	5,000	$5,001 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$1,005 \cdot 10^{-3}$

Продовження таблиці 2.

N_0	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat} \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
4.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,090	$9,910 \cdot 10^{-2}$	$9,010 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,090	$9,910 \cdot 10^{-2}$	$9,009 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,833	$9,167 \cdot 10^{-2}$	$8,333 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,833	$9,167 \cdot 10^{-2}$	$8,333 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,762	$5,239 \cdot 10^{-2}$	$4,762 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	4,762	$5,239 \cdot 10^{-2}$	$4,762 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9,009	$9,919 \cdot 10^{-3}$	$9,009 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	9,009	$9,919 \cdot 10^{-3}$	$9,009 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,891	$1,098 \cdot 10^{-3}$	$9,891 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	9,891	$1,098 \cdot 10^{-3}$	$9,891 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
N_0	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat} \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
5.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$9,80 \cdot 10^{-3}$	$1,001 \cdot 10^{-3}$	$8,490 \cdot 10^{-6}$	$1,010 \cdot 10^{-3}$	$9,80 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,804 \cdot 10^{-6}$	$1,010 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$9,01 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-3}$	$8,959 \cdot 10^{-5}$	$1,090 \cdot 10^{-3}$	$9,01 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,009 \cdot 10^{-5}$	$1,090 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$4,98 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,970 \cdot 10^{-4}$	$1,498 \cdot 10^{-3}$	$4,98 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$4,975 \cdot 10^{-4}$	$1,498 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$9,08 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,078 \cdot 10^{-4}$	$1,908 \cdot 10^{-3}$	$9,08 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,083 \cdot 10^{-4}$	$1,908 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$9,90 \cdot 10^{-1}$	$1,001 \cdot 10^{-3}$	$9,895 \cdot 10^{-4}$	$1,990 \cdot 10^{-3}$	$9,90 \cdot 10^{-1}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,900 \cdot 10^{-4}$	$1,990 \cdot 10^{-3}$

З табл. 2 видно, що в умовах, коли $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (при $[M]_0 = 0,01 \text{ мМ}$ та $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} = 10^5$, реакція 1), значення K_m^{app} і K_m^{sum} практично співпадають, внаслідок того,

що величина K^o значно менша, ніж K_m^{app} , а значення K_m^{app} практично співпадає з K_s

(бо в даних умовах $\frac{k_{-1}K_m^{EMS}}{k_2[M]_0} = 10^6$). Помітно також, що при $[M]_0 = 0,01 \text{ М}$

значення K_m^{app} і K_m^{sum} дещо відрізняються (оскільки K_m^{EMS} перевищує $[M]_0$ лише в 100

разів), як і K_m^{app} та K_s (бо величина співвідношення $\frac{k_{-1}K_m^{EMS}}{k_2[M]_0}$ складає лише 10^3).

Співпадіння K_m^{app} і K_m^{sum} показане на прикладі реакції 2, в умовах, коли $k_{-1} \ll k_2$ ($\frac{k_2}{k_{-1}} = 10^4$). В цьому випадку величина K^o також значно менша, ніж

K_m^{app} (на 4 порядки), а K_m^{app} практично не відрізняється за величиною від $\frac{k_{cat}}{k_1}$ (бо

$$\frac{k_{-1}K_m^{EMS}}{k_2[M]_0} < 10^{-4}).$$

Коли умови $K_m^{EMS} \gg [M]_0$ і $k_2 \gg k_{-1}$ не виконуються (наприклад, $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} < 1,5 \cdot 10^{-3}$, а $\frac{k_2}{k_{-1}} = 0,005$, реакція 3), K^o значно перевищує K_m^{app} . В таких випадках особливо чітко видно, наскільки можуть відрізнятися значення K_m^{app} і K_m^{sum} . Для реакції 3 константа K_m^{sum} приблизно в 200 разів більша, ніж K_m^{app} .

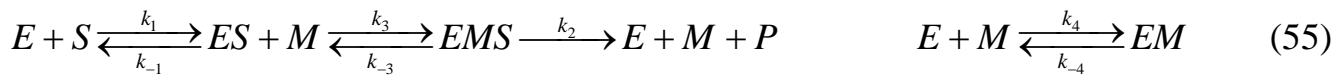
Наведемо ще один приклад, де значення K_m^{app} і K^o змінюються приблизно в однакових межах (реакція 4). При цьому в області малих концентрацій активатора K_m^{app} перевищує K^o приблизно на два порядки, а в області високих концентрацій активатора, навпаки, K^o перевищує K_m^{app} приблизно на два порядки. Сума ж цих величин у всьому діапазоні концентрацій активатора залишається незмінною величиною, рівною 0,1 М.

Можна помітити, що для реакцій 3 та 4, в яких $k_{-1} \gg k_2$, у відповідності до рівняння (48) K_m^{sum} і K_s практично рівні за величиною.

В реакції 5 виконується умова $k_{-1} = k_2$, при дотриманні якої $K_m^{app} = K_s$, але при цьому $K_m^{app} \neq K_m^{sum}$.

Таким чином, видно, що в загальному випадку рівняння (38) не може бути використане для розрахунку уявних констант Міхаеліса при дослідженні реакцій, що протікають за механізмом (40). Як випливає з рівняння (49), розраховане значення K_m^{sum} виходить більшим (іноді, як для реакцій 3 і 4, значно), ніж K_m^{app} , але при певних співвідношеннях кінетичних параметрів значення цих констант можуть бути близькими. Відзначимо також, що уявна константа k_{cat} також може значно відрізнятися за величиною від істинної константи k_2 (ці константи можуть співпадати тільки при досить високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$), наприклад, для реакції 1 при $[M]_0 = 0,01$ мМ константа k_{cat} на 5 порядків менша за k_2 .

Якщо одночасно з протіканням реакції за механізмом (40) утворюється неактивний комплекс активатора з ензимом EM



то для такої реагуючої системи можна записати наступну систему рівнянь:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] - k_4[E][M] + k_{-4}[EM] + k_2[EMS] \quad (56)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (57)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_3[ES][M] + k_{-3}[EMS] \quad (58)$$

$$\frac{d[EMS]}{dt} = k_3[ES][M] - k_{-3}[EMS] - k_2[EMS] \quad (59)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_3[ES][M] + k_{-3}[EMS] - k_4[E][M] + k_{-4}[EM] + k_2[EMS] \quad (60)$$

$$\frac{d[EM]}{dt} = k_4[E][M] - k_{-4}[EM] \quad (61)$$

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EMS] \quad (62)$$

В квазістаціонарному наближенні (в умовах, коли $[S]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \gg [E]_0$) для такого механізму можна вивести рівняння початкової швидкості:

$$\begin{aligned} v_0 &= \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 \left(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}\right) + (K_m^{EMS} K_s + \frac{k_2}{k_1}[M]_0) \left(\frac{1}{[M]_0} + \frac{1}{K_s^{EM}}\right)} = \\ &= \frac{\frac{k_2[E]_0[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}} [S]_0}{[S]_0 + \frac{((M]_0 + K_s^{EM})(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0)}{k_1 K_s^{EM} ([M]_0 + K_m^{EMS})}} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \end{aligned} \quad (63)$$

$$\text{де: } K_m^{EMS} = \frac{k_{-3} + k_2}{k_3}; K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}; K_s^{EM} = \frac{k_{-4}}{k_4}.$$

Для цієї реакції також в результаті додавання K_s і $\frac{k_{cat}}{k_1}$ ми не отримуємо

величину уявної константи Міхаеліса K_m^{app} :

$$K_m^{sum} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2[M]_0}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} = \frac{K_s K_m^{EMS} + \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} [M]_0}{([M]_0 + K_m^{EMS})} \quad (64)$$

Запишемо рівняння (64) в іншому вигляді, як суму $K_m^{app} + K^\circ$:

$$K_m^{sum} = \frac{(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0) + \frac{[M]_0(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0)}{K_s^{EM}}}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})} + \frac{[M]_0 \left\{ K_s - \frac{(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0)}{k_1 K_s^{EM}} \right\}}{([M]_0 + K_m^{EMS})} \quad (65)$$

З рівняння (65) випливає, що величина K_m^{sum} може точно співпадати з K_m^{app} лише у випадку, коли $k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0 = k_{-1}K_s^{EM}$, тобто, коли можна підібрати таку початкову концентрацію активатора, при якій виконується рівність

$$[M]_0 = \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS}) \quad (66)$$

Підкреслимо, що для реакцій, які протікають за механізмом (55), рівняння (38) може виконуватись точно, але лише при певній концентрації активатора, що визначається рівнянням (66). Як видно з даного рівняння, в умовах, коли $K_s^{EM} \leq K_m^{EMS}$, уявна константа Міхаеліса K_m^{app} не може бути виражена, як сума

$$K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}.$$

Існують також умови, при яких величина K^o буде настільки незначною, що нею практично можна знехтувати: якщо $[M]_0 \ll K_s^{EM}$, тоді $K_m^{app} = \frac{(k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0)}{k_1([M]_0 + K_m^{EMS})}$

і значення K_m^{sum} та K_m^{app} стають досить близькими при $k_{-1} \ll k_2$ (див. рівняння (64)),

або при $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (коли $K_m^{app} = K_s + \frac{k_2[M]_0}{k_1K_m^{EMS}}$ та $k_{cat} = \frac{k_2[M]_0}{K_m^{EMS}}$).

В табл. 3 приведені значення кінетичних параметрів, розрахованих в результаті чисельного рішення системи диференціальних рівнянь (56)–(62) (параметри з індексом *) та розрахованих за рівняннями (63), (64) та (65) при різних початкових концентраціях активатора $[M]_0$.

Константи швидкості реакції 8 (табл. 3) мають такі значення, що рівняння (66) виконується, коли $[M]_0 = 1$ мМ. Як видно при такій концентрації активатора $K_m^{sum} = K_m^{app}$, як це витікає з рівняння (65). У випадку реакції 9 одночасно виконуються умови $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $k_{-1} \ll k_2$, тому при низьких концентраціях активатора (менших, ніж 1 мМ, коли $[M]_0$ в 1000 разів менша від K_s^{EM}) K_m^{sum} та K_m^{app} виявляються практично рівними за величиною (як і для реакції 10, де одночасно виконуються умови $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$). Якщо ж виконується лише одна з умов, величини цих констант не співпадають (реакції 11 і 12). В реакції 11 виконується лише умова $k_{-1} \ll k_2$ (як в дослідженні Ченса), при цьому $K_m^{sum} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1}$ відрізняється від уявної константи Міхаеліса K_m^{app} на 5 порядків (при концентрації активатора 10 мМ). Коли $k_{-1} \gg k_2$, як у випадку реакції 12, у відповідності до рівняння (64) K_m^{sum} близька за величиною до K_s .

Таблиця 3. Розраховані значення констант для реакцій № 8–13 (що відбуваються у відповідності до механізму (55) і параметри яких наведені в табл. 1) при різних концентраціях активатора $[M]_0$: константи $*k_{cat}$, $*K_m^{app}$, $*K^o$, $*K_m^{sum}$ отримані в результаті чисельного рішення системи диференціальних рівнянь (56)–(62) методом

Рунге-Кутта-Ністрема (значення $*k_{cat}$ і $*K_m^{app}$ розраховані за допомогою лінеаризації рівняння (63) в координатах Хейнеса $\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$, значення $*K_m^{sum}$ розраховані як сума $\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{*k_{cat}}{k_1}$, а значення $*K^o$ розраховане як різниця $*K_m^{sum} - *K_m^{app}$); константи k_{cat} і K_m^{app} розраховані за рівнянням (63), константа K_m^{sum} – за рівнянням (64), а константа K^o – за рівнянням (65)).

№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
8.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$9,009 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$7,387 \cdot 10^{-6}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$	$9,009 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$7,432 \cdot 10^{-6}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$8,333 \cdot 10^{-1}$	$1,002 \cdot 10^{-2}$	$6,250 \cdot 10^{-5}$	$1,008 \cdot 10^{-2}$	$8,333 \cdot 10^{-1}$	$1,002 \cdot 10^{-2}$	$6,250 \cdot 10^{-5}$	$1,008 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4,762	$1,048 \cdot 10^{-2}$	0	$1,048 \cdot 10^{-2}$	4,762	$1,048 \cdot 10^{-2}$	0	$1,048 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9,009	$1,766 \cdot 10^{-2}$	$-6,757 \cdot 10^{-3}$	$1,090 \cdot 10^{-2}$	9,009	$1,766 \cdot 10^{-2}$	$-6,757 \cdot 10^{-3}$	$1,090 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,891	$9,259 \cdot 10^{-2}$	$-8,160 \cdot 10^{-2}$	$1,099 \cdot 10^{-2}$	9,891	$9,259 \cdot 10^{-2}$	$-8,160 \cdot 10^{-2}$	$1,099 \cdot 10^{-2}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
9.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	5,000	$5,000 \cdot 10^{-2}$	$4,500 \cdot 10^{-6}$	$5,001 \cdot 10^{-2}$	5,000	$5,001 \cdot 10^{-2}$	$4,500 \cdot 10^{-6}$	$5,001 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,091	$9,092 \cdot 10^{-2}$	0	$9,092 \cdot 10^{-2}$	9,091	$9,092 \cdot 10^{-2}$	$-9,091 \cdot 10^{-11}$	$9,092 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9,901	$9,911 \cdot 10^{-2}$	$-8,901 \cdot 10^{-5}$	$9,902 \cdot 10^{-2}$	9,901	$9,911 \cdot 10^{-2}$	$-8,911 \cdot 10^{-5}$	$9,902 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9,990	$1,009 \cdot 10^{-1}$	$-9,890 \cdot 10^{-4}$	$9,991 \cdot 10^{-2}$	9,990	$1,009 \cdot 10^{-1}$	$-9,890 \cdot 10^{-4}$	$9,991 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,999	$1,100 \cdot 10^{-1}$	$-9,989 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	9,999	$1,100 \cdot 10^{-1}$	$-9,989 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
10.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,668 \cdot 10^{-5}$	$1,006 \cdot 10^{-2}$	$-6,221 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$1,667 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$6,666 \cdot 10^{-8}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,668 \cdot 10^{-4}$	$1,006 \cdot 10^{-2}$	$-6,172 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$1,666 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	$6,664 \cdot 10^{-7}$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,665 \cdot 10^{-3}$	$1,007 \cdot 10^{-2}$	$-5,571 \cdot 10^{-5}$	$1,002 \cdot 10^{-2}$	$1,665 \cdot 10^{-3}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$	$6,639 \cdot 10^{-6}$	$1,002 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,641 \cdot 10^{-2}$	$1,016 \cdot 10^{-2}$	$1,132 \cdot 10^{-6}$	$1,016 \cdot 10^{-2}$	$1,639 \cdot 10^{-2}$	$1,010 \cdot 10^{-2}$	$6,393 \cdot 10^{-5}$	$1,016 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$1,430 \cdot 10^{-1}$	$1,107 \cdot 10^{-2}$	$3,613 \cdot 10^{-4}$	$1,143 \cdot 10^{-2}$	$1,429 \cdot 10^{-1}$	$1,100 \cdot 10^{-2}$	$4,286 \cdot 10^{-4}$	$1,143 \cdot 10^{-2}$

Продовження таблиці 3.

№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,191	0,120	-0,119	$1,191 \cdot 10^{-3}$	0,191	0,120	-0,119	$1,190 \cdot 10^{-3}$

11.	$1,0 \cdot 10^{-4}$	1,904	2,907	-2,904	$2,904 \cdot 10^{-3}$	1,904	2,907	-2,904	$2,904 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	19,01	200,2	-200,1	$2,001 \cdot 10^{-2}$	19,01	200,1	-200,1	$2,001 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	187,7	$1,887 \cdot 10^4$	$-1,887 \cdot 10^4$	$1,887 \cdot 10^{-1}$	186,9	$1,879 \cdot 10^4$	$-1,879 \cdot 10^4$	$1,879 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
12.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	8,333	$3,350 \cdot 10^{-2}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$	8,333	$3,350 \cdot 10^{-2}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,804	$4,122 \cdot 10^{-3}$	$1,961 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$	9,804	$4,122 \cdot 10^{-3}$	$1,961 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9,980	$6,048 \cdot 10^{-4}$	$1,996 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$	9,980	$6,048 \cdot 10^{-4}$	$1,996 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9,998	$2,640 \cdot 10^{-4}$	$1,999 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$	9,998	$2,639 \cdot 10^{-4}$	$1,999 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	10,00	$4,080 \cdot 10^{-4}$	$1,998 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$	10,00	$4,080 \cdot 10^{-4}$	$1,998 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cat}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
13.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,025	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-4,572 \cdot 10^{-5}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,025	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-1,250 \cdot 10^{-12}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,250	$1,005 \cdot 10^{-1}$	$-4,498 \cdot 10^{-4}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,250	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-1,249 \cdot 10^{-10}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	2,488	$1,045 \cdot 10^{-1}$	$-4,478 \cdot 10^{-3}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	2,488	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-1,244 \cdot 10^{-8}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	23,81	$1,429 \cdot 10^{-1}$	$-4,287 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	23,81	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-1,191 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	166,7	$4,010 \cdot 10^{-1}$	$-3,008 \cdot 10^{-1}$	$1,002 \cdot 10^{-1}$	166,7	$1,003 \cdot 10^{-1}$	$-8,333 \cdot 10^{-5}$	$1,002 \cdot 10^{-1}$

З табл. 3 також маємо, що значення K_m^{sum} може бути більшим, ніж K_m^{app} , при $[M]_0 < \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS})$, або меншим – при $[M]_0 > \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS})$.

Уявну константу Міхаеліса з рівняння (63) також можна виразити через субстратну константу K_s та k_{cat} :

$$\begin{aligned}
 K_m^{app} &= K_s \left(\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0 + K_m^{EMS}} \right) \left(\frac{[M]_0 + K_s^{EM}}{K_s^{EM}} \right) + \left(\frac{[M]_0 + K_s^{EM}}{K_s^{EM}} \right) \frac{k_2 [M]_0}{k_1 ([M]_0 + K_m^{EMS})} = \\
 &= \left(\frac{[M]_0}{K_s^{EM}} + 1 \right) \left\{ K_s \left(\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0 + K_m^{EMS}} \right) + \frac{k_{cat}}{k_1} \right\}
 \end{aligned} \tag{67}$$

З рівнянь (63) та (65) видно, що значення K_m^{app} може бути співставним з сумою $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, в умовах, коли $k_{-1} K_m^{EMS} \gg k_2 [M]_0$ і в той же час $K_s^{EM} = K_m^{EMS}$, незважаючи на те, що рівняння (38) не може точно виконуватись при $K_s^{EM} = K_m^{EMS}$. В такому

випадку значення як K_m^{app} , так і K_m^{sum} , практично дорівнюють K_s (табл. 3, реакція 13: при концентраціях активатора нижчих, ніж 1 мМ, коли $\frac{k_{-1}K_m^{EMS}}{k_2}$ перевищує $[M]_0$ більше, ніж на 4 порядки).

Як видно з рівняння (67) сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ також може бути близькою за величиною до K_m^{app} , якщо одночасно виконуються умови $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (наприклад, реакція 10 при низьких концентраціях активатора, табл. 3). При цьому (та в умовах $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} \gg \frac{k_2}{k_{-1}}$, що виконуються у випадку реакції 10) значення K_m^{app} та K_m^{sum} стають практично рівними K_s . В такому випадку K_m^{app} можна інтерпретувати як суму $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ в умовах, коли $K_s \gg \frac{k_{cat}}{k_1}$.

Рівняння (67) може бути записане також і в іншій формі:

$$K_m^{app} = \left(\frac{[M]_0}{K_s^{EM}} + 1 \right) \left\{ K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} + \frac{k_{cat}}{k_1} \right\} = \left(\frac{[M]_0}{K_s^{EM}} + 1 \right) \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{k_{-1} K_m^{EMS}}{k_2 [M]_0} \right] \quad (68)$$

Для порівняння запишемо й рівняння (65) в аналогічному вигляді:

$$K_m^{sum} = \left\{ K_s \frac{k_{cat}}{k_2} \left(1 + \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0} \right) + \frac{k_{cat}}{k_1} \right\} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{k_{-1}}{k_2} + \frac{k_{-1} K_m^{EMS}}{k_2 [M]_0} \right] \quad (69)$$

Порівнюючи рівняння (69) та (68) бачимо, що в квадратних дужках рівняння (69) присутній доданок $\left(\frac{k_{-1}}{k_2} \right)$, якого немає у рівнянні (68), та відсутній множник $\left(\frac{[M]_0}{K_s^{EM}} + 1 \right)$, який містить константу K_s^{EM} . Ця константа не входить до k_{cat} , а тому не

може з'явитись і у виразі для K_m^{sum} , проте вона присутня у рівнянні для уявної константи Міхаеліса K_m^{app} . Із-за цих відмінностей в загальному випадку $K_m^{sum} \neq K_m^{app}$.

Таким чином, при дослідженні реакцій, що протікають за механізмом (55), також в загальному випадку рівняння (38) не може бути використане для розрахунку уявних констант Міхаеліса. Значення K_m^{sum} , що розраховуються, можуть бути більшими, або меншими, ніж K_m^{app} , але при певних співвідношеннях кінетичних параметрів ($[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $k_{-1} \ll k_2$, або $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$) значення цих констант можуть бути досить близькими. Зауважимо, що для цього недостатньо тих умов, які виконувались під час досліджень, що проводив Ченс: коли k_{cat} суттєво перевищувала k_{-1} та зростала пропорційно концентрації активатора (див. наприклад, реакцію 11). Точно рівняння (38) може виконуватись лише при строго визначеній концентрації активатора: $[M]_0 = \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS})$. Уявна константа k_{cat} також може значно відрізнитись за величиною від істинної константи k_2 (ці константи можуть співпадати тільки при досить високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$), наприклад для реакції 11 при $[M]_0 = 0,01$ мМ константа k_{cat} майже на 5 порядків менша за k_2 .

Реакції, що протікають за механізмом (30), в якому комплекс ES не утворюється, описуються рівнянням (37), де $K_m^{app} = \left(\frac{k_3[M]_0 + k_{-3}}{k_3[M]_0 + k_2} \right) K_m^{EMS}$ та

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3 [M]_0}{k_3 [M]_0 + k_2}.$$

В цьому випадку також після додавання K_s і $\frac{k_{cat}}{k_1}$ ми не отримуємо величину

уявної константи Міхаеліса K_m^{app} :

$$K_m^{sum} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2 k_3 [M]_0}{k_1 (k_3 [M]_0 + k_2)} = \frac{k_3 [M]_0 (k_2 + k_{-1}) + k_{-1} k_2}{k_1 (k_3 [M]_0 + k_2)} = \frac{k_3 [M]_0 K_m^{EMS} + K_s k_2}{(k_3 [M]_0 + k_2)} \quad (70)$$

Розділимо K_m^{sum} на два доданки K_m^{app} та K^o , як робили це раніше:

$$K_m^{sum} = \frac{k_3[M]_0 K_m^{EMS} + k_{-3} K_m^{EMS}}{(k_3[M]_0 + k_2)} + \frac{K_s k_2 - k_{-3} K_m^{EMS}}{(k_3[M]_0 + k_2)} =$$

$$= K_m^{app} + \frac{k_{cat} \left[k_{-1} - k_{-3} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \right]}{k_1 k_3 [M]_0} = K_m^{app} + K^o \quad (71)$$

Як можна бачити, точне співпадіння K_m^{app} і K_m^{sum} можливе у випадку, коли $k_{-3} = \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}}$ (або $\frac{1}{k_{-1}} = \frac{1}{k_{-3}} - \frac{1}{k_2}$) (наприклад, реакція 15, табл. 4). Хоча K^o і не дорівнює нулю, як K^o (у відповідності до рівняння (71)), проте видно, що величина K^o на кілька порядків менша, ніж K_m^{app} . Якщо $k_{-3} < \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}}$, то $K_m^{sum} > K_m^{app}$ (див., наприклад, реакції 18, 21), а при $k_{-3} > \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}}$ $K_m^{sum} < K_m^{app}$ (див., наприклад, реакції 16, 17, 19, 20, 22, 26). В умовах, коли $k_2 \leq k_{-3}$, значення K_m^{sum} завжди буде меншим, ніж K_m^{app} (див., наприклад, реакції 17, 20, 22 - 24).

Якщо $k_{-1} \ll k_2$, то K_m^{app} і K_m^{sum} будуть мати близькі значення при $k_{-1} = k_{-3}$ (реакція 16, табл. 4); при $k_{-1} \ll k_{-3}$ значення K_m^{sum} буде меншим за K_m^{app} (реакція 17, табл. 4); а при $k_{-1} \gg k_{-3}$ – більшим (реакція 18, табл. 4).

Таблиця 4. Розраховані значення констант для реакцій № 15–27 (що протікають за механізмом (30) і параметри яких наведені в табл. 1) при різних концентраціях активатора $[M]_0$: константи k_{cat} , K_m^{app} , K^o , K_m^{sum} отримані в результаті чисельного рішення системи диференційних рівнянь (31)–(36) методом Рунге-Кутта-Ністрема (значення k_{cat} і K_m^{app} розраховані за допомогою лінеаризації рівняння (37) в

координатах Хейнса $\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$, значення K_m^{sum} розраховані як сума $\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1}$, а

значення $*K^o$ розраховане як різниця $*K_m^{sum} - *K_m^{app}$); константи k_{cat} і K_m^{app} розраховані за рівнянням (37), константа K_m^{sum} – за рівнянням (70), а величина K^o – за рівнянням (71).

№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
15.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	6,246	$1,001 \cdot 10^{-2}$	$1,874 \cdot 10^{-7}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$	6,246	$1,001 \cdot 10^{-2}$	0	$1,001 \cdot 10^{-2}$
	$3,0 \cdot 10^{-5}$	18,72	$1,002 \cdot 10^{-2}$	$-1,123 \cdot 10^{-7}$	$1,002 \cdot 10^{-2}$	18,71	$1,002 \cdot 10^{-2}$	0	$1,002 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	62,11	$1,006 \cdot 10^{-2}$	$-4,348 \cdot 10^{-7}$	$1,006 \cdot 10^{-2}$	62,11	$1,006 \cdot 10^{-2}$	0	$1,006 \cdot 10^{-2}$
	$3,0 \cdot 10^{-4}$	184,1	$1,019 \cdot 10^{-2}$	$-1,344 \cdot 10^{-6}$	$1,018 \cdot 10^{-2}$	184,0	$1,018 \cdot 10^{-2}$	0	$1,018 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	588,3	$1,059 \cdot 10^{-2}$	$-4,295 \cdot 10^{-6}$	$1,059 \cdot 10^{-2}$	588,2	$1,059 \cdot 10^{-2}$	0	$1,059 \cdot 10^{-2}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	1580	$1,159 \cdot 10^{-2}$	$-1,145 \cdot 10^{-5}$	$1,158 \cdot 10^{-2}$	1579	$1,158 \cdot 10^{-2}$	0	$1,158 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	3849	$1,388 \cdot 10^{-2}$	$-2,710 \cdot 10^{-5}$	$1,385 \cdot 10^{-2}$	3846	$1,385 \cdot 10^{-2}$	0	$1,385 \cdot 10^{-2}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
16.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	1,000	$6,667 \cdot 10^{-5}$	$-7,899 \cdot 10^{-9}$	$6,666 \cdot 10^{-5}$	1,000	$6,667 \cdot 10^{-5}$	$-3,333 \cdot 10^{-9}$	$6,666 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,990	$3,664 \cdot 10^{-4}$	$-3,197 \cdot 10^{-8}$	$3,663 \cdot 10^{-4}$	9,990	$3,663 \cdot 10^{-4}$	$-3,330 \cdot 10^{-9}$	$3,663 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	99,01	$3,334 \cdot 10^{-3}$	$-3,762 \cdot 10^{-7}$	$3,334 \cdot 10^{-3}$	99,01	$3,334 \cdot 10^{-3}$	$-3,300 \cdot 10^{-9}$	$3,334 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	909,1	$3,034 \cdot 10^{-2}$	$-4,274 \cdot 10^{-6}$	$3,034 \cdot 10^{-2}$	909,1	$3,034 \cdot 10^{-2}$	$-3,030 \cdot 10^{-9}$	$3,034 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	5001	$1,667 \cdot 10^{-1}$	$-2,501 \cdot 10^{-5}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$	5000	$1,667 \cdot 10^{-1}$	$-1,667 \cdot 10^{-9}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$
№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
17.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	9,990	1,998	-1,998	$2,198 \cdot 10^{-4}$	9,990	1,998	-1,998	$2,198 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	99,01	1,982	-1,980	$2,000 \cdot 10^{-3}$	99,01	1,982	-1,980	$2,000 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	909,1	1,837	-1,818	$1,820 \cdot 10^{-2}$	909,1	1,837	-1,818	$1,820 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	5000	1,100	-1,000	$1,000 \cdot 10^{-1}$	5000	1,100	-1,000	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9092	0,364	-0,182	$1,819 \cdot 10^{-1}$	9091	0,364	-0,182	$1,818 \cdot 10^{-1}$

Продовження таблиці 4.

№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
18.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,001	$3,848 \cdot 10^{-8}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,002 \cdot 10^{-5}$	0,001	$4,001 \cdot 10^{-8}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,002 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,010	$2,225 \cdot 10^{-7}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,020 \cdot 10^{-5}$	0,010	$2,201 \cdot 10^{-7}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,020 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,100	$2,022 \cdot 10^{-6}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,200 \cdot 10^{-5}$	0,100	$2,021 \cdot 10^{-6}$	$5,998 \cdot 10^{-5}$	$6,200 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	1,000	$2,003 \cdot 10^{-5}$	$5,997 \cdot 10^{-5}$	$8,000 \cdot 10^{-5}$	1,000	$2,002 \cdot 10^{-5}$	$5,997 \cdot 10^{-5}$	$8,000 \cdot 10^{-5}$

	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,990	$1,999 \cdot 10^{-4}$	$5,990 \cdot 10^{-5}$	$2,598 \cdot 10^{-4}$	9,990	$1,999 \cdot 10^{-4}$	$5,992 \cdot 10^{-5}$	$2,598 \cdot 10^{-4}$
N_0	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
19.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,010	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,980 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,010	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,990 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,099	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,802 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,099	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,901 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,909	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,091 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	0,909	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,091 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	5,000	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-5,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	5,000	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-5,000 \cdot 10^{-6}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,091	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,091 \cdot 10^{-7}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$	9,091	$1,000 \cdot 10^{-1}$	$-9,091 \cdot 10^{-7}$	$1,000 \cdot 10^{-1}$
N_0	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
20.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,909	90,95	-90,85	0,100	0,909	90,93	-90,83	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	4,999	50,05	-49,95	0,100	5,000	50,06	-49,96	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9,091	9,183	-9,083	0,100	9,091	9,183	-9,083	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	9,901	1,089	-0,989	0,100	9,901	1,089	-0,989	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	9,990	0,200	-0,100	0,100	9,990	0,200	-0,100	0,100
N_0	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
21.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$2,017 \cdot 10^{-5}$	$9,998 \cdot 10^{-2}$	0,100	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$2,000 \cdot 10^{-5}$	$9,998 \cdot 10^{-2}$	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$9,99 \cdot 10^{-3}$	$1,101 \cdot 10^{-4}$	$9,989 \cdot 10^{-2}$	0,100	$9,99 \cdot 10^{-3}$	$1,099 \cdot 10^{-4}$	$9,989 \cdot 10^{-2}$	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$9,90 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,900 \cdot 10^{-2}$	0,100	$9,90 \cdot 10^{-2}$	$1,000 \cdot 10^{-3}$	$9,900 \cdot 10^{-2}$	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$9,09 \cdot 10^{-1}$	$9,101 \cdot 10^{-3}$	$9,090 \cdot 10^{-2}$	0,100	$9,09 \cdot 10^{-1}$	$9,101 \cdot 10^{-3}$	$9,090 \cdot 10^{-2}$	0,100
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	5	$5,001 \cdot 10^{-2}$	$5,000 \cdot 10^{-2}$	0,100	5	$5,001 \cdot 10^{-2}$	$4,999 \cdot 10^{-2}$	0,100
N_0	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
22.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,104	$1,035 \cdot 10^5$	$-1,035 \cdot 10^5$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	0,091	$9,092 \cdot 10^4$	$-9,092 \cdot 10^4$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,518	$5,176 \cdot 10^4$	$-5,176 \cdot 10^4$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	0,500	$5,001 \cdot 10^4$	$-5,000 \cdot 10^4$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,874	$8,737 \cdot 10^3$	$-8,737 \cdot 10^3$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	0,909	$9,092 \cdot 10^3$	$-9,092 \cdot 10^3$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	0,990	$9,899 \cdot 10^2$	$-9,899 \cdot 10^2$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	0,990	$9,902 \cdot 10^2$	$-9,902 \cdot 10^2$	$1,000 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	0,999	$9,988 \cdot 10^1$	$-9,987 \cdot 10^1$	$1,000 \cdot 10^{-2}$	0,999	$9,992 \cdot 10^1$	$-9,991 \cdot 10^1$	$1,000 \cdot 10^{-2}$

Продовження таблиці 4.

N_0	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
23.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	9,901	$2,179 \cdot 10^{-6}$	$-1,080 \cdot 10^{-6}$	$1,099 \cdot 10^{-6}$	9,901	$2,178 \cdot 10^{-6}$	$-1,079 \cdot 10^{-6}$	$1,099 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,990	$1,210 \cdot 10^{-6}$	$-1,099 \cdot 10^{-7}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$	9,990	$1,209 \cdot 10^{-6}$	$-1,089 \cdot 10^{-7}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	9,999	$1,112 \cdot 10^{-6}$	$-1,234 \cdot 10^{-8}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$	9,999	$1,111 \cdot 10^{-6}$	$-1,090 \cdot 10^{-8}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	10,000	$1,103 \cdot 10^{-6}$	$-2,900 \cdot 10^{-9}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$	10,000	$1,101 \cdot 10^{-6}$	$-1,090 \cdot 10^{-9}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$

	$1,0 \cdot 10^{-1}$	10,000	$1,102 \cdot 10^{-6}$	$-2,220 \cdot 10^{-9}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$	10,000	$1,100 \cdot 10^{-6}$	$-1,090 \cdot 10^{-10}$	$1,100 \cdot 10^{-6}$
<i>N</i> ₂	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
24.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	11,000	-9,999	1,001	$1,00 \cdot 10^{-3}$	11,000	-9,999	1,001
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$9,99 \cdot 10^{-3}$	11,000	-9,990	1,010	$9,99 \cdot 10^{-3}$	11,000	-9,990	1,010
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$9,90 \cdot 10^{-2}$	11,000	-9,901	1,099	$9,90 \cdot 10^{-2}$	11,000	-9,901	1,099
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$9,09 \cdot 10^{-1}$	11,000	-9,092	1,909	$9,09 \cdot 10^{-1}$	11,000	-9,091	1,909
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	5,000	11,000	-5,000	6,000	5,000	11,000	-5,000	6,000
<i>N</i> ₂	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
25.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,999	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0,999	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0	$5,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,901	$5,050 \cdot 10^{-3}$	$-3,960 \cdot 10^{-8}$	$5,050 \cdot 10^{-3}$	9,901	$5,050 \cdot 10^{-3}$	0	$5,050 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	90,91	$5,455 \cdot 10^{-3}$	$-3727 \cdot 10^{-7}$	$5,455 \cdot 10^{-3}$	90,91	$5,455 \cdot 10^{-3}$	0	$5,455 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	500,0	$7,502 \cdot 10^{-3}$	$-2,225 \cdot 10^{-6}$	$7,500 \cdot 10^{-3}$	500,0	$7,500 \cdot 10^{-3}$	0	$7,500 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	909,1	$9,550 \cdot 10^{-3}$	$-4,137 \cdot 10^{-6}$	$9,546 \cdot 10^{-3}$	909,1	$9,545 \cdot 10^{-3}$	0	$9,545 \cdot 10^{-3}$
<i>N</i> ₂	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
26.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	4,950	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-6}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$	4,950	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-4,950 \cdot 10^{-6}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	4,995	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,495 \cdot 10^{-7}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$	4,995	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-4,995 \cdot 10^{-7}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-8}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-8}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-8}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-9}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-8}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$	5,000	$1,050 \cdot 10^{-2}$	$-5,000 \cdot 10^{-10}$	$1,050 \cdot 10^{-2}$
<i>N</i> ₂	M_0, M	$*k_{cab}, \text{XB}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	k_{cab}, XB^{-1}	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
27.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	1,000	$8,000 \cdot 10^{-1}$	$-8,000 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-5}$	1,000	$8,000 \cdot 10^{-1}$	$-8,000 \cdot 10^{-1}$	$2,002 \cdot 10^{-5}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,998	$8,000 \cdot 10^{-1}$	$-7,998 \cdot 10^{-1}$	$2,000 \cdot 10^{-4}$	9,998	$8,000 \cdot 10^{-1}$	$-7,998 \cdot 10^{-1}$	$2,000 \cdot 10^{-4}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	99,80	$8,004 \cdot 10^{-1}$	$-7,984 \cdot 10^{-1}$	$1,996 \cdot 10^{-3}$	99,80	$8,004 \cdot 10^{-1}$	$-7,984 \cdot 10^{-1}$	$1,996 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	980,4	$8,039 \cdot 10^{-1}$	$-7,843 \cdot 10^{-1}$	$1,961 \cdot 10^{-2}$	980,4	$8,039 \cdot 10^{-1}$	$-7,843 \cdot 10^{-1}$	$1,961 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	8334	$8,334 \cdot 10^{-1}$	$-6,667 \cdot 10^{-1}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$	8333	$8,333 \cdot 10^{-1}$	$-6,667 \cdot 10^{-1}$	$1,667 \cdot 10^{-1}$

Навпаки, в умовах коли $k_{-1} \gg k_2$, значення K_m^{app} і K_m^{sum} будуть досить близькими при $k_2 = k_{-3}$ (реакція 19, табл. 4: при цьому K_m^{app} і K_m^{sum} будуть за величиною практично рівними K_s); при $k_2 \ll k_{-3}$ значення K_m^{sum} буде меншим за K_m^{app} (реакція 20, табл. 4); а при $k_2 \gg k_{-3}$ – більшим (реакція 21, табл. 4). Як видно з рівняння (70) при $k_{-1} \gg k_2$ значення K_m^{sum} практично не відрізняється від K_s (реакції 19 – 21, а також 22, табл. 4).

Уявну константу Міхаеліса K_m^{app} можна виразити через K_s , K_s^M та $\frac{k_{cat}}{k_1}$:

$$K_m^{app} = K_m^{EMS} \left(\frac{[M]_0 + K_s^M}{[M]_0 + \frac{k_2}{k_3}} \right) = \left(\frac{k_3[M]_0}{k_3[M]_0 + k_2} \right) K_s + \left(\frac{k_3 K_m^{EMS}}{k_3[M]_0 + k_2} \right) K_s^M + \frac{k_{cat}}{k_1} \quad (72)$$

З одержаного рівняння видно, що значення K_m^{app} може бути співставним з сумою $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ при одночасному дотриманні умов $[M]_0 \gg \frac{k_2}{k_3}$ та $[M]_0 \gg K_s^M$

(реакція 23, табл. 4 – при високих концентраціях активатора, більших за 10 мМ, коли $[M]_0$ переважає K_s^M більше, ніж на 3 порядки). В умовах, коли $k_2 = k_{-3}$,

$K_m^{app} = K_m^{EMS} = K_s + \frac{k_2}{k_1}$, тобто, уявна константа Міхаеліса не може бути виражена, як

сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ (тобто, рівнянням (38)), оскільки в таких умовах, як впливає з

рівняння (71), $K_m^{sum} = K_m^{EMS} - \left(\frac{k_2^2}{k_1(k_3[M]_0 + k_2)} \right)$ і $K_m^{sum} \neq K_m^{app}$ (реакція 24, табл. 4).

Можна об'єднати перші два доданки рівняння (72):

$$K_m^{app} = \frac{k_{-1}k_3[M]_0 + k_{-3}(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_3[M]_0 + k_2)} + \frac{k_{cat}}{k_1} \quad (73)$$

В такому випадку рівняння (73) перетворюється в рівняння (38) при умові, що

$\frac{1}{k_{-3}} = \frac{1}{k_{-1}} + \frac{1}{k_2}$ (реакція 15, табл. 4), а також при одночасному дотриманні умов

$K_m^{EMS} = \frac{k_2}{k_3}$ та $K_s = K_s^M$ (реакція 25, табл. 4), що означає виконання умови $k_{-3} = \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}}$.

В останньому випадку рівняння (73) перетворюється також в

рівняння $K_m^{app} = K_s^M + \frac{k_{cat}}{k_1}$ (реакція 25, табл. 5). Можна також показати, що при

концентрації активатора $[M]_0 = \frac{k_{-3}K_m^{EMS} - k_2K_s^M}{k_{-3} + k_2 - k_3K_m^{EMS}}$ уявна константа Міхаеліса K_m^{app}

може бути виражена як сума $K_s^M + \frac{k_{cat}}{k_3}$ (табл. 6, реакція 15 – при концентрації активатора 8 мМ).

Рівняння (72) може бути записане в іншому вигляді:

$$K_m^{app} = \left(\frac{k_3[M]_0 + k_{-3}}{k_3[M]_0 + k_2} \right) K_s + \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} \right) \quad (74)$$

Видно, що перший доданок стає рівним K_s при $k_{-3} = k_2$, а другий тим більше наближається за величиною до $\frac{k_{cat}}{k_1}$, чим більше $[M]_0$ переважає K_s^M (реакція 26, табл. 4).

Рівняння (72) можна записати більш компактно:

$$K_m^{app} = \frac{K_s K_s^M}{[M]_0 + \frac{k_2}{k_3}} + \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} + \frac{k_{-1}}{k_2} \right] \quad (75)$$

або

$$K_m^{app} = \left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} \right) \left(K_s \frac{k_{cat}}{k_2} + \frac{k_{cat}}{k_1} \right) \quad (76)$$

Таблиця 5. Розраховані значення констант для реакції № 25 (що відбувається у відповідності до механізму (30) і параметри яких наведені в табл. 1) при різних концентраціях активатора $[M]_0$: константи $^*k_{cat}$, $^*K_m^{app}$, $^*K^o$, $^*K_m^{sum}$ отримані в результаті чисельного рішення системи диференціальних рівнянь (31)–(36) методом Рунге-Кутта-Ністрема (значення $^*k_{cat}$ і $^*K_m^{app}$ розраховані за допомогою лінеаризації

рівняння (37) в координатах Хейнеса $\frac{[S]_0}{\nu_0} - [S]_0$, значення $*K_m^{sum}$ розраховані як сума

$$\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{*k_{cat}}{k_1}, \text{ а значення } *K^o \text{ розраховане як різниця } *K_m^{sum} - *K_m^{app}; \text{ константи } k_{cat} \text{ і } K_m^{app}$$

розраховані за рівнянням (37), константа K_m^{sum} – за рівнянням (70), а константа K^o – за рівнянням (71). Для даної реакції K_m^{app} може бути представлена, як сума

$$K_s^M + \frac{k_{cat}}{k_1}.$$

№	M_0, M	$*k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	$*K_m^{app}, M$	$*K^o, M$	$*K_m^{sum}, M$	$k_{cat}, \text{хВ}^{-1}$	K_m^{app}, M	K^o, M	K_m^{sum}, M
25.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,999	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0,999	$5,005 \cdot 10^{-3}$	0	$5,005 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	9,901	$5,050 \cdot 10^{-3}$	$-3,960 \cdot 10^{-8}$	$5,050 \cdot 10^{-3}$	9,901	$5,050 \cdot 10^{-3}$	0	$5,050 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	90,91	$5,455 \cdot 10^{-3}$	$-3727 \cdot 10^{-7}$	$5,455 \cdot 10^{-3}$	90,91	$5,455 \cdot 10^{-3}$	0	$5,455 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	500,0	$7,502 \cdot 10^{-3}$	$-2,225 \cdot 10^{-6}$	$7,500 \cdot 10^{-3}$	500,0	$7,500 \cdot 10^{-3}$	0	$7,500 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	909,1	$9,550 \cdot 10^{-3}$	$-4,137 \cdot 10^{-6}$	$9,546 \cdot 10^{-3}$	909,1	$9,545 \cdot 10^{-3}$	0	$9,545 \cdot 10^{-3}$

З рівняння (76) видно, що сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ та K_m^{app} будуть мати близькі значення

при одночасному виконанні умов $[M]_0 \gg K_s^M$ та $k_{cat} = k_2$ (тобто, при $[M]_0 \gg \frac{k_2}{k_3}$)

(реакція 26, табл. 4).

Якщо всі доданки рівняння (72) виразити через $\frac{k_{cat}}{k_1}$, одержимо:

$$K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} + \frac{k_{-1}}{k_2} + \frac{k_{-1}}{k_2} \frac{K_s^M}{[M]_0} \right] = \left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} \right) \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \quad (77)$$

Таблиця 6. Розраховані значення констант для реакції № 15 (що відбувається у відповідності до механізму (30) і параметри яких наведені в табл. 1) при різних концентраціях активатора $[M]_0$: константи $*k_{cat}$, $*K_m^{app}$, $*K^o$, $*K_m^{sum}$ отримані в результаті чисельного рішення системи диференційних рівнянь (31)–(36) методом Рунге-Кутта-Ністрема (значення $*k_{cat}$ і $*K_m^{app}$ розраховані за допомогою лінеаризації

рівняння (37) в координатах Хейнеса $\frac{[S]_0}{v_0} - [S]_0$, значення $*K_m^{sum}$ розраховані як сума

$$\frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{*k_{cat}}{k_1}, \text{ а значення } *K^o \text{ розраховане як різниця } (*K_m^{sum} - *K_m^{app}); \text{ константи } k_{cat} \text{ і } K_m^{app}$$

розраховані за рівнянням (37), константа K_m^{sum} – за рівнянням (70), а константа K^o – за рівнянням (71). Для даної реакції K_m^{app} при концентрації активатора

$$[M]_0 = \frac{k_{-3}K_m^{EMS} - k_2K_s^M}{k_{-3} + k_2 - k_3K_m^{EMS}} \text{ може бути представлена, як сума } K_s^M + \frac{k_{cat}}{k_3}.$$

№	M_0 , М	$*k_{cat}$, хВ ⁻¹	$*K_m^{app}$, М	$*K^o$, М	$*K_m^{sum}$, М	k_{cat} , хВ ⁻¹	K_m^{app} , М	K^o , М	K_m^{sum} , М
15.	$1,0 \cdot 10^{-5}$	6,246	$1,001 \cdot 10^{-2}$	$-1,996 \cdot 10^{-3}$	$8,010 \cdot 10^{-3}$	6,246	$1,001 \cdot 10^{-2}$	$-1,996 \cdot 10^{-3}$	$8,010 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-4}$	62,11	$1,006 \cdot 10^{-2}$	$-1,963 \cdot 10^{-3}$	$8,099 \cdot 10^{-3}$	62,11	$1,006 \cdot 10^{-2}$	$-1,963 \cdot 10^{-3}$	$8,099 \cdot 10^{-3}$
	$1,0 \cdot 10^{-3}$	588,3	$1,059 \cdot 10^{-2}$	$-1,651 \cdot 10^{-3}$	$8,941 \cdot 10^{-3}$	588,2	$1,059 \cdot 10^{-2}$	$-1,647 \cdot 10^{-3}$	$8,941 \cdot 10^{-3}$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	1580	$1,159 \cdot 10^{-2}$	$-1,064 \cdot 10^{-3}$	$1,053 \cdot 10^{-2}$	1579	$1,158 \cdot 10^{-2}$	$-1,053 \cdot 10^{-3}$	$1,053 \cdot 10^{-2}$
	$8,0 \cdot 10^{-3}$	3336	$1,336 \cdot 10^{-2}$	$-2,218 \cdot 10^{-5}$	$1,334 \cdot 10^{-2}$	3333	$1,333 \cdot 10^{-2}$	0	$1,333 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	3849	$1,388 \cdot 10^{-2}$	$2,825 \cdot 10^{-4}$	$1,416 \cdot 10^{-2}$	3846	$1,385 \cdot 10^{-2}$	$3,077 \cdot 10^{-4}$	$1,415 \cdot 10^{-2}$
	$1,0 \cdot 10^{-1}$	8623	$1,866 \cdot 10^{-2}$	$3,139 \cdot 10^{-3}$	$2,180 \cdot 10^{-2}$	8621	$1,862 \cdot 10^{-2}$	$3,172 \cdot 10^{-3}$	$2,179 \cdot 10^{-2}$

Рівняння (70) для K_m^{sum} також можна записати, як

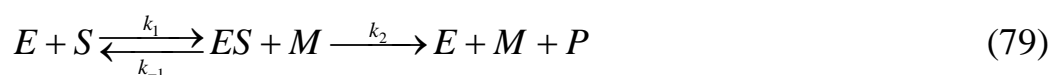
$$K_m^{sum} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left[1 + \frac{k_{-1}}{k_2} + \frac{k_{-1}}{k_{-3}} \frac{K_s^M}{[M]_0} \right]. \quad (78)$$

Отже, рівняння (77) та (78) відрізняються, а тому в загальному випадку K_m^{app} та K_m^{sum} не співпадають (наприклад, при концентрації активатора 0,01 мМ в реакції 22, табл. 4, вони відрізняються на 7 порядків), а це означає, що для реакцій, що протікають за механізмом (30), уявна константа Міхаеліса не може бути записана у вигляді рівняння (38). Проте, як можна було побачити, існують різні умови, при дотриманні яких значення констант K_m^{app} та K_m^{sum} майже співпадають, але виконання лише однієї умови $k_{-1} \ll k_{cat}$ недостатньо для цього (див., наприклад, реакцію 27,

табл. 4). Рівняння (38) точно виконується тільки при строго визначеному співвідношенні констант швидкості: коли $\frac{1}{k_{-3}} = \frac{1}{k_{-1}} + \frac{1}{k_2}$, або $K_m^{EMS} = \frac{k_2}{k_3}$ та $K_s^M = K_s$.

Для досліджуваного механізму реакції уявна константа k_{cat} також може значно відрізнятись за величиною від істинної константи k_2 (співпадіння цих констант може відбуватись тільки при високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg \frac{k_2}{k_3}$), наприклад для реакції 18 при $[M]_0 = 0,01$ мМ константа k_{cat} на 7 порядків менша за k_2 .

Проаналізуємо також механізм, що досліджувався Ченсом, в тому вигляді, як він приведений в його статті [31]:



Можна розрахувати стаціонарну концентрацію комплексу ES , розв'язавши рівняння

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S]_0([E]_0 - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES][M]_0 = 0 \quad (80)$$

та знайти вираз для початкової швидкості реакції

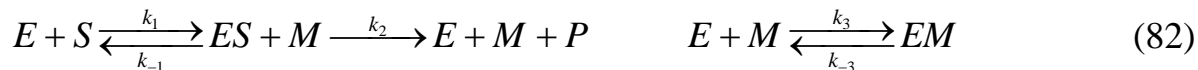
$$v_0 = k_2[ES][M]_0 = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{k_1 [S]_0 + k_{-1} + k_2 [M]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 [M]_0}{[S]_0 + \left(K_s + \frac{k_2 [M]_0}{k_1} \right)} = \frac{V_m^{app} [S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (81)$$

де: $K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$.

З рівняння (81) видно, що $k_{cat} = k_2[M]_0$, а $K_m^{app} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, тобто для реакцій, що

відбуваються за механізмом (79), рівняння (38) завжди точно виконується.

Якщо ж паралельно з реакцією (79) ензим утворює комплекс з активатором EM (що доволі вірогідно для реакції (39)), який характеризується константою дисоціації $K_s^M = \frac{k_{-3}}{k_3}$,



то для виведення рівняння початкової швидкості необхідно розв'язати систему з трьох рівнянь (в квазістаціонарному наближенні при умові $[S]_0 \gg [E]_0$):

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S]_0([E]_0 - [ES] - [EM]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES][M]_0 = 0 \quad (83)$$

$$\frac{d[EM]}{dt} = k_3[M]_0([E]_0 - [ES] - [EM]) - k_{-3}[EM] = 0 \quad (84)$$

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES][M]_0 \quad (85)$$

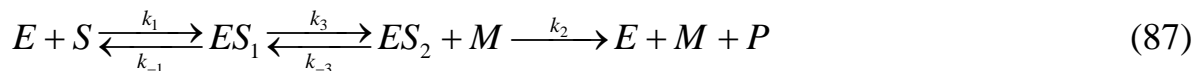
В результаті отримаємо наступний вираз:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0[M]_0}{[S]_0 + \left(K_s + \frac{k_2[M]_0}{k_1}\right) \left(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M}\right)} = \frac{V_m^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (86)$$

Для даної реакції рівняння (38) не виконується: константа K_m^{app} завжди більша, ніж сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, але вони можуть бути близькими за величиною при умові, що $K_s^M \gg [M]_0$. Причому, якщо $k_{-1} \gg k_2[M]_0$, то значення K_m^{app} практично дорівнює K_s , і навпаки, коли $k_{-1} \ll k_2[M]_0$ – значення K_m^{app} практично дорівнює $\frac{k_{cat}}{k_1}$.

Діксон і Вебб підкреслюють, що пероксидаза утворює чотири комплекси з пероксидом водню [18]. При його додаванні спочатку утворюється перший

комплекс зеленого кольору, який швидко перетворюється в другий червоного кольору, який і досліджував Ченс в своїй роботі [31]. Тому проаналізуємо також реакцію зі стадією перетворення комплексу ES_1 в комплекс ES_2 :



Щоб знайти рівняння початкової швидкості в стаціонарному наближенні (при умові $[S]_0 \gg [E]_0$) необхідно розв'язати систему з трьох рівнянь:

$$\frac{d[ES_1]}{dt} = k_1[S]_0([E]_0 - [ES_1] - [ES_2]) - k_{-1}[ES_1] - k_3[ES_1] + k_{-3}[ES_2] = 0 \quad (88)$$

$$\frac{d[ES_2]}{dt} = k_3[ES_1] - k_{-3}[ES_2] - k_2[ES_2][M]_0 = 0 \quad (89)$$

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2[ES_2][M]_0 \quad (90)$$

Початкова швидкість такого процесу підпорядковується рівнянню:

$$v_0 = \frac{\frac{k_2[E]_0[M]_0}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}}[S]_0}{[S]_0 + \frac{K_s(K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}) + \frac{k_2[M]_0}{k_1}}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}}} = \frac{V_m^{app}[S]_0}{[S]_0 + K_m^{app}} \quad (91)$$

$$\text{де: } K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}; K_s^{ES} = \frac{k_{-3}}{k_3}.$$

Для реакції (87) рівняння (38) точно не виконується. Рівняння, що виражає уявну константу Міхаеліса K_m^{app} , можна записати у наступному вигляді:

$$\begin{aligned}
K_m^{app} &= \frac{K_s(K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3})}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}} + \frac{\frac{k_2[M]_0}{k_1}}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}} = K_s \left(1 - \frac{1}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}} \right) + \frac{k_{cat}}{k_1} = \\
&= K_s - \frac{K_s k_{cat}}{k_2[M]_0} + \frac{k_{cat}}{k_1} = K_s + \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 - \frac{k_{-1}}{k_2[M]_0} \right)
\end{aligned} \tag{92}$$

З даного рівняння видно, що сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ завжди більша, ніж величина

K_m^{app} , проте вона може бути близькою за величиною до K_m^{app} при виконанні однієї з умов: $k_3 \ll k_{-3}$, $k_3 \ll k_2[M]_0$, $k_{-1} \ll k_2[M]_0$. Це впливає зі співвідношення K_m^{app} та K^o :

$$\frac{K_m^{app}}{K^o} = \frac{K_s \left(K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3} \right) + \frac{k_2[M]_0}{k_1}}{K_s} = K_s^{ES} + \frac{k_2}{k_3}[M]_0 + \frac{k_2}{k_{-1}}[M]_0 \tag{93}$$

Як видно з рівняння (92), при виконанні умови $k_{-1} = k_2[M]_0$ уявна константа Міхаеліса K_m^{app} перетворюється на субстратну константу K_s (тобто, при концентрації активатора $[M]_0 = \frac{k_{-1}}{k_2}$). В цих же умовах

$$K_m^{sum} = K_s \left(1 + \frac{1}{1 + K_s^{ES} + \frac{k_2[M]_0}{k_3}} \right) \tag{94}$$

Можна побачити, що при цьому $K_m^{sum} > K_s$, $K_m^{sum} > K_m^{app}$, а тому K_m^{app} не може розглядатись, як сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, в якій $K_s \gg \frac{k_{cat}}{k_1}$.

Проведений аналіз показує, що рівняння (38) може використовуватись для розрахунку уявної константи Міхаеліса тільки у випадку реакції, що відбувається у відповідності з механізмом (79). Ускладнення даного механізму, що виражається в

утворенні додаткових подвійних комплексів або потрійного комплексу, приводить до того, що умови, при яких рівняння (38) може виконуватись, суттєво звужуються. Точно воно може виконуватись для механізму (79) при будь-яких значеннях констант швидкості та концентрації активатора, для механізму (30) – при дотриманні співвідношення констант швидкості $k_{-3} = \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}}$ та при будь-якій концентрації активатора, для реакції (55) – лише при певній концентрації активатора $[M]_0 = \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS})$. Крім того для кожного механізму існує певний набір співвідношень кінетичних параметрів, при яких значення константи K_m^{app} може бути досить близьким до суми $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$. Таким чином, можна стверджувати, що в загальному випадку рівняння (38) не може застосовуватись для розрахунку уявних констант Міхаеліса K_m^{app} .

Отже, розглядаючи, в якості механізму реакції пероксидази з пероксидом водню в присутності лейко-форми малахітового зеленого схему (79), Ченс мав всі підстави використовувати рівняння (38) для розрахунку уявної константи Міхаеліса. Проте, результати дослідження можуть суттєво залежати від того, який механізм прийняти до розгляду. Ченс не звернув особливої уваги на перевірку істинності обраного механізму, а, як ми бачимо, вірогідність того, що механізм досліджуваної реакції відрізняється від того, що розглядався Ченсом, досить велика, внаслідок чого і вірогідність того, що рівняння (38) не може бути використане для розрахунку уявної константи Міхаеліса, в такій же мірі висока.

1.6. Чи змінюються k_{cat} та K_m^{app} пропорційно концентрації активатора при дотриманні умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ в ензиматичних реакціях з участю активаторів?

На прикладі розглянутих механізмів проаналізуємо також залежності K_m^{app} і k_{cat} від концентрації активатора, оскільки Ченс в своїй статті [31] стверджує, що при збільшенні концентрації малахітового зеленого в 10 разів, уявна константа

Міхаеліса також має збільшуватись в 10 разів, що дозволяє йому порівнювати розраховане ним значення «константи Міхаеліса», що складає 0,44 мкМ при концентрації активатора $1,5 \cdot 10^{-5}$ М, зі значенням K_m^{app} , знайденим Манном (5 мкМ при концентрації активатора $1,8 \cdot 10^{-4}$ М) [32].

При цьому ні Ченс, ні Манн, не наводять графічної залежності K_m^{app} від концентрації активатора. У Ченса представлена лише лінійна залежність k_{cat} від концентрації активатора. Він не згадує про проведення експериментів з концентраціями малахітового зеленого, більшими за 15 мкМ. В той же час Манн не використовував активатор у концентраціях, менших, ніж 180 мкМ. Таким чином у авторів відсутні результати, які б дозволили зробити висновок про можливість екстраполяції значень K_m^{app} в іншу область концентрацій активатора. Складається враження, що Ченс зробив висновок про лінійну залежність K_m^{app} від концентрації активатора, відштовхуючись від рівняння (38): враховуючи лінійну залежність k_{cat} від концентрації активатора і те, що в його дослідженнях $\frac{k_{cat}}{k_{-1}} = 21$ (тобто $k_{cat} > k_{-1}$), значення K_m^{app} , у відповідності до рівняння (38), справді мають збільшуватись пропорційно концентрації активатора.

Аналіз залежностей K_m^{app} і k_{cat} від концентрації активатора проведемо для умов, коли рівняння (38) може точно виконуватись, коли воно може виконуватись лише приблизно (при цьому значення уявної константи Міхаеліса K_m^{app} близьке до суми $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$), та у випадку, коли воно взагалі не виконується.

Якщо реакція відбувається у відповідності з механізмом (79) (як вважає Ченс), то дійсно, k_{cat} має збільшуватись пропорційно концентрації активатора, а уявна константа Міхаеліса K_m^{app} може збільшуватись пропорційно концентрації активатора при умові $k_{cat} \gg k_{-1}$ (тобто, при $k_2[M]_0 \gg k_{-1}$), яка, як показує Ченс, виконується в присутності використаної автором концентрації малахітового зеленого (значення «константи Міхаеліса», визначене Ченсом на основі розрахованих ним констант швидкості, має змінюватись у 9,6 разів при збільшенні концентрації активатора у 10

разів). У випадку, коли $k_{cat} \ll k_{-1}$, константа K_m^{app} не буде змінюватись пропорційно концентрації активатора, а буде слабо залежати від концентрації активатора і за величиною буде співставна з K_s .

Якщо реакція відбувається у відповідності з механізмом (82), то k_{cat} також збільшується пропорційно концентрації активатора, а K_m^{app} , яку можна записати у

вигляді $K_m^{app} = \frac{k_2}{k_1} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2[M]_0} \right) \left(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M} \right) [M]_0$, може збільшуватись пропорційно

концентрації активатора (тобто $\frac{K_m^{app}}{[M]_0}$ має бути константою) в умовах, коли

$[M]_0 \ll K_s^M$ і при цьому $k_{cat} \gg k_{-1}$ (K_m^{app} буде зростати зі збільшенням концентрації активатора з коефіцієнтом пропорційності $\frac{k_2}{k_1}$), але буде залишатись майже

незмінною при одночасному виконанні умов $[M]_0 \ll K_s^M$ і $k_{cat} \ll k_{-1}$.

Таким чином, уявна константа Міхаеліса K_m^{app} , яка, як було показано раніше, в умовах $[M]_0 \ll K_s^M$ практично дорівнює сумі $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, може зростати пропорційно

концентрації активатора лише при виконанні додаткової умови $k_{cat} \gg k_{-1}$. Тобто, для того, щоб така K_m^{app} змінювалась пропорційно концентрації активатора, недостатньо

виконання лише умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ (що означає $[M]_0 \gg \frac{k_{-1}}{k_2}$) – необхідно також щоб

значення константи дисоціації K_s^M було досить високе і значно перевищувало концентрацію активатора у всьому діапазоні вимірювань.

Розглянемо також умови, в яких значення K_m^{app} не може бути виражене рівнянням (38). При одночасному виконанні умов $[M]_0 \gg K_s^M$ і $k_{cat} \ll k_{-1}$ K_m^{app} має змінюватись пропорційно концентрації активатора (з коефіцієнтом пропорційності

$\frac{K_s}{K_s^M}$). У випадку, коли $[M]_0 \gg K_s^M$, але $k_{cat} \gg k_{-1}$, уявна константа Міхаеліса буде

збільшуватись пропорційно квадрату концентрації активатора ($\frac{K_m^{app}}{[M]_0}$ буде лінійною функцією $[M]_0$). В даному випадку видно, що в реакціях, які протікають за механізмом (82), при дотриманні умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ уявна константа Міхаеліса може змінюватись не лінійно зі зростанням концентрації активатора, а пропорційно квадрату його концентрації, хоча k_{cat} зростає пропорційно концентрації активатора.

Для реакцій, що відбуваються за механізмом (55), $k_{cat} = \frac{k_2[M]_0}{[M]_0 + K_m^{EMS}}$. Як можна бачити, для даного механізму залежність k_{cat} від концентрації активатора є гіперболічною (а не лінійною, як в попередніх випадках) з пропорційним зростанням k_{cat} при малих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (з коефіцієнтом пропорційності $\frac{k_2}{K_m^{EMS}}$) та досягненням граничних значень k_{cat} при високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ (граничним значенням є k_2).

Умови, коли рівняння (38) точно виконується ($k_{-1}K_m^{EMS} + k_2[M]_0 = k_{-1}K_s^{EM}$), немає потреби розглядати, оскільки воно має місце лише при певній концентрації активатора.

При одночасному виконанні умов $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $K_m^{EMS} \gg [M]_0$, коли, як було показано раніше, K_m^{app} і сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$ мають близькі значення, K_m^{app} та k_{cat} можуть змінюватись пропорційно концентрації активатора, якщо виконується також додаткова умова $k_2 \gg k_{-1}$ (причому співвідношення $\frac{k_2}{k_{-1}}$ має бути набагато більшим, ніж $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$, тобто $k_{cat} \gg k_{-1}$, оскільки в даних умовах $k_{cat} = \frac{k_2}{K_m^{EMS}}[M]_0$). Якщо ж додатковою умовою є $k_{-1} \geq k_2$ – уявна константа Міхаеліса залишається практично незмінною при зміні концентрації активатора (хоча k_{cat} зростає пропорційно концентрації активатора). Вона залишається також незмінною і в умовах, коли одночасно виконуються співвідношення $k_{-1}K_m^{EMS} \gg k_2[M]_0$ та $K_s^{EM} = K_m^{EMS}$.

Можна побачити, що виконання умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ разом з умовою $K_m^{EMS} \gg [M]_0$ (при якій k_{cat} пропорційна концентрації активатора) недостатньо для того, щоб K_m^{app} змінювалась пропорційно концентрації активатора. Наприклад, якщо разом з наведеними вище умовами виконується також умова $[M]_0 \gg K_s^{EM}$, то в реакції 14 (табл. 1) K_m^{app} буде збільшуватись пропорційно квадрату концентрації активатора, хоча k_{cat} в той же час буде зростати пропорційно концентрації активатора (рис. 5).

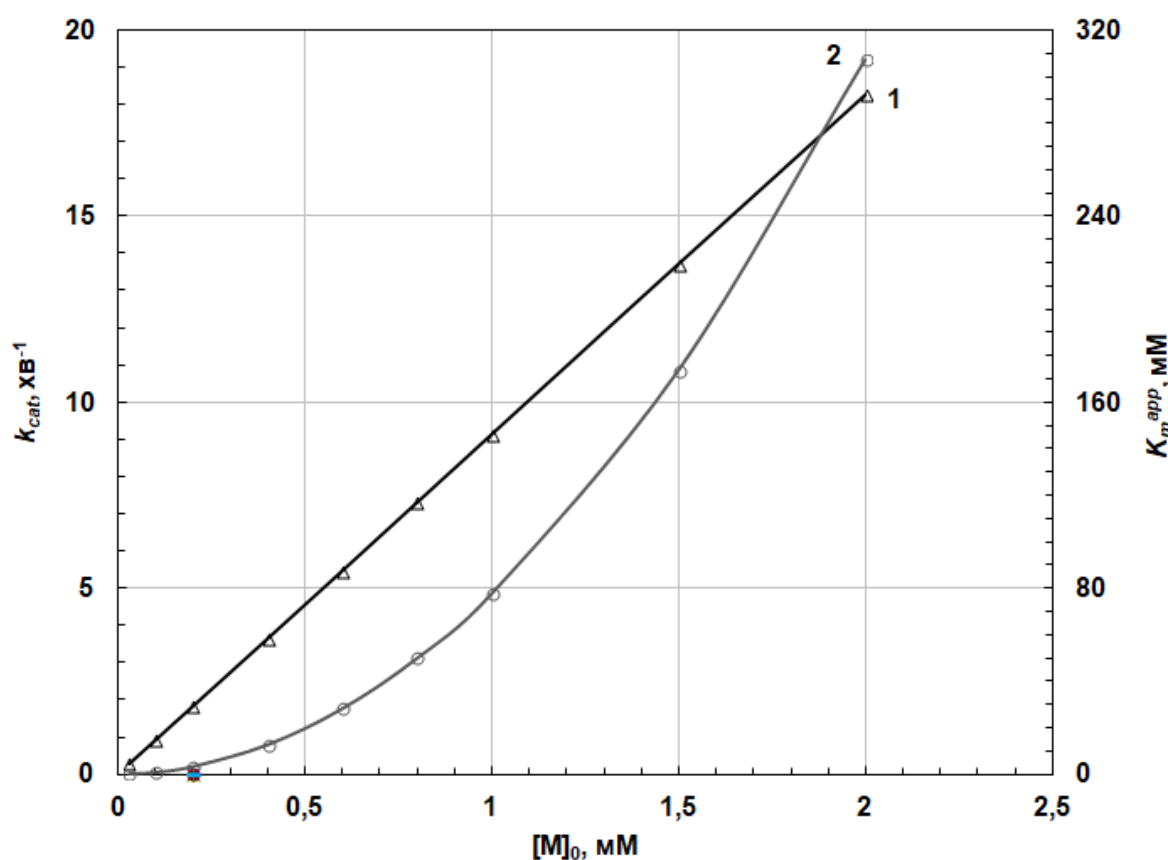


Рис. 5. Пропорційне збільшення k_{cat} (крива 1) та квадратичне зростання K_m^{app} (крива 2) з підвищенням концентрації активатора $[M]_0$ для реакції (14), що відбувається у відповідності з механізмом (55). Для даної реакції ($K_s = 1 \cdot 10^{-8}$ М, $K_m^{EMS} = 0,11$ М, $K_s^{EM} = 1 \cdot 10^{-7}$ М) лінійність k_{cat} і квадратичне зростання K_m^{app} при збільшенні $[M]_0$ спостерігається при одночасному виконанні умов $k_{cat} \gg k_{-1}$, $[M]_0 \gg K_s^{EM}$ та

$$[M]_0 \ll K_m^{EMS} \text{ (при цьому } k_{cat} = \frac{k_2 [M]_0}{K_m^{EMS}} \text{)}.$$

K_m^{app} може змінюватись пропорційно концентрації активатора також у випадках, коли вона не може бути виражена рівнянням (38), наприклад, при одночасному виконанні двох умов: $[M]_0 \gg K_s^{EM}$ та $k_{-1} = k_2$, або трьох умов: $[M]_0 \gg K_s^{EM}$, $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ та $\frac{k_2}{k_{-1}} \gg \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$. Коли $[M]_0 \gg K_s^{EM}$, $\frac{k_2}{k_{-1}} \gg \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$, але $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, уявна константа Міхаеліса K_m^{app} буде збільшуватись пропорційно квадрату концентрації активатора (як показано на рис. 5). Водночас обидві константи K_m^{app} та k_{cat} можуть зростати пропорційно концентрації активатора при одночасному виконанні умов $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, $[M]_0 \gg K_s^{EM}$ та $\frac{k_2}{k_{-1}} \ll \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$.

У випадку механізму (87) залежність k_{cat} від концентрації активатора також є гіперболічною: k_{cat} може збільшуватись пропорційно концентрації активатора при низьких його концентраціях (коли $\frac{k_2[M]_0}{k_3} \ll 1 + K_s^{ES}$), а при високих, якщо виконується умова $\frac{k_2[M]_0}{k_3} \gg 1 + K_s^{ES}$ – не залежить від концентрації активатора.

K_m^{app} може разом з k_{cat} змінюватись пропорційно концентрації активатора при одночасному дотриманні умов: $k_3 \ll k_2[M]_0 \ll k_{-3}$ та $k_{cat} \gg k_{-1}$. В той же час при виконанні умови $k_2[M]_0 \gg k_{-3}$ разом з $k_3 \ll k_{-3}$ або $k_3 \ll k_2[M]_0$, обидві константи (K_m^{app} та k_{cat}) не будуть залежати від концентрації активатора (при цьому значення K_m^{app} будуть близькими до суми $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$).

У випадку, коли рівняння (38) не виконується, K_m^{app} разом з k_{cat} , також можуть змінюватись пропорційно концентрації активатора. Це можливо при одночасному дотриманні умов: $\frac{k_2[M]_0}{k_3} + K_s^{ES} \ll 1$ та $k_{cat} \gg k_{-1}$.

Для даного механізму виконання умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ та лінійного зростання k_{cat} зі збільшенням концентрації активатора недостатньо для того, щоб K_m^{app} також

змінювалась пропорційно концентрації активатора.

Для реакцій, що відбуваються за механізмом (40), залежність k_{cat} від концентрації активатора також є гіперболічною з пропорційним зростанням k_{cat} при малих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ (з коефіцієнтом пропорційності $\frac{k_2}{K_m^{EMS}}$), та досягненням граничних значень k_{cat} при високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$ (граничним значенням є k_2).

Аналіз рівняння (47) показує, що коли $[M]_0 \rightarrow \infty$ K_m^{app} прямує до граничного значення, що дорівнює $\frac{k_2}{k_1}$. З іншого боку, коли $[M]_0 \rightarrow 0$ K_m^{app} прямує до граничного значення, що дорівнює K_s . Точніше кажучи, екстраполяція залежності K_m^{app} від $[M]_0$, отриманої в умовах $[M]_0 \gg [E]_0$ (з врахуванням яких було виведене рівняння (47)) до нульового значення концентрації активатора, дає величину K_s . Яка величина K_m^{app} (та її залежність від концентрації активатора) буде в умовах $[M]_0 \ll [E]_0$ ми не можемо визначити, виходячи з рівняння (47), оскільки воно отримане для умов $[M]_0 \gg [E]_0$.

Можна зробити висновок, що K_m^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (40), зі зростанням концентрації активатора змінюється в межах від величин, близьких до K_s , до значень, що визначаються співвідношенням $\frac{k_2}{k_1}$ (як показано на рис. 6 на прикладі реакції б). Якщо $K_s < \frac{k_2}{k_1}$ (тобто $k_{-1} < k_2$), то K_m^{app} буде зростати, а якщо $k_{-1} > k_2$, то K_m^{app} буде зменшуватись при зростанні концентрації активатора. Видно, що діапазон значень, в якому може змінюватись K_m^{app} , визначається співвідношенням констант швидкості k_{-1} та k_2 . При $k_{-1} = k_2$ уявна константа Міхаеліса буде залишатись незмінною (рівною за величиною до K_s) і не буде залежати від концентрації активатора. Вона буде залишатись незмінною також при дотриманні умови $[M]_0 \gg K_m^{EMS}$.

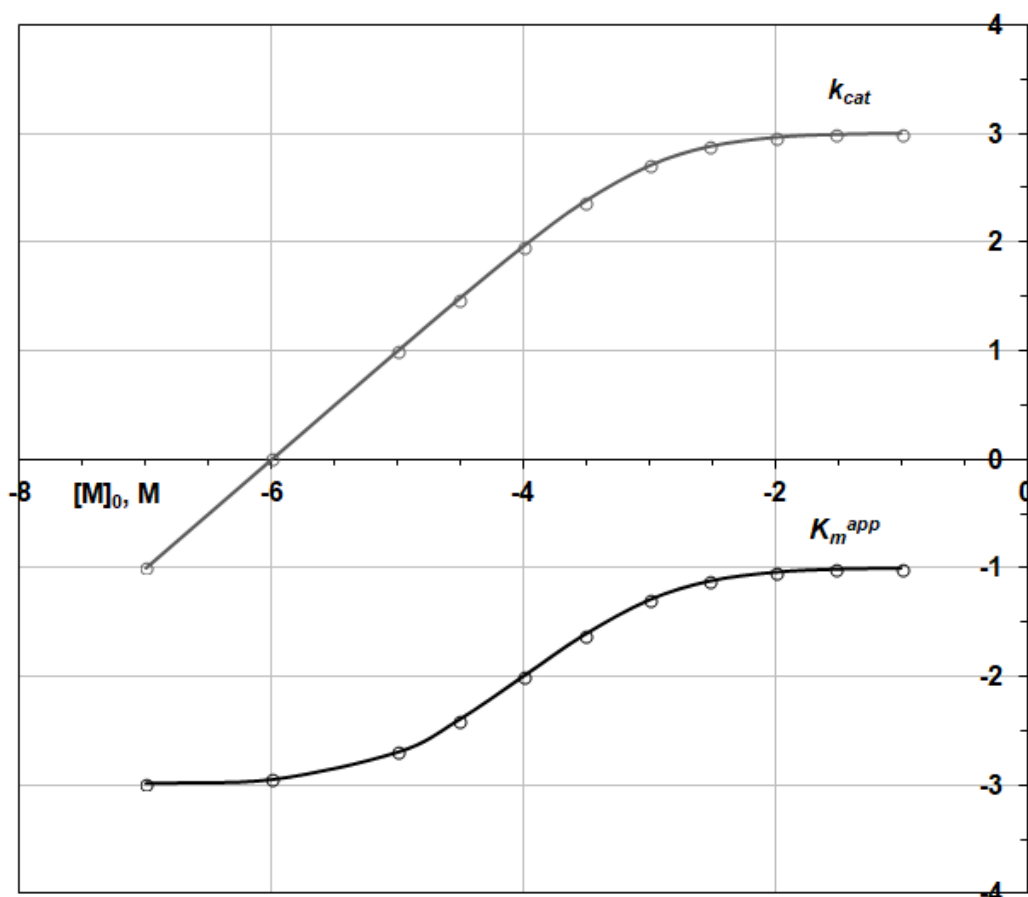


Рис. 6. Загальний вигляд залежностей k_{cat} і K_m^{app} від концентрації активатора $[M]_0$ (в логарифмічних координатах) для реакцій, що протікають за механізмом (40), на прикладі реакції 6 (табл. 1). Оскільки для даної реакції ($K_s = 1 \cdot 10^{-3} M$, $K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-3} M$, $\frac{k_2}{k_1} = 0,1 M$), $k_{-1} < k_2$, то K_m^{app} збільшується зі зростанням $[M]_0$ від значень, близьких до K_s , до значень, близьких до $\frac{k_2}{k_1}$; k_{cat} при підвищенні $[M]_0$ спочатку зростає лінійно, а потім при великих концентраціях активатора досягає граничного значення, близького до k_2 .

K_m^{app} та k_{cat} будуть змінюватись пропорційно концентрації активатора лише тоді, коли одночасно дотримуються умови $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ і $k_{-1} \ll k_2$, причому $\frac{k_2}{k_{-1}}$ має

бути більшим за $\frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$, тобто $k_{cat} \gg k_{-1}$, оскільки в даних умовах $k_{cat} = \frac{k_2}{K_m^{EMS}} [M]_0$.

Якщо ж буде навпаки $\frac{k_2}{k_{-1}} \ll \frac{K_m^{EMS}}{[M]_0}$, то K_m^{app} буде залишатись незмінною,

незважаючи на те, що k_{cat} буде змінюватись пропорційно концентрації активатора.

В даному випадку достатньо виконання двох умов $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$ і $k_{cat} \gg k_{-1}$ для того, щоб K_m^{app} та k_{cat} змінювались пропорційно концентрації активатора.

Залежність k_{cat} від концентрації активатора для реакцій, що протікають за механізмом (30), також є гіперболічною з пропорційним зростанням k_{cat} при малих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \ll \frac{k_2}{k_3}$ (з коефіцієнтом пропорційності k_3), та

досягненням граничних значень k_{cat} при високих концентраціях активатора, коли $[M]_0 \gg \frac{k_2}{k_3}$ (граничним значенням є k_2).

Аналіз рівняння (37) показує, що при $[M]_0 \rightarrow \infty$ K_m^{app} прямує до граничного значення, що дорівнює K_m^{EMS} , а при $[M]_0 \rightarrow 0$ – до граничного значення, що дорівнює $\frac{k_{-3}K_m^{EMS}}{k_2}$. Точніше кажучи, екстраполяція залежності K_m^{app} від $[M]_0$, одержаної в

умовах $[M]_0 \gg [E]_0$ (з врахуванням яких було виведене рівняння (37)) до нульового значення концентрації активатора, дає величину $\frac{k_{-3}K_m^{EMS}}{k_2}$. На відміну від механізму

(40), для досліджуваного механізму (30) ми можемо отримати рівняння швидкості реакції в умовах, коли $[S]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \ll [E]_0$, та побачити, яка буде залежність k_{cat} і K_m^{app} від концентрації активатора при її зменшенні до рівня, значно нижчого, ніж концентрація ензиму:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 \left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{k_2}{k_3[M]_0} \right) + K_m^{EMS} \left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{K_s^M}{[M]_0} \right)} = \frac{\frac{k_2 k_3 [E]_0 [M]_0 [S]_0}{k_3 [E]_0 + k_2}}{[S]_0 + \frac{k_3 ([E]_0 + K_s^M)}{k_3 [E]_0 + k_2} K_m^{EMS}} \quad (95)$$

Аналіз чисельника рівняння (95) показує, що k_{cat} при низьких концентраціях активатора зростає пропорційно $[M]_0$ з коефіцієнтом пропорційності $\frac{k_2 k_3 [E]_0}{k_3 [E]_0 + k_2}$, хоча, виходячи з рівняння (37), здається, що при дуже малих концентраціях активатора (коли $k_3 [M]_0 \ll k_2$) k_{cat} має збільшуватись при зростанні $[M]_0$ з коефіцієнтом k_3 . Величину коефіцієнта пропорційності можна розрахувати по залежності k_{cat} від $[M]_0$ (рис. 7) по відрізку, що відсікається на осі ординат прямою, яка проходить через точки, що відповідають мінімальним концентраціям активатора. Пряма, що проходить через точки з концентраціями активатора $1 \cdot 10^{-9}$ і $1 \cdot 10^{-8}$ М, дає логарифмічне значення 6,4955, що відповідає числовому значенню коефіцієнта пропорційності $3,1297 \cdot 10^6$. Порівнюючи цю величину з $k_3 = 1 \cdot 10^7$ та з $\frac{k_2 k_3 [E]_0}{k_3 [E]_0 + k_2} = 3,3333 \cdot 10^6$, можна побачити, що розрахований коефіцієнт значно ближчий за величиною до $\frac{k_2 k_3 [E]_0}{k_3 [E]_0 + k_2}$, ніж до k_3 . Таким чином, екстраполяція за межі умов, прийнятих при виведенні рівняння, може приводити до похибок.

З похибкою визначається також значення K_m^{app} . Як раніше було зазначено, виходячи з рівняння (37), при $[M]_0 \rightarrow 0$ K_m^{app} прямує до граничного значення, що дорівнює $\frac{k_{-3} K_m^{EMS}}{k_2}$. Ця величина складає 20,1. Як видно з рис. 7, при малих концентраціях активатора значення K_m^{app} практично досягає свого граничного рівня і при $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-9}$ М її значення складає 6,61 М, тобто в 3 рази менше, ніж передбачається рівнянням (37). В свою чергу рівняння (95), що було отримане для умов $[M]_0 \ll [E]_0$, показує, що при малих концентраціях активатора величина K_m^{app} справді не залежить від $[M]_0$, і її величина складає 6,71. Як видно, і в даному випадку, застосовуючи рівняння (37) для розрахунку K_m^{app} в умовах, що знаходяться за межами припущень, зроблених при його виведенні, отримуємо неправильні результати.

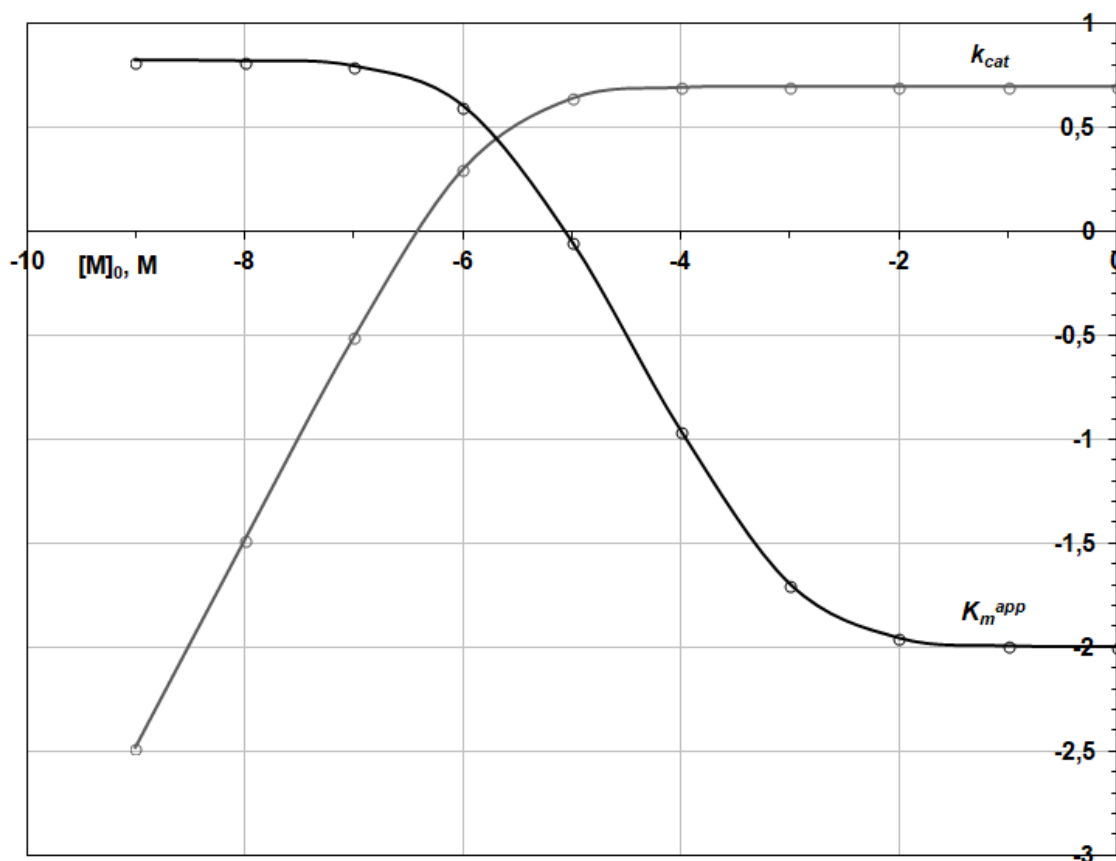


Рис. 7. Загальний вигляд залежностей k_{cat} і K_m^{app} від концентрації активатора $[M]_0$ (в логарифмічних координатах) для реакцій, що протікають за механізмом (30), на прикладі реакції 28 (при концентрації ензиму 1 мкМ, як у дослідженні Ченса). Для даної реакції ($K_s^M = 1 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 1,005 \cdot 10^{-2}$ М, $\frac{k_3([E]_0 + K_s^M)}{k_3[E]_0 + k_2} K_m^{EMS} = 6,7067$) K_m^{app} зменшується зі зростанням $[M]_0$ (оскільки $k_2 < k_3$) від значень, близьких до $\frac{k_3([E]_0 + K_s^M)}{k_3[E]_0 + k_2} K_m^{EMS}$, до значень, близьких до K_m^{EMS} ; k_{cat} при підвищенні $[M]_0$ спочатку зростає лінійно, а потім при великих концентраціях активатора досягає граничного значення, близького до k_2 .

Для реакцій, що відбуваються за механізмом (30), K_m^{app} може не тільки знижуватись при зростанні концентрації активатора (як на рис. 7), але й збільшуватись (подібно тому, як це показано на рис. 6): все визначається співвідношенням констант k_2 і k_3 . Якщо $k_2 > k_3$, то K_m^{app} буде збільшуватись, якщо ж

$k_2 < k_{-3} - K_m^{app}$ буде зменшуватись, при рівності k_2 і k_{-3} уявна константа Міхаеліса K_m^{app} не буде залежати від концентрації активатора. Відсутня залежність K_m^{app} від концентрації активатора також в умовах ($k_2 = k_{-3}$, $k_{-1} \gg k_2$; або $k_2 = k_{-3}$, $[M]_0 \gg K_s^M$; або $[M]_0 \gg \frac{k_2}{k_3}$, $[M]_0 \gg K_s^M$), при виконанні яких величина K_m^{app} може бути близькою за значенням до суми $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$.

Величини K_m^{app} та k_{cat} можуть одночасно змінюватись пропорційно концентрації активатора, коли виконується умова $\frac{k_2}{k_3} \gg [M]_0 \gg \frac{k_{-3}}{k_3}$, причому як у випадку, коли рівняння (38) точно виконується (якщо $k_{-3} = \frac{k_2 K_s}{K_{EMS}}$), так і у випадку коли воно не виконується.

Одержані результати свідчать про те, що в межах механізму (30) k_{cat} може збільшуватись пропорційно концентрації активатора при умові, що $[M]_0 \ll \frac{k_2}{k_3}$. При цьому K_m^{app} може збільшуватись (при $k_2 > k_{-3}$) зі зростанням концентрації активатора при додатковій умові $[M]_0 \gg K_s^M$, або зменшуватись при $k_2 < k_{-3}$, а при додатковій умові $[M]_0 \ll K_s^M$ (або при $k_2 = k_{-3}$) не буде залежати від концентрації активатора. Можна бачити також, що для даного механізму умова $k_{cat} \gg k_{-1}$ не має практичного значення.

Таким чином, очевидно, що знову тільки один механізм (79) характеризується лінійною залежністю k_{cat} та K_m^{app} від концентрації активатора при відносно високих його концентраціях (коли $k_{cat} \gg k_{-1}$). В інших досліджених механізмах величини k_{cat} та K_m^{app} також можуть змінюватись пропорційно концентрації активатора, але це може спостерігатись лише при відносно низьких концентраціях активатора та при певних сприятливих співвідношеннях параметрів процесу. В загальному ж випадку робити висновок про те, що якщо k_{cat} змінюється пропорційно концентрації

активатора, то й K_m^{app} має змінюватись пропорційно концентрації активатора, помилково, хоча, виходячи з рівняння (38) здається саме так (звісно, при умові, що $k_{cat} \gg k_{-1}$).

Внаслідок проведеного аналізу можливих механізмів можна помітити, що для реакцій, які відбуваються з утворенням потрійних комплексів ензим-активатор-субстрат (30, 40, 55), властивою є гіперболічна залежність граничної швидкості від концентрації активатора. В той же час для реакцій, що відбуваються без утворення потрійного комплексу (79, 82, і 87, оскільки для неї, здається, при відносно невисоких концентраціях активатора $\frac{k_2[M]_0}{k_3}$ має бути значно менше, ніж $1 + K_s^{ES}$), гранична швидкість є пропорційною концентрації активатора. Ченс наводить тільки лінійну залежність k_{cat} від концентрації активатора (аскорбінова кислота) у вузьких концентраційних рамках 0,2–3 мкМ (концентрація ензиму була 1 мкМ, а субстрату – 4 мкМ) [31].

Навпаки, Манн [32] демонструє залежності початкової швидкості від концентрації субстрату для різних активаторів у широкому діапазоні їх концентрацій (концентрація ензиму 16,6 нМ). У випадку з малахітовим зеленим швидкість у максимумі зростає при збільшенні концентрації активатора від 0,25 до 1 мМ (діапазон концентрацій субстрату – приблизно від 10 мкМ до 10 мМ). А у випадку гваякола швидкість в максимумі поступово зростає при збільшенні його концентрації від 0,5 мМ до 40 мМ (діапазон концентрацій субстрату – приблизно від 200 мкМ до 1 М), але при 80 мМ швидкість у максимумі залишається точно такою ж, як при 40 мМ, що може бути розцінено, як відсутність пропорційності між k_{cat} і концентрацією активатора. Якщо й інші активатори (зокрема, малахітовий зелений) ведуть себе подібним чином, то з великою долею вірогідності можна говорити про те, що в подібних реакціях утворюється потрійний комплекс, і що механізм досліджуваної реакції не відповідає механізмам (79), (82), і (87).

Враховуючи все вищевикладене можна зробити висновок, що всі співпадіння за величиною розрахованих Ченсом [31] різними способами «констант Міхаеліса» та кореляція цих значень з величинами K_m^{app} , отриманими іншими дослідниками, є

просто випадковими співпадіннями. Цей висновок базується на наступних міркуваннях:

1. Якщо за допомогою істинної константи k_2 за рівнянням (8) можна розрахувати K_m , то, при використанні уявної константи k_{cat} , по аналогічному за виглядом рівнянню (38) в загальному випадку не можна розрахувати K_m^{app} . Для того, щоб використання рівняння (38) не викликало заперечень, необхідно або довести, що досліджувана реакція протікає за механізмом (79), або довести, що рівняння (38) може використовуватись для розрахунку K_m^{app} для будь-яких реакцій, що відбуваються за участю активаторів, або, хоча б для декількох можливих механізмів досліджуваної реакції.

2. Розраховане значення «константи Міхаеліса» не можна без вагомих підстав (а Ченс не наводить ніяких даних про залежність експериментально визначеної K_m^{app} від концентрації активатора для досліджуваної реакції) збільшувати пропорційно концентрації активатора. Тому співпадіння за величиною збільшеної таким чином «константи Міхаеліса» з K_m^{app} , визначеною Манном, здається практично неймовірним, враховуючи той факт, що, як було показано вище, в загальному випадку ці константи не можуть бути рівними, якщо досліджувана реакція не протікає за механізмом (79).

3. Для аналізу складної реакції, яка не підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен по субстрату (а, можливо, і по активатору) Ченс використовує просте рівняння Міхаеліса-Ментен.

Спроби використовувати константу k_{cat} в рівнянні (8) замість k_2 приводять до того, що розраховані «константи Міхаеліса» мають незрозумілу природу і вони, як правило, не співпадають з уявними константами Міхаеліса, як має бути у відповідності з рівнянням (38). А оскільки рівняння (38) в загальному випадку не виконується, то й стверджувати, що уявну константу Міхаеліса можна записувати у такому вигляді, або що при високих концентраціях активатора дане рівняння може перетворюватись на рівняння $K_k = \frac{k_{cat}}{k_1}$, немає ніяких підстав. Такі співвідношення

можуть виконуватись тільки для окремих механізмів або при сприятливих співвідношеннях параметрів ензиматичного процесу.

Можна перевірити, чи перетворюється K_m^{app} на $\frac{k_{cat}}{k_1}$ при виконанні умови

$K_s \rightarrow 0$. Наприклад, для механізму (55) $K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{[M]_0}{K_s^{EM}} \right)$, для механізму (30)

$K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{K_s^M}{[M]_0} \right)$ і для механізму (82) $K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M} \right)$. Можна помітити,

що в цих механізмах уявна константа Міхаеліса K_m^{app} може бути значно більшою за $\frac{k_{cat}}{k_1}$ ($\frac{k_{cat}}{k_1}$ є нижньою межею K_m^{app}), проте в певних інтервалах концентрацій

активатора K_m^{app} може наближатись за величиною до співвідношення $\frac{k_{cat}}{k_1}$. Що ж

стосується інших розглянутих механізмів, то в них при $K_s \rightarrow 0$ K_m^{app} перетворюється на $\frac{k_{cat}}{k_1}$.

Можна також використати інший підхід, який був представлений Келеті [22] (хоча згадування при цьому саме пероксидази підкреслює, що першоджерелом є робота Ченса [31]): дослідити чи перетворюється K_m^{app} на $\frac{k_{cat}}{k_1}$ при високих

концентраціях активатора, тобто при $[M]_0 \rightarrow \infty$. В такому підході можна побачити певне протиріччя. З математичної точки зору, аналізуючи рівняння для початкової швидкості (38) реакції, що протікає за механізмом (79), який якраз і досліджував Ченс, здається, що збільшуючи концентрацію активатора можна завжди (тобто при будь-яких співвідношеннях констант швидкості k_2 та k_{-1}) досягти того, що k_{cat} (тобто $k_2[M]_0$) буде значно перевищувати k_{-1} , а тому й K_m^{app} перетвориться на $\frac{k_{cat}}{k_1}$. Проте в

експериментальних умовах підвищення концентрації активатора не може бути необмеженим, а тому в умовах, коли значення констант швидкості k_2 та k_{-1} є

приблизно рівними, практично неможливо досягти того, щоб k_{cat} значно перевищувала б k_{-1} , а тому в таких умовах K_m^{app} не може бути виражена, як $\frac{k_{cat}}{k_1}$.

Для реакцій, що протікають за механізмом (30), при $[M]_0 \rightarrow \infty$

$$K_m^{app} = K_m^{EMS} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1}$$

(оскільки, внаслідок гіперболічної залежності k_{cat}

від $[M]_0$, при зростанні концентрації активатора k_{cat} не зростає необмежено, а наближається за величиною до свого граничного значення, яким є k_2). Аналогічний

результат маємо для механізму (87): при $[M]_0 \rightarrow \infty$ $K_m^{app} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_{cat}}{k_1}$ (в даному

випадку $k_{cat} = k_3$). Для механізму (55) при $[M]_0 \rightarrow \infty$ $K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \frac{[M]_0}{K_s^{EM}}$ (де $k_{cat} = k_2$), а

для механізму (82) – $K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1} \left(1 + \frac{[M]_0}{K_s^M} \right)$. Подібно до механізму (79), у випадку

механізму (40) при $[M]_0 \rightarrow \infty$ маємо: $K_m^{app} = \frac{k_{cat}}{k_1}$. Таким чином можна бачити, що

K_m^{app} в загальному випадку не може бути виражена, як $\frac{k_{cat}}{k_1}$ при високих

концентраціях активатора.

1.7. Чи існує між уявною константою Міхаеліса та уявною граничною швидкістю лінійна залежність, завдяки якій можна визначити субстратну константу?

Твердження ж Ченса, що при низьких концентраціях активатора уявна константа Міхаеліса K_m^{app} є константою дисоціації K_s ензим-субстратного комплексу ES (для реакцій, в яких субстрат практично не перетворюється у відсутності активатора) перевіримо на іншому прикладі, а саме: на залежності, що впливає з рівняння (38) і пов'язує константу Міхаеліса з константою дисоціації та граничною швидкістю. Цю залежність рекомендують використовувати (у вигляді графіка

функції K_m^{app} від V^{app}) для розрахунку всіх констант швидкості, що входять в рівняння Міхаеліса-Ментен [4, 5, 18]:

$$K_m^{app} = K_s + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0} \quad (96)$$

Вважається, що це рівняння може використовуватись у випадку дослідження реакцій, що відбуваються з участю активаторів [5]. При цьому логіка така: без активатора реакція не йде (тобто утворюється тільки ензим-субстратний комплекс ES , який без активатора не здатен розпадатись до продуктів, принаймні, з помітною швидкістю), й ензим-субстратний комплекс ES знаходиться у рівновазі з незв'язаними формами ензиму і субстрату, що дозволяє описувати цю рівновагу за допомогою константи дисоціації цього комплексу K_s ; застосування активатора дозволяє, як кажуть, збільшувати швидкість розкладу ензим-субстратного комплексу ($k_{cat} = k_2[M]_0$), причому вважають, що ця швидкість лінійно зростає зі збільшенням концентрації активатора (а, відповідно збільшується й константа Міхаеліса K_m^{app}); тому, зменшуючи концентрацію активатора до нуля, можна дійти до точки, коли розпад ензим-субстратного комплексу ES до продукту P припиниться і в цей момент K_m^{app} буде чисельно рівною константі дисоціації ензим-субстратного комплексу K_s , оскільки константа швидкості розпаду ензим-субстратного комплексу ES у відсутності активатора практично дорівнює нулю. Графічно це виглядає наступним чином: для різних концентрацій активатора (і за умов незмінної концентрації ензиму) будують графік залежності K_m^{app} від V^{app} й екстраполюють одержану залежність до нульової граничної швидкості; при цьому на осі ординат пряма відсікає відрізок, величина якого, як вважають, чисельно рівна константі дисоціації ензим-субстратного комплексу K_s (метод Слейтера-Боннера [5, 15, 18]).

З першого погляду логіка міркувань здається правильною, але перевіримо справедливість рівняння (96) на тих же прикладах, що й раніше.

З рівняння (47), яке описує кінетику реакції, що протікають за механізмом (40), впливає наступне: коли концентрація активатора наближається до нуля,

гранична швидкість також прямує до нуля, а K_m^{app} наближається до K_s . Однак, пам'ятаючи, що екстраполяція за межі діапазону концентрацій, для якого було виведене кінетичне рівняння, може привести до помилкових результатів, перевіримо отриманий висновок за допомогою розрахунків. На рис. 8 наведені результати розрахунків реакції 6 (табл. 1). Здається, що графік чудово узгоджується з рівнянням (96): точки добре вкладаються на пряму, зі збільшенням V^{app} збільшується й K_m^{app} , тангенс кута нахилу прямої дорівнює $\frac{1}{k_1[E]_0}$ і, дійсно, на осі ординат пряма відсікає відрізок, величина якого рівна K_s . Однак насправді все набагато складніше.

На рис. 9 зображений графік залежності K_m^{app} від V^{app} для реакції 4 (табл. 1). Тут також точки добре вкладаються на пряму лінію і відрізок, що відсікається нею на осі ординат, за величиною дорівнює K_s , проте пряма має негативний тангенс кута нахилу, чого у відповідності з рівнянням (96) не може бути, оскільки всі параметри рівняння є додатними числами. Крім знаку ще й числове значення тангенсу ($-9,998 \cdot 10^6$) значно відрізняється від $\frac{1}{k_1[E]_0}$, числ значення складає $1 \cdot 10^3$.

В чому тут справа стає зрозумілим після аналізу рівняння (47). Тангенс кута нахилу прямої можна розрахувати наступним чином: один кінець прямої буде визначатись значеннями $K_{m,0}^{app}$ та V_0^{app} при $[M]_0 \rightarrow 0$, другий – значеннями $K_{m,\infty}^{app}$ та V_∞^{app} , наприклад, при $[M]_0 \rightarrow \infty$, а співвідношення величин $K_{m,\infty}^{app} - K_{m,0}^{app}$ і $V_\infty^{app} - V_0^{app}$ дає тангенс кута нахилу прямої. Для механізму (40): $V_0^{app} = 0$, $K_{m,0}^{app} = K_s$, $V_\infty^{app} = k_2[E]_0$, $K_{m,\infty}^{app} = \frac{k_2}{k_1}$.

Після розрахунку тангенсу кута нахилу залежності K_m^{app} від V^{app} виявляється, що для реакцій, які протікають за даним механізмом, він складає не $\frac{1}{k_1[E]_0}$, а

$$tg\alpha = \frac{\frac{k_2}{k_1} - K_s}{k_2[E]_0} = \frac{1}{k_1[E]_0} - \frac{K_s}{k_2[E]_0} = \frac{k_2 - k_{-1}}{k_1 k_2 [E]_0} = \frac{1}{k_1[E]_0} \left(1 - \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \quad (97)$$

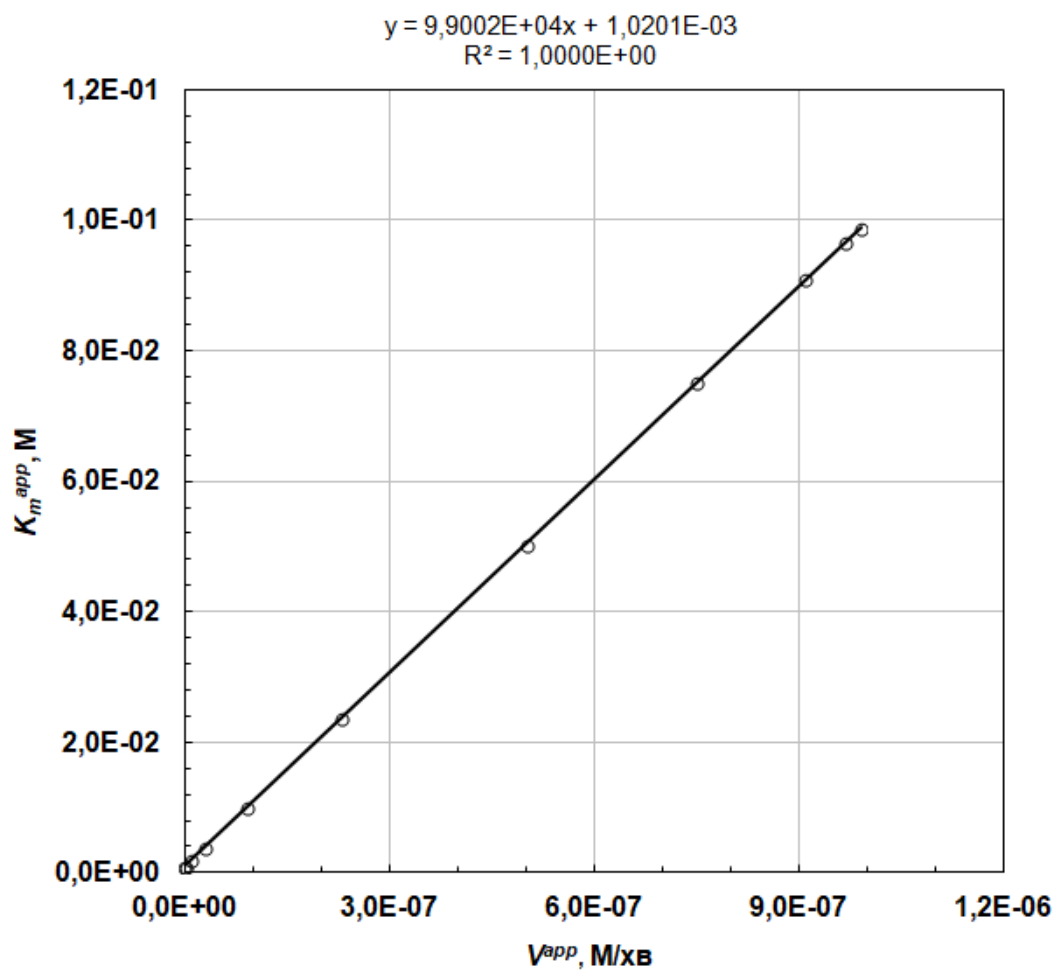


Рис. 8. Лінійна залежність K_m^{app} від V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (40), на прикладі реакції 6 (табл. 1). Для даної реакції ($K_m^{EMS} = 1,001 \cdot 10^{-3}$ М, $K_s = 1 \cdot 10^{-3}$ М), коли $[M]_0$ прямує до нуля, V^{app} також прямує до нуля, а K_m^{app} прямує до K_s ; тангенс кута нахилу прямої має позитивне значення, оскільки $k_2 > k_1$.

Таким чином, взаємозв'язок між K_m^{app} і V^{app} для реакцій, що протікають по механізму (40), виражається не рівнянням (96), а наступним співвідношенням:

$$K_m^{app} = K_s + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0} \left(1 - \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \quad (98)$$

З виразу для тангенсу (97) випливає, що в залежності від співвідношення констант k_2 і k_{-1} тангенс кута нахилу може мати позитивний або негативний знак, а для реакції 4, тангенс, у відповідності до рівняння (97), має значення $-9,999 \cdot 10^6$, яке, як видно, чудово узгоджується зі значенням, представленим на рис. 9.

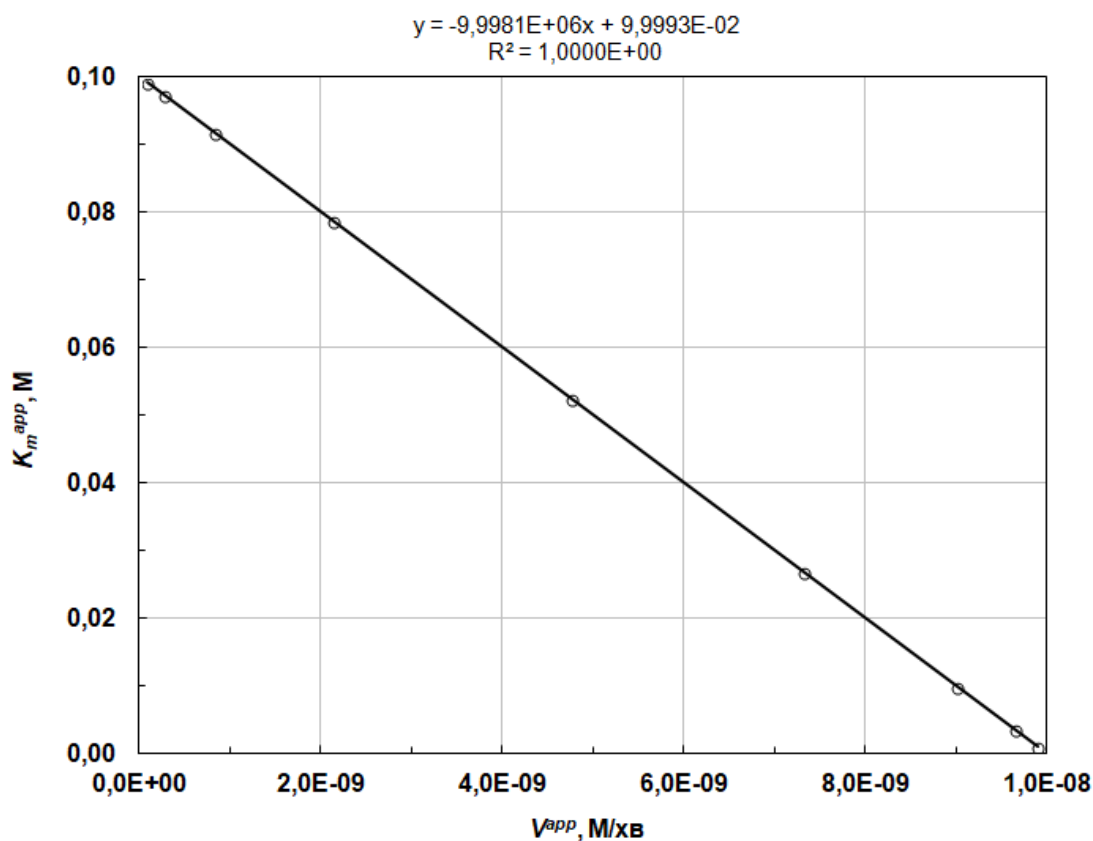


Рис. 9. Лінійна залежність K_m^{app} від V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (40), на прикладі реакції 4 (табл. 1). Для даної реакції ($K_s = 0,1 \text{ M}$, $K_m^{EMS} = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) коли $[M]_0$ прямує до нуля, V^{app} також прямує до нуля, а K_m^{app} прямує до K_s ; тангенс кута нахилу прямої має негативне значення, оскільки $k_2 < k_1$.

Як можна бачити, в результаті використання рівняння (96) замість рівняння (98) для розрахунку константи швидкості k_1 , вона може визначатись з суттєвою похибкою.

Зустрічаються також випадки, коли на осі ординат пряма відсікає відрізок, величина якого значно відрізняється від K_s . З одним з них зіштовхуємось при дослідженні реакції 7 (рис. 10), яка схожа на досліджувану Ченсом [31] тим, що V^{app} й K_m^{app} зростають пропорційно концентрації активатора, проте розрахована величина K_s відрізняється (в більшу сторону) від істинної в 200 разів. Можливо такий результат є наслідком екстраполяції за межі діапазону концентрацій, для якого було виведене кінетичне рівняння (47). Але, оскільки для досліджуваних механізмів не вдається вивести рівняння початкової швидкості в умовах, не обмежених певним

співвідношенням концентрацій $[E]_0$ та $[M]_0$, що було б придатним для аналізу, будемо визначати граничне значення K_m^{app} при $[M]_0 \rightarrow 0$ з рівнянь, виведених в умовах, коли $[E]_0 \ll [M]_0$.

Таким чином, при дослідженні реакцій, що відбуваються за механізмом (40), для розрахунку константи k_1 не можна використовувати рівняння (96) (оскільки тангенс кута нахилу визначається рівнянням (97)). Воно може приблизно виконуватись тільки при умові $k_{-1} \ll k_2$, але необхідно пам'ятати, що при цьому можливі випадки, коли значення K_s визначається з великою похибкою.

Для реакцій, що протікають за механізмом (79), рівняння (96) може використовуватись для побудови графіка і визначення значення K_s та інших констант – індивідуальних кінетичних констант швидкості.

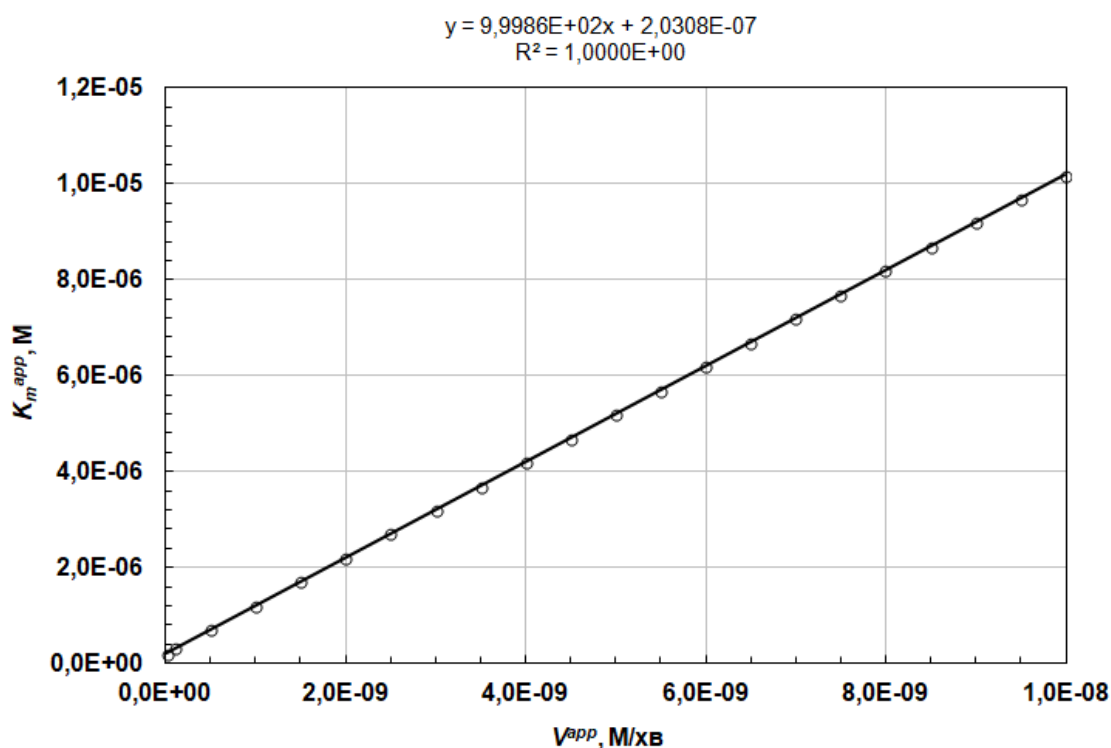


Рис. 10. Лінійна залежність K_m^{app} від V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (40), на прикладі реакції 7 (табл. 1). Для даної реакції ($K_s = 1 \cdot 10^{-9}$ М, $K_m^{EMS} = 1$ М) пряма відсікає на осі ординат відрізок, величина якого в 200 разів більша, ніж K_s .

Для реакцій, що протікають за механізмом (87), гранична швидкість зменшується до нуля при зменшенні концентрації активатора, проте K_m^{app} при цьому прямує до $\frac{K_s K_s^{ES}}{1 + K_s^{ES}}$. Тому відрізок, що відсікається на осі ординат, може бути чисельно рівним K_s тільки при умові $K_s^{ES} \gg 1$. Тангенс кута нахилу залежності K_m^{app} від V^{app} для даної реакції дорівнює не $\frac{1}{k_1 [E]_0}$, а

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\left(K_s + \frac{k_3}{k_1} \right) - \frac{K_s K_s^{ES}}{1 + K_s^{ES}}}{k_3 [E]_0} = \frac{1}{k_1 [E]_0} + \frac{K_s}{k_3 [E]_0 (1 + K_s^{ES})} = \frac{1}{k_1 [E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_3 + k_{-3}} \right) \quad (99)$$

Таким чином, взаємозв'язок між K_m^{app} і V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (87), виражається не рівнянням (96), а наступним співвідношенням:

$$K_m^{app} = \frac{K_s K_s^{ES}}{(1 + K_s^{ES})} + \frac{V^{app}}{k_1 [E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_3 + k_{-3}} \right) \quad (100)$$

Ми пересвідчилися, що при дослідженні реакцій, що відбуваються за механізмом (87), в загальному випадку рівняння (96) не може застосовуватись для розрахунку констант k_1 та K_s . Воно може бути справедливим лише в умовах, коли $k_{-1} \ll (k_3 + k_{-3})$ та $k_3 \ll k_{-3}$. З рівняння (100) видно, що для реакцій, що протікають за механізмом (87), тангенс кута нахилу прямої завжди має позитивний знак.

При проведенні аналізу за рівнянням (63) реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом (55), виявляється, що залежність K_m^{app} від V^{app} нелінійна (в граничному випадку – квадратична), тому важко виконати лінійну екстраполяцію в область низьких концентрацій активатора з метою розрахунку K_s . На рис. 11 показана така нелінійна залежність K_m^{app} від V^{app} для реакції 14 (табл. 1). Можна зробити висновок, що для реакцій, що протікають за механізмом (55), рівняння (96)

в загальному випадку не може використовуватись. Проте є певні умови, при дотриманні яких воно може приблизно виконуватись, наприклад: $[M]_0 \ll K_s^{EM}$ та $k_{-1} \ll k_2$.

Для реакцій, що протікають за механізмом (82), рівняння (96) також в загальному випадку не може використовуватись для побудови графіка та визначення константи дисоціації комплексу ES , оскільки, як і в попередньому випадку, залежність K_m^{app} від V^{app} нелінійна. Рівняння (96) може приблизно виконуватись тільки при умові виконання співвідношень $[M]_0 \ll K_s^M$ і $k_{cat} \gg k_{-1}$, коли залежності K_m^{app} і V^{app} від концентрації активатора мають бути лінійними.

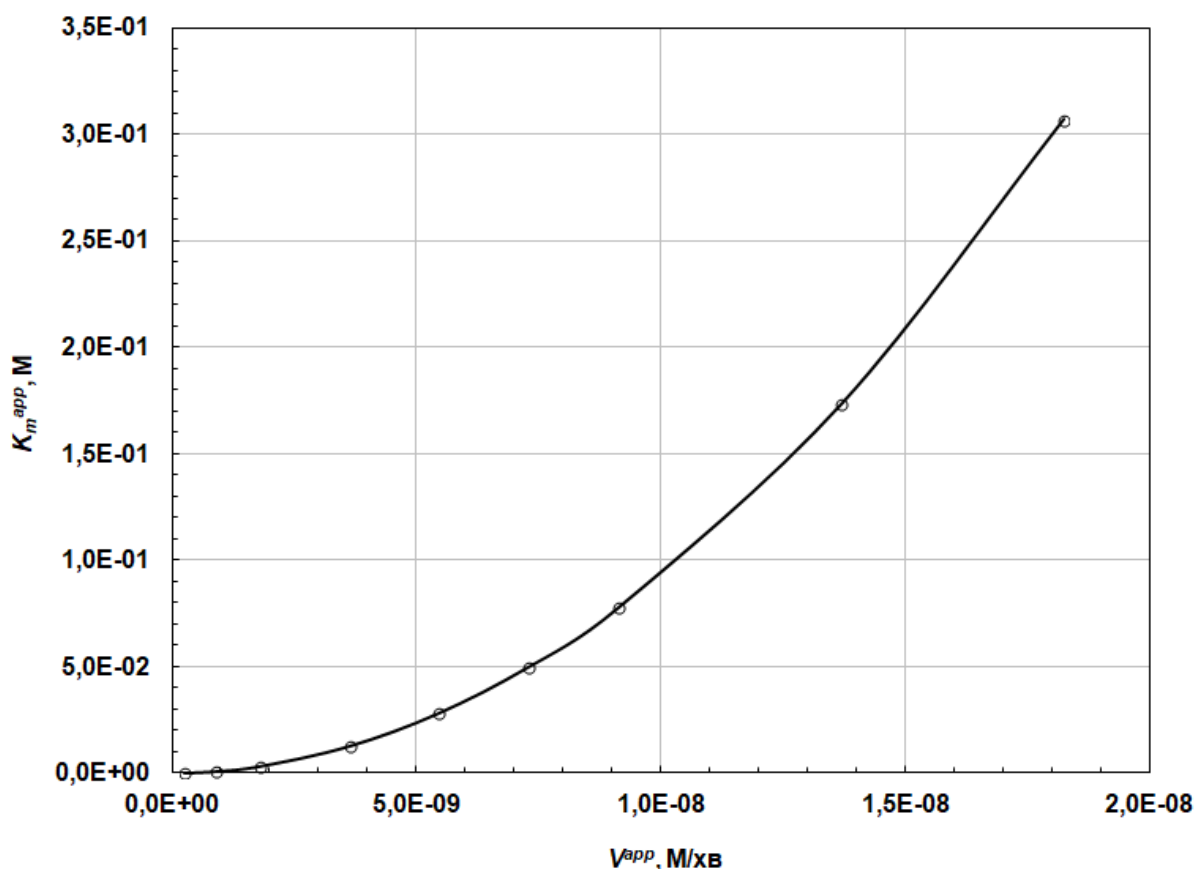


Рис. 11. Квадратична залежність K_m^{app} від V^{app} для реакції 14 (табл. 1), що протікає за механізмом (55). Для даної реакції ($K_s = 1 \cdot 10^{-8}$ М, $K_m^{EMS} = 0,11$ М, $K_s^{EM} = 1 \cdot 10^{-7}$ М) квадратична залежність K_m^{app} від V^{app} спостерігається, коли одночасно виконуються умови $[M]_0 \ll K_m^{EMS}$, $k_{cat} \gg k_{-1}$ і $[M]_0 \gg K_s^{EM}$.

Тепер проаналізуємо випадок, коли ензим сам не каталізує перетворення субстрату, але присутність активатора сприяє перетворенню субстрату до продуктів. При цьому ми можемо вважати, що перетворення відбувається через формування ензим-субстратного комплексу ES , розпаду якого допомагає активатор, проте безпосередньо утворення комплексу ES довести не можемо (або вважаємо, що по іншому реакція протікати не може). Реальний же механізм досліджуваної реакції виражається схемою (30).

Для реакції, що розглядається, K_m^{app} і V^{app} змінюються при зміні концентрації активатора, тому за рівнянням (96) можна побудувати графік залежності K_m^{app} від V^{app} і розрахувати всі кінетичні константи, проте ці константи не будуть мати нічого спільного з тими константами, які ми хотіли визначити, оскільки в даному механізмі немає жодної стадії, аналогічній тим, що складають механізм (17), в тому числі й стадії утворення комплексу ES .

Як впливає з рівняння (37), V^{app} прямує до нуля при зменшенні $[M]_0$; при цьому K_m^{app} прямує до значення $\frac{k_3 K_s^M K_m^{EMS}}{k_2}$ чи $\frac{k_{-3} K_m^{EMS}}{k_2}$. Звідси впливає, що величина відрізка, що відсікається на осі ординат, в загальному випадку не відповідає ні константі дисоціації $\frac{k_{-1}}{k_1}$, ні константі дисоціації $\frac{k_{-3}}{k_3}$, ні, тим більше, «константі дисоціації ензим-субстратного комплексу», який в рамках даної реакції не утворюється. Тільки у випадку, коли для механізму (30) виконуються співвідношення констант $k_{-1} = k_{-3}$ і $k_{-1} \ll k_2$, або $k_2 = k_{-3}$ і $k_{-1} \gg k_2$, або $\frac{1}{k_{-1}} = \frac{1}{k_{-3}} - \frac{1}{k_2}$ (рис. 12, крива 1), величина відрізка, що відсікається на осі ординат, буде рівною константі дисоціації $\frac{k_{-1}}{k_1}$, а при виконанні співвідношень $k_1 = k_3$ і $k_{-1} \ll k_2$, або $\frac{k_1}{k_3} - \frac{k_{-1}}{k_2} = 1$ (рис. 12, крива 2) – константі дисоціації $\frac{k_{-3}}{k_3}$. Тангенс кута нахилу

залежності K_m^{app} від V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (30), також

дорівнює не $\frac{1}{k_1[E]_0}$, а

$$tg\alpha = \frac{K_m^{EMS} - \frac{k_{-3}}{k_2} K_m^{EMS}}{k_2[E]_0} = \frac{1}{k_1[E]_0} + \frac{K_s}{k_2[E]_0} - \frac{k_{-3}}{k_2[E]_0} \left(\frac{1}{k_1} + \frac{K_s}{k_2} \right) = \frac{1}{k_1[E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2} \right) \left(1 - \frac{k_{-3}}{k_2} \right) \quad (101)$$

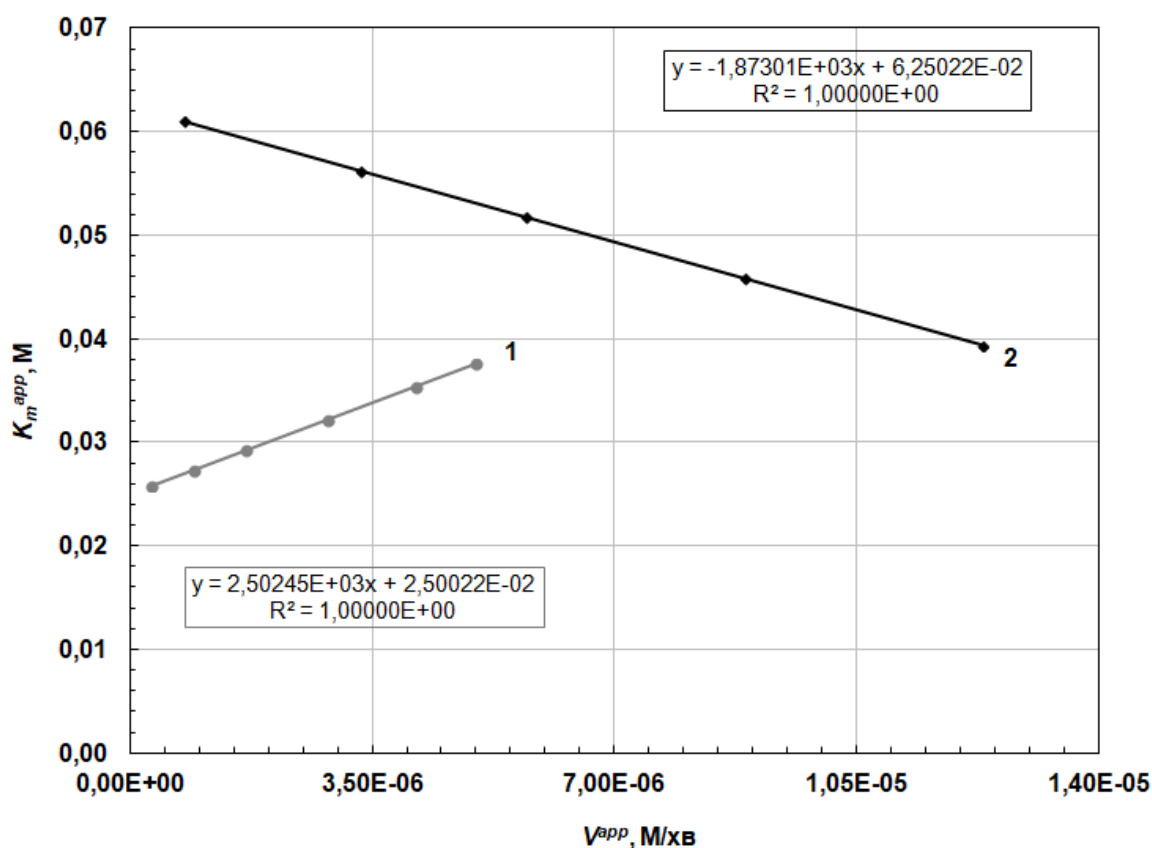


Рис. 12. Лінійна залежність K_m^{app} від V^{app} : 1 – реакції 29 і 2 – реакції 30, що протікають за механізмом (30). Для реакції 29 ($K_s^M = 5 \cdot 10^{-3}$ М, $K_m^{EMS} = 5 \cdot 10^{-2}$ М, $K_s = 2,5 \cdot 10^{-2}$ М) пряма 1 відсікає на осі ординат відрізок, чисельно рівний K_s . Для реакції 30 ($K_s^M = 6,25 \cdot 10^{-2}$ М, $K_m^{EMS} = 2,5 \cdot 10^{-2}$ М, $K_s = 2,34375 \cdot 10^{-2}$ М) пряма 2 відсікає на осі ординат відрізок, чисельно рівний K_s^M .

Таким чином, взаємозв'язок між K_m^{app} і V^{app} для реакцій, що протікають за механізмом (30), виражається не рівнянням (96), а, більш точно, наступним співвідношенням:

$$K_m^{app} = \frac{k_{-3}K_m^{EMS}}{k_2} + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_2}\right) \left(1 - \frac{k_{-3}}{k_2}\right) \quad (102)$$

Як можна бачити, для реакцій, що протікають за механізмом (30), тангенс кута нахилу прямої може мати як позитивний, так і негативний знак (в залежності від величини співвідношення констант швидкості k_{-3} та k_2), і в загальному випадку рівняння (96) не може використовуватись для визначення істинних констант дисоціації комплексів EM і EMS (комплекс ES в даній реакції не утворюється).

Можна зробити висновок, що в загальному випадку рівняння (96) не може використовуватись при дослідженнях реакцій, що відбуваються з участю активаторів: з проаналізованих в даній роботі механізмів, тільки для реакцій, що протікають за механізмом (79), розрахунок K_s і індивідуальних констант швидкості може бути проведений з допомогою рівняння (96).

Для реакцій з участю активаторів, що відбуваються у відповідності з іншими механізмами, рівняння (96) може лише приблизно виконуватись при дотриманні певних сприятливих співвідношень між параметрами досліджуваної реакції. Для того, щоб його застосовувати, необхідно впевнитись в тому, що в результаті реакції комплекс ES дійсно утворюється, а також проаналізувати реальний механізм досліджуваної реакції, з тим, щоб встановити, чи справді залежність K_m^{app} від V^{app} прямолінійна, чи дійсно ця пряма відсіче на осі ординат відрізок, рівний за величиною істинній константі дисоціації K_s комплексу ES , і чи дійсно тангенс кута нахилу даної прямої буде виражатись величиною $\frac{1}{k_1[E]_0}$. В протилежному випадку, визначаючи графічно K_s та індивідуальні константи швидкості, ми можемо отримати абсолютно інші їх числові значення і на основі цих даних зробити неправильні висновки.

1.8. Підсумок роботи

Дослідження, описане в [31], може бути прикладом того, як недостатньо чітке розуміння різниці між істинними та уявними константами швидкості і константами Міхаеліса в підсумку може привести до того, що увесь план експерименту, отримані результати та зроблені висновки можуть бути поставлені під знак питання.

Адже експеримент, описаний в [31], планувався так, щоб розрахувати окремо константи k_1 , k_{-1} і k_{cat} та з них розрахувати константу Міхаеліса K_m^{app} за рівнянням

$$(38). \text{ Проте якщо з допомогою істинної константи } k_2 \text{ за рівнянням } K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

можна розрахувати істинну константу Міхаеліса K_m , то, використовуючи уявну константу k_{cat} , за аналогічним по вигляду рівнянням $K_m^{app} = \frac{k_{cat} + k_{-1}}{k_1}$ в загальному випадку уявна константа Міхаеліса не може бути розрахована.

Хоча формально можна записати механізми реакцій, що відбуваються за участю активаторів (30), (40), (55), (79), (82), (87) у вигляді схеми (17) і отримати вираз для уявної константи Міхаеліса у вигляді рівняння (38) (як це і було зроблено в [31]), проте проведений нами аналіз показує, що рівняння (38) може використовуватись для розрахунку уявної константи Міхаеліса тільки у випадку дослідження реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом (79). Для таких реакцій воно може точно виконуватись при будь-яких значеннях констант швидкості та концентрації активатора.

Нами показано, що рівняння (38) може точно виконуватись і для реакцій, що протікають за механізмом (30) при дотриманні співвідношення констант швидкості

$$k_{-3} = \frac{k_2 K_s}{K_m^{EMS}} \text{ та при будь-якій концентрації активатора, а також для реакцій, що}$$

протікають за механізмом (55), але лише при певній концентрації активатора

$$[M]_0 = \frac{k_{-1}}{k_2} (K_s^{EM} - K_m^{EMS}).$$

Крім того для кожного проаналізованого нами механізму існує певний набір співвідношень кінетичних параметрів, при яких значення константи K_m^{app} може бути досить близьким до суми $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$. В інших умовах уявна константа Міхаеліса

K_m^{app} не може бути виражена, як сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$.

Оскільки в загальному випадку K_m^{app} не може бути виражена, як сума $K_s + \frac{k_{cat}}{k_1}$, то не можна стверджувати, що при низьких концентраціях активатора

K_m^{app} перетворюється на K_s (наприклад, в таких умовах $K_m^{app} = \frac{K_s K_s^{ES}}{1 + K_s^{ES}}$ для механізму

(87) та $K_m^{app} = \frac{k_{-3} K_m^{EMS}}{k_2}$ для механізму (30)), а при високих – на $\frac{k_{cat}}{k_1}$ і в такому

випадку записуватись як $K_k = \frac{k_{cat}}{k_1}$ (як це показано нами для механізмів (30), (55) та

(82)).

Крім того, результати дослідження суттєво залежать від обраного для аналізу механізму. Ченс не звернув особливої уваги на аналіз даних, що стосуються механізму досліджуваної реакції, а обрав досить простий механізм (79), незважаючи на те, що було відомо, що в ході реакції утворюється більше, ніж один комплекс, що швидкість реакції проходить через максимум при зростанні концентрації субстрату, а також деяких активаторів, а це означає, що вона не може бути описана простим рівнянням Міхаеліса-Ментен (14). Незважаючи на це в роботі [31] робиться висновок, що «кінетика ензим-субстратного сполучення добре узгоджується з математичним рішенням теорії Міхаеліса-Ментен (Бріггса-Холдейна), отриманим для експериментальних значень концентрацій та констант швидкості реакції» [31].

Нами показано, що уявлення про те, що якщо k_{cat} пропорційна концентрації активатора, то й K_m^{app} має змінюватись пропорційно концентрації активатора в умовах, коли $k_{cat} \gg k_{-1}$, є помилковим. Серед досліджених нами механізмів лише для

одного механізму (79) є характерною лінійна залежність k_{cat} та K_m^{app} від концентрації активатора при відносно високих його концентраціях (коли $k_{cat} \gg k_{-1}$). В інших досліджених механізмах k_{cat} та K_m^{app} також можуть змінюватись пропорційно концентрації активатора, але це відбувається лише при відносно низьких концентраціях активатора та при певних сприятливих співвідношеннях параметрів процесу. Так що порівнювати значення уявних констант Міхаеліса, отриманих при різних концентраціях активатора, необхідно вкрай обережно.

Показано також, що уявні константи Міхаеліса не можуть бути записані у вигляді рівняння $K_m^{app} = K_s + \frac{V^{app}}{k_1[E]_0}$ і використовуватись для розрахунку констант швидкості, оскільки і величина тангенсу кута нахилу, і відрізок, що відсікається на осі ординат, залежать від конкретного механізму і можуть відрізняються від $\frac{1}{k_1[E]_0}$ та K_s відповідно. Рівняння (96) може виконуватись тільки для окремих механізмів або при сприятливих співвідношеннях параметрів ензиматичного процесу.

Хоча робота Ченса була опублікована у 1943 році, вона залишила помітний слід в історії, тому, як можна бачити, її результати приводяться в підручниках й півстоліття потому (а сама стаття була перевидана в 1999 році у збірнику, присвяченому механізмам дії ензимів [34], як класична робота). Тому й наводиться стаття Ченса як приклад, оскільки закладені ще в ті далекі роки уявлення про те, що складні механізми реакцій, що відбуваються з участю активаторів, можна уявити у вигляді схеми (17), аналогічній механізму Міхаеліса-Ментен (1), і за рівнянням (38), аналогічним рівнянню (8), розрахувати уявну константу Міхаеліса, вкоренились і продовжують існувати й зараз. До цього часу поза увагою дослідників залишається те, що такі уявлення є хибними. А це є можливим, здається, тільки внаслідок недостатньо чіткого розуміння відмінностей між істинними та уявними константами.

Повертаючись до цитати Келеті [22], ще раз підкреслимо, що ніякі зміни умов реакції (при даній температурі і тиску) не можуть вплинути на значення істинної константи Міхаеліса, вираженої через константи швидкості (відповідно до рівняння

(8)). Ніякі додаткові речовини не можуть змінити константи швидкості k_1 і k_{-1} , а також константу швидкості розпаду ензим-субстратного комплексу ES , швидкість розпаду якого залежить тільки від величини константи швидкості першого порядку і концентрації комплексу.

Додавання сполуки, здатної вплинути на швидкість розпаду при тій же концентрації комплексу (наприклад, активатора), означає, що вона також має входити в рівняння швидкості розпаду. А це означає, що константа швидкості буде вже другого порядку, і це вже є зовсім інша величина, яку (внаслідок різних розмірностей) навіть не можна порівнювати з константою швидкості першого порядку [19]. При незмінній концентрації активатора, швидкість розпаду буде залежати тільки від концентрації самого комплексу, тобто формально описуватись константою швидкості псевдопершого порядку. Однак ця константа буде змінювати своє значення в залежності від тієї концентрації активатора, при якій вона виміряна, тобто є уявною константою, яку зазвичай позначають символом k_{cat} . Тому, для конкретної реакції, в ході якої утворюється ензим-субстратний комплекс ES (з незв'язаних ензима і субстрата), здатний до розпаду безпосередньо до продуктів, істинна константа Міхаеліса K_m може мати тільки одне значення. Величина цієї константи Міхаеліса буде визначатись співвідношенням констант швидкості k_1 , k_2 і k_{-1} , у відповідності з рівнянням (8).

Оскільки істинна та уявна константи Міхаеліса мають різну природу, вони мають розглядатись окремо для того, щоб уникнути плутанини. З точки зору істинності констант особливо важливо, щоб при дослідженні ензиматичних реакцій схема механізму, що використовується для аналізу кінетики, максимально відповідала реальній. Отримане в результаті аналізу такої схеми кінетичне рівняння повинно адекватно описувати залежності початкової швидкості реакції від концентрацій субстрата, активатора, інгібітора в широкому інтервалі їх концентрацій.

Якщо точний механізм реакції невідомий, потрібно розглядати всі можливі механізми, які можуть відповідати отриманим кривим. Іноді вибирають механізм, виходячи з простоти, або маючи упередження до інших механізмів, не враховуючи

того, що отримані дані в рівній мірі вказують на можливість реалізації різних механізмів. Зазвичай більшу частину запропонованих механізмів можна виключити, якщо ретельно проаналізувати всі існуючі можливості [3, 4, 28, 30]. Цей момент часто недооцінюється дослідниками, які нерідко обмежуються розглядом тільки одного механізму, не враховуючи інших можливостей.

Концентрації реагуючих речовин і константи швидкості, що входять в кінетичне рівняння як параметри, можуть іноді бути об'єднаними в нові константи. Ці нові константи можуть складатись тільки з констант швидкості, і в такому випадку можуть бути названі істинними константами з точки зору незмінності, незалежності від концентрацій (тобто дійсно незмінними, подібно істинним константам швидкості), однак не можуть називатись істинними, а по суті є уявними з точки зору фізичного змісту. Якщо ж ці нові константи є функціями концентрацій, то вони тільки здаються константами (з точки зору незмінності, незалежності від концентрацій, вони можуть розглядатись, як константи, тільки при даних незмінних концентраціях реагентів), а тому називаються уявними константами.

Істинними є константи швидкості елементарних стадій реальних механізмів, а істинна константа Міхаеліса виражається рівнянням $K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$. Значення істинних констант не залежать від концентрацій реагентів, активаторів, інгібіторів, рН, сторонніх речовин, а також інших реакцій, що можуть відбуватись в реакційній системі.

Істинні константи можуть бути визначені тільки для надійно встановленого механізму (і, відповідно, точно встановленого числа учасників реакції), для якого отримане рівняння початкової швидкості (переважно в стаціонарному наближенні, оскільки іноді форма рівнянь, отриманих в рівноважному наближенні, відрізняється від форми рівнянь, отриманих в стаціонарному наближенні [5]), з якого стає зрозумілим фізичний зміст цих констант і яке дозволяє знайти спосіб їх розрахунку.

Звичайно, не завжди вдається отримати рівняння початкової швидкості або знайти способи визначення кінетичних констант, так що доводиться використовувати рівняння Міхаеліса-Ментен для кінетичного аналізу. Проте в таких

випадках потрібно чітко розуміти, що ми будемо мати справу з ефективними константами і не робити далекосяжних висновків про механізм досліджуваної реакції (якщо попередньо не був проведений теоретичний розгляд можливих механізмів для досліджуваної ензиматичної реакції) і спорідненість компонентів.

Уявні константи швидкості – це такі константи швидкості складної реакції, які спостерігаються при описанні її рівнянням простої реакції. Константа Міхаеліса, що розрахована по половині граничної швидкості (за рівнянням (14)), також є уявною константою. Уявні константи можуть бути функціями декількох істинних констант швидкості або концентрацій реагуючих речовин. Вони не мають чіткого фізичного змісту, забезпечуючи лише формальний зв'язок між швидкістю реакції й концентрацією реактанта незалежно від досліджуваного механізму.

Якщо ж виявляється, що істинна (як нам здається) константа Міхаеліса змінюється в певних умовах, то це означає, що або вибраний нами механізм не відповідає істинному, або в ензиматичній системі присутні компоненти, що впливають на процес, на які ми не звернули уваги (чи взагалі нічого не знаємо про їхню присутність у реакційному середовищі) – в будь-якому випадку константа, що змінюється, є не істинною, а ефективною. «Никогда нельзя быть уверенным, что предполагаемый механизм реакции абсолютно верен; можно лишь утверждать, что пока еще он не опровергнут. Следует постоянно быть готовым к тому, чтобы поменять свою точку зрения, когда этого потребуют новые данные» [35].

РОЗДІЛ 2

ЕНТРОПІЙНЕ ТРАКТУВАННЯ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ *

Застосувавши метод стаціонарних концентрацій Боденштейна [1] для дослідження елементарного ензиматичного процесу



Бріггс і Холдейн встановили залежність між швидкістю реакції v_0 і концентрацією субстрату $[S]$:

$$v = \frac{k_2 [F]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

де $[F]_0$ – загальна концентрація ензиму; K_m – константа Міхаеліса, P – продукт реакції.

В основу виведення цієї залежності покладено припущення, висловлене Анрі, Брауном, Міхаелісом і Ментен [2, 3], про утворення проміжного ензим-субстратного комплексу, який пізніше було виявлено експериментально [4].

Рівняння (2) відоме як рівняння Міхаеліса-Ментен. Константа Міхаеліса $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ визначається як така концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює $\frac{1}{2}V_m$. Таке визначення K_m не розкриває її змісту.

Для встановлення суті константи Міхаеліса ми дослідили ентропійні аспекти ходу елементарного ензиматичного процесу (1), використавши теорію інформації Шеннона [5].

* Викладений в розділі 2 матеріал був опублікований у статті:

Курський М.Д., Костерін С.О., Рибальченко В.К. Ентропійне трактування константи Міхаеліса ферментативних реакцій // Доп. АН УРСР. Сер. В.– 1975.– № 1.– С. 61–63.

Загальна концентрація ензиму при цьому визначається як

$$[F]_0 = [F] + [FS] \quad (3)$$

де $[F]$ і $[FS]$ – концентрації вільного і зв'язаного ензиму відповідно.

Звідси

$$\frac{[F]}{[F]_0} + \frac{[FS]}{[F]_0} = 1 \quad (4)$$

а ймовірності знаходження ензиму у вільному і зв'язаному станах можуть бути виражені наступним чином:

$$p(F) = \frac{[F]}{[F]_0}, \quad p(FS) = \frac{[FS]}{[F]_0} \quad (5)$$

Застосовуючи закон діючих мас до даної ензиматичної реакції, можна одержати рівняння

$$p(F) = \frac{K_m}{K_m + [S]}, \quad p(FS) = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

і $p(F) = p(FS) = \frac{1}{2}$ при умові, що $[S] = K_m$, як це видно з рівняння (6). Тобто K_m – це така концентрація субстрату, коли ймовірності знаходження молекул ензиму у вільному стані і в стані ензим-субстратного комплексу – рівні. Тоді при умові, що концентрація субстрату $[S]$ дорівнює константі Міхаеліса, значення швидкості реакції дорівнюватиме половині значення граничної швидкості: $v(K_m) = \frac{1}{2}V_m$. При $K_m \neq [S]$, $p(F) \neq p(FS)$ і формула Шеннона [5] для інформаційної ентропії H як середнього значення мір Хартлі матиме вигляд:

$$H = -p(F)\log_2 p(F) - p(FS)\log_2 p(FS) \quad (7)$$

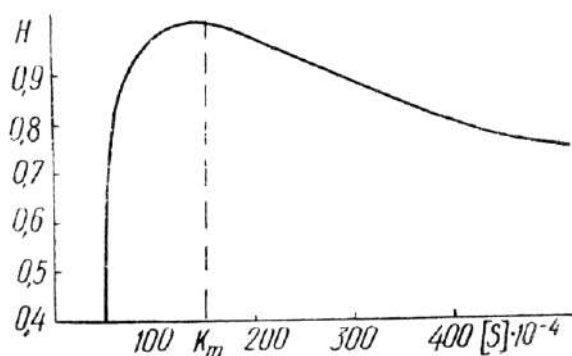
Підставляючи (6) в (7), маємо:

$$H = -\frac{K_m}{K_m + [S]} \log_2 \frac{K_m}{K_m + [S]} - \frac{[S]}{K_m + [S]} \log_2 \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

Якщо одна з ймовірностей дорівнює 1, то $H = 0$, що означає повну визначеність стану ензиму.

Дослідження ентропії H на екстремальне значення приводить до висновку, що $\bar{H} = H_{\max}$ при $[S] = K_m$ і $H_{\max} = \log_2 2 = 1$ біт.

Ентропійну інтерпретацію ходу реакції, яка підпорядковується рівнянню Міхаеліса–Ментен, наприклад, гідролізу АТФ міозином ($K_m = 15 \cdot 10^{-3}$) [6], можна зобразити графічно (рисунок: по осі ординат величина H в бітах; по осі абсцис – концентрація $[S]$ в М).



На початку реакції при $[S] \gg K_m$ «інформаційна» ентропія системи близька до нуля. Але з часом ентропія починає зростати, бо відбувається накопичення продукту, що свідчить про створення нової молекулярної системи. При $[S] = K_m$ ентропія досягає

максимального значення, а при $[S] \ll K_m$ ентропія знову спадає до нуля – в системі вже майже немає субстрату, а є лише продукт реакції.

Виходячи з цього можна дати ентропійне визначення константи Міхаеліса: K_m – це така концентрація субстрату, при якій «інформаційна» ентропія ензиматичної системи досягає максимального значення, що свідчить про найвищий ступінь її невпорядкованості.

Отже, застосування інформаційної функції Шеннона може дати ентропійне тлумачення константи Міхаеліса ензиматичних реакцій.

Така інтерпретація K_m може бути корисною при вивченні інформаційних основ впливу конкурентних і неконкурентних інгібіторів на кінетику ензиматичного каталізу.

РОЗДІЛ 3

ВРАХУВАННЯ ВНЕСКУ ХІМІЧНОГО ПЕРЕТВОРЕННЯ СУБСТРАТУ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ДОСЛІДЖЕНЬ ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ *

При дослідженнях каталітичних, в тому числі ензиматичних, реакцій, здебільшого розглядають тільки каталітичний шлях перетворення реагуючих речовин в продукти реакції, не враховуючи в реакційному механізмі хімічного (некаталітичного) перетворення [1-2]. Це можна пояснити тим очевидним фактом, що каталізатори (ензими) значно прискорюють протікання хімічного процесу, а тому при розрахунку швидкості каталітичного процесу можна знехтувати швидкістю хімічного (некаталітичного) перетворення. При цьому вважають, що каталізатор прискорює рівною мірою пряму та зворотну реакції і не може змінити стан рівноваги, тобто, додавання в реакційне середовище каталізатора не приводить до зміни термодинамічної константи рівноваги реакції [3, стор. 163–167]. Таким чином, на стан термодинамічної рівноваги не впливає те, яким шляхом вона була досягнута.

Проте, не завжди швидкістю некаталітичної реакції можна знехтувати в порівнянні з каталітичним перетворенням. Внаслідок того, що хімічна реакція протікає одночасно з каталітичною, і при дослідженні каталітичної реакції неможливо уникнути впливу хімічного перетворення, при експериментальних дослідженнях, зокрема, ензиматичних реакцій, завжди враховують внесок некаталітичного перетворення субстрату.

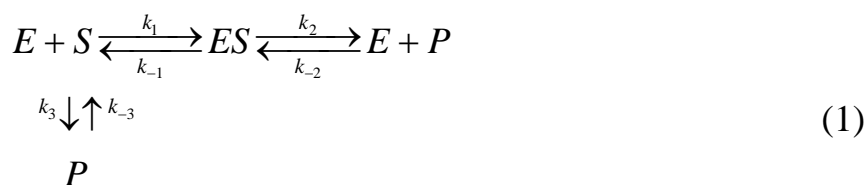
Оскільки хімічне (неензиматичне) перетворення, що протікає у відсутності ензиму, може бути досліджене окремо, проводять контрольні експерименти для врахування його внеску в кількість утвореного продукту реакції.

* Частина результатів з представлених в розділі 3 була опублікована в статті:

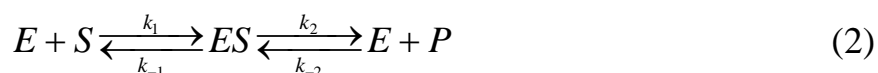
Костерін С.О., Карахін С.О., Жук П.Ф. Врахування внеску хімічного перетворення субстрату при проведенні досліджень ензиматичних реакцій // Укр. біохім. журн.– 2019.– Т. 91, № 3.– С. 93–104.

Різницю концентрацій продукту, що утворився в присутності ензиму і за його відсутності (в тому ж часовому інтервалі), приймають за концентрацію продукту, що утворився безпосередньо в ензиматичній реакції [4, стор. 203], тобто вважають, що існує адитивність концентрацій продукту реакції, що накопичується не ензиматичним та ензиматичним шляхами, в кожний момент часу.

На прикладі простого механізму (1) нами буде досліджена правомірність таких дій, тобто, чи можна концентрацію продукту ензиматичного перетворення субстрату розраховувати як різницю концентрацій продукту узагальненої реакції (що включає в себе суто неензиматичне (хімічне) й ензиматичне перетворення) та хімічного перетворення.



Механізм (1) є найпростішою схемою, що враховує можливість перетворення субстрату одночасно в двох напрямках: по шляху ензиматичного перетворення субстрату в продукт



та по шляху хімічного (неензиматичного) перетворення субстрату в продукт



В механізмах (1-3) використані наступні позначення: E – ензим, S – субстрат, ES – ензим-субстратний комплекс, P – продукт хімічного й ензиматичного перетворення субстрату, k_1 і k_2 – константи швидкості прямих реакцій першої та другої стадії ензиматичного шляху перетворення, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_{-1} і k_{-2} – константи швидкості зворотних реакцій першої та другої стадій ензиматичного шляху перетворення, s^{-1} ; k_3 і k_{-3} – константи швидкості прямої й зворотної реакцій третьої стадії (хімічного перетворення), s^{-1} .

Реакції, що протікають у відповідності до механізму (1), описуються наступною системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] - k_{-2}[E][P] = -W_1 + W_2 \quad (4)$$

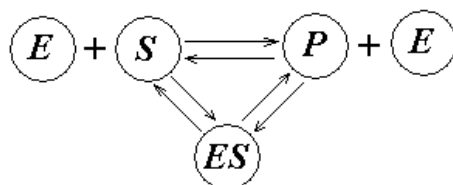
$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}[E][P] = W_1 - W_2 \quad (5)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = -k_{-2}[E][P] + k_2[ES] - k_{-3}[P] + k_3[S] = W_2 + W_3 \quad (6)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_{-3}[P] - k_3[S] = -W_1 - W_3 \quad (7)$$

де W_n – це швидкість n -ої стадії, тобто різниця швидкостей прямої й зворотної реакції n -ої стадії.

Проаналізувавши отриману систему рівнянь, можна встановити, що в стані рівноваги (коли всі похідні дорівнюють нулю) $W_1 = W_2 = -W_3$. Це свідчить про те, що реакції, які протікають за даним механізмом, є циклічними і механізм (1) можна представити у вигляді циклу,



хоча взяті окремо хімічне та ензиматичне перетворення, що відбуваються за механізмами (3) і (2) відповідно, є ациклічними реакціями і підпорядковуються принципу детального балансу.

Вважається, що всі хімічні та каталітичні реакції мають відбуватись у відповідності з принципом детального балансу, тобто, при досягненні стану рівноваги на кожній стадії швидкість прямої реакції має бути рівною швидкості зворотної реакції [5-6].

Більшість хімічних реакцій є ациклічними: константи швидкості цих реакцій можуть мати довільне значення і вони завжди протікають у відповідності з принципом детального балансу. Каталітичні (ензиматичні) реакції є циклічними, хоча, багато з них, подібно до ациклічних, також підпорядковуються принципу детального балансу. Проте існують такі циклічні реакції, в яких теоретично може порушуватись детальний баланс і встановлюватись циклічна рівновага. Такі реакції ми будемо називати істинно циклічними [7].

В 1901 році Вегшайдер [8], аналізуючи механізми істинно циклічних реакцій, виявив, що в стані циклічної рівноваги термодинамічні константи рівноваги реакції або окремих стадій (розраховані по рівноважним концентраціям), відрізняються за величиною від відповідних кінетичних констант рівноваги (розрахованих по співвідношенню констант швидкості прямих і зворотних реакцій). Ця невідповідність отримала назву «парадокс Вегшайдера» [6].

А оскільки вважають, що константи рівноваги, мають завжди залишатись незмінними (бо пов'язані зі стандартною енергією Гіббса ΔG^0), для того, щоб запобігти появі парадоксу Вегшайдера, необхідно щоб істинно циклічні реакції підпорядковувались принципу детального балансу [6].

В результаті, константи швидкості істинно циклічних реакцій не можуть бути довільними, а мають підпорядковуватись умові Вегшайдера: добуток констант швидкості реакцій, що протікають в напрямку руху годинникової стрілки, має дорівнювати добутку констант швидкості реакцій, що протікають в протилежному напрямі [9] (або, іншими словами, добуток констант рівноваги стадій по циклу має дорівнювати одиниці) [9] [10, стор. 6]. Виконання принципу детального балансу є гарантією того, що термодинамічна константа рівноваги реакції буде відповідати її кінетичній константі рівноваги [6]. Порушення принципу детального балансу в істинно циклічних реакціях приводить до встановлення циклічної рівноваги. При цьому константи швидкості не підпорядковуються умові Вегшайдера і можуть мати будь-які значення, а термодинамічна та кінетична константи рівноваги відповідних стадій не співпадають.

Таким чином, в умовах детального балансу константа рівноваги реакції має залишатись завжди незмінною: вона не повинна залежати ні від механізму (тобто кількості та послідовності стадій, необхідних для перетворення реагентів у продукти), ні від наявності інших реакцій, що одночасно відбуваються в реакційній системі, ні від початкових концентрацій реагуючих речовин, ні від наявності в реагуючій системі каталізатора (ензима) і/або інших сполук, в тому числі й тих, які можуть взаємодіяти з реагентами (наприклад, інгібіторів, активаторів, іонів металів і водню).

Як можна бачити, реакції, що протікають по механізму (1), є істинно циклічними і мають можливість дійти до циклічної рівноваги, коли швидкості реакції на всіх стадіях не дорівнюють нулю, а мають певне, однакове для всіх стадій значення ($W_1 = W_2 = -W_3$).

Цей результат має фундаментальне значення. Він свідчить про те, що не тільки в деякій обмеженій кількості каталітичних (ензиматичних) реакцій може порушуватись детальний баланс, а абсолютно у всіх таких реакціях, оскільки ізолювати каталітичний шлях перетворення субстрату від хімічного неможливо, а хімічне перетворення субстрату з більшою чи меншою швидкістю обов'язково відбувається. Тому, незважаючи на домінуючу точку зору, що детальний баланс не може порушуватись, необхідно уважно віднестись до такої можливості, оскільки існують також вагомі підстави вважати, що циклічна рівновага може реалізовуватись [7]. З огляду на це нами будуть розглянуті обидві ці можливості: – окремий випадок, коли реакція підпорядковується принципу детального балансу, і – загальний випадок, що включає можливість реалізації циклічної рівноваги.

3.1. Стан рівноваги

Проаналізуємо, чи необхідно віднімати концентрацію продукту хімічного перетворення від концентрації продукту узагальненої реакції, що відбувається у відповідності до механізму (1), для визначення частки в ній ензиматичного перетворення, у випадку якщо досліджується рівноважний стан, коли всі три реакції (1-3) досягли рівноваги (при цьому час досягнення рівноваги кожною з реакцій може значно відрізнятись).

Для того щоб вивести рівняння для розрахунку рівноважної концентрації продукту у випадку ензиматичного перетворення субстрату, що відбувається у відповідності з механізмом (2), необхідно розв'язати систему з двох рівнянь (з врахуванням того, що в стані рівноваги швидкості обох стадій дорівнюють нулю):

$$k_1([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-1}[ES] = 0 \quad (8)$$

$$k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] = 0 \quad (9)$$

Рішенням є квадратне рівняння, яке можна представити у вигляді:

$${}^{eq}[P]_{enz}[E]_0 = \left(K_2 + {}^{eq}[P]_{enz} \right) \left\{ [S]_0 - {}^{eq}[P]_{enz} \frac{(K+1)}{K} \right\} \quad (10)$$

де: $[E]_0$ і $[S]_0$ – початкові концентрації ензиму й субстрату відповідно, M ; ${}^{eq}[P]_{enz}$ – рівноважна концентрація продукту ензиматичного перетворення субстрату, M ;
 $K = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}}$ і $K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$ – константи рівноваги ензиматичного перетворення субстрату

за механізмом (2) й другої стадії цієї реакції відповідно.

У випадку узагальненої реакції (1), що відбувається в умовах детального балансу, необхідно розв'язати систему з трьох рівнянь:

$$k_1 ([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-1}[ES] = 0 \quad (11)$$

$$k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] = 0 \quad (12)$$

$$k_3([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-3}[P] = 0 \quad (13)$$

Проте, в умовах детального балансу одне з рівнянь зайве, оскільки невідомих змінних дві ($[P]$ і $[ES]$), а рівнянь три. Тому, зрозуміло, що вибравши два перших рівняння, отримаємо розв'язок, ідентичний рішенню, одержаному для ензиматичного перетворення субстрату (рівняння (10)). Цілком очевидно, що, і в разі вибору іншої пари рівнянь, рішення буде однаковим.

Таким чином, в умовах детального балансу рівноважна концентрація продукту ензиматичного перетворення субстрату (механізм (2)) завжди дорівнює рівноважній концентрації продукту узагальненої реакції (механізм (1)). Тому, якщо досліджувана реакція, що відбувається у відповідності до механізму (1), досягла рівноваги, отримане значення рівноважної концентрації продукту є в той же час і рівноважною концентрацією продукту ензиматичного перетворення субстрату. При цьому, як можна побачити, додавання хімічного шляху до ензиматичного шляху перетворення субстрату не справляє ніякого впливу на рівноважну концентрацію продукту.

В умовах детального балансу, як було сказано раніше, термодинамічна константа рівноваги (K) реакції перетворення субстрату в продукт залишається незмінною для всіх трьох механізмів:

$$\frac{{}^{eq}[P]}{{}^{eq}[S]} = K = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad (14)$$

Для хімічного перетворення субстрату можна записати:

$$K = \frac{{}^{eq}[P]_{chem}}{{}^{eq}[S]_{chem}} = \frac{{}^{eq}[P]_{chem}}{[S]_0 - {}^{eq}[P]_{chem}} \quad (15)$$

звідки випливає, що рівноважна концентрація продукту дорівнює:

$${}^{eq}[P]_{chem} = \frac{K[S]_0}{K + 1} \quad (16)$$

Для ензиматичного шляху перетворення субстрату і узагальненої реакції константу рівноваги можна виразити однакою чином:

$$K = \frac{{}^{eq}[P]_{enz}}{{}^{eq}[S]_{enz}} = \frac{{}^{eq}[P]_{enz}}{[S]_0 - {}^{eq}[ES]_{enz} - {}^{eq}[P]_{enz}}; \quad K = \frac{{}^{eq}[P]_{tot}}{{}^{eq}[S]_{tot}} = \frac{{}^{eq}[P]_{tot}}{[S]_0 - {}^{eq}[ES]_{tot} - {}^{eq}[P]_{tot}} \quad (17)$$

Видно, що при дотриманні рівності ${}^{eq}[P]_{tot} = {}^{eq}[P]_{enz}$ виконується також рівність ${}^{eq}[ES]_{tot} = {}^{eq}[ES]_{enz}$. Рівноважна концентрація продукту, що утворюється як по ензиматичному шляху, так і в узагальненій реакції, завжди менша, ніж в хімічному перетворенні субстрату (механізм (3)), оскільки частина субстрату зв'язується з ензимом в ензим-субстратний комплекс, а не перетворюється на продукт:

$${}^{eq}[P]_{tot} = \frac{K([S]_0 - {}^{eq}[ES])}{K + 1} = {}^{eq}[P]_{enz} \quad (18)$$

Якщо відомі рівноважні концентрації ${}^{eq}[P]_{chem}$ і ${}^{eq}[P]_{tot}$ (при різних початкових концентраціях субстрату), можна розрахувати всі константи рівноваги (узагальненої реакції, хімічного й ензиматичного шляхів перетворення субстрату, а також першої та другої стадії ензиматичного шляху) без відповідних значень рівноважної концентрації субстрату:

$$\frac{[E]_0}{{}^{eq}[P]_{chem} - {}^{eq}[P]_{tot}} = \frac{(K + 1)}{K} + \frac{K_2(K + 1)}{K} \frac{1}{{}^{eq}[P]_{tot}} \quad (19)$$

Отриманий результат (${}^{eq}[P]_{tot} = {}^{eq}[P]_{enz}$) є точним рішенням, і він залишається справедливим також для механізмів, що включають більш складний шлях

каталітичного перетворення (як впливає з рівнянь (17)–(18)), в яких крім ензим-субстратного можуть бути присутніми й інші проміжні комплекси (нагадаємо, що це справедливо тільки при виконанні принципу детальнього балансу).

Таким чином, немає необхідності віднімати рівноважну концентрацію продукту хімічного перетворення субстрату від рівноважної концентрації продукту узагальненої реакції, щоб розрахувати рівноважну концентрацію продукту ензиматичного перетворення субстрату.

Проте продукт реакції може бути присутнім у субстраті (за рахунок повільного хімічного перетворення, або просто як забруднення), або в інших реактивах. Позначимо цю концентрацію $[P]_0$. Ця додаткова концентрація продукту не буде впливати на константу рівноваги реакції (в умовах виконання принципу детальнього балансу)

$$K_P = \frac{{}^{eq}[P]_{chem}}{[S]_0 + [P]_0 - {}^{eq}[P]_{chem}} = \frac{{}^{eq}[P]_{enz}}{[S]_0 + [P]_0 - {}^{eq}[ES]_{enz} - {}^{eq}[P]_{enz}} = \frac{{}^{eq}[P]_{tot}}{[S]_0 + [P]_0 - {}^{eq}[ES]_{tot} - {}^{eq}[P]_{tot}} \quad (20)$$

але буде впливати на рівноважну концентрацію продукту

$${}^{eq}[P]_{chem} = \frac{K([S]_0 + [P]_0)}{K + 1}; \quad {}^{eq}[P]_{tot} = \frac{K([S]_0 + [P]_0 - {}^{eq}[ES])}{K + 1} = {}^{eq}[P]_{enz} \quad (21)$$

Якщо необхідно привести значення рівноважної концентрації продукту до умов, коли $[P]_0 = 0$, треба віднімати від ${}^{eq}[P]_{tot}$ не $[P]_0$, а $\frac{K[P]_0}{K + 1}$ (див. рівняння (18)):

$${}^{eq}[P]_{tot} - \frac{K[P]_0}{K + 1} = \frac{K([S]_0 - {}^{eq}[ES]_{tot})}{K + 1} \quad (22)$$

Це особливо важливо у випадках, коли константа рівноваги реакції близька до одиниці або менше її. Якщо ж $K \gg 1$, то практично можна віднімати $[P]_0$.

Хоча точне рішення показує, що рівноважна концентрація продукту в процесі хімічного перетворення субстрату завжди більша, ніж для ензиматичного перетворення субстрату, однак ця різниця може бути незначною. З рівняння (9) можна отримати вираз для рівноважної концентрації комплексу ES :

$${}^{eq}[ES]_{tot} = \frac{k_{-2}[E]_0 {}^{eq}[P]_{tot}}{k_2 + k_{-2} {}^{eq}[P]_{tot}} \quad (23)$$

Після його підстановки в рівняння (17) можна виразити рівноважну концентрацію продукту наступним чином:

$${}^{eq}[P]_{tot} = \frac{K[S]_0}{1 + K \left(1 + \frac{[E]_0}{K_2 + {}^{eq}[P]_{tot}} \right)} \quad (24)$$

Порівнюючи отримане рівняння з рівнянням (16)

$$\frac{{}^{eq}[P]_{chem}}{{}^{eq}[P]_{tot}} = \frac{1 + K \left(1 + \frac{[E]_0}{K_2 + {}^{eq}[P]_{tot}} \right)}{1 + K} = 1 + \left(\frac{K}{1 + K} \right) \frac{[E]_0}{(K_2 + {}^{eq}[P]_{tot})} \quad (25)$$

можна побачити, що чим меншу початкову концентрацію ензиму використовувати для досліджень, і чим більша константа рівноваги другої стадії досліджуваної реакції K_2 , та чим менша константа рівноваги реакції K , тим менше рівноважна концентрація продукту, що утворюється по хімічному шляху перетворення субстрату, відрізняється від рівноважної концентрації продукту в узагальненій реакції (або в процесі ензиматичного перетворення субстрату).

При умові, що $[E]_0 \ll [S]_0$, з рівняння (10) випливає (див. також рівняння (16))

$${}^{eq}[P]_{tot} = {}^{eq}[P]_{enz} = \frac{K[S]_0}{(K + 1)} = {}^{eq}[P]_{chem} \quad (26)$$

Воно також показує, що в таких умовах рівноважна концентрація продукту в хімічному перетворенні субстрату практично не відрізняється від рівноважної концентрації продукту в узагальненій реакції (або при ензиматичному перетворенні субстрату).

Можна підсумувати: наближене рішення показує, що рівноважні концентрації продукту у всіх трьох реакціях (якщо вони підпорядковуються принципу детального балансу) при використанні низьких концентрацій ензиму ($[E]_0 \ll [S]_0$) можуть бути практично однаковими.

За результатами проведеного аналізу можна зробити висновок, що при проведенні досліджень в умовах детальної рівноваги немає необхідності вводити жодних поправок для виключення впливу хімічного перетворення субстрату, що відбувається разом з ензиматичним: рівноважна концентрація продукту в

узагальненій реакції, що протікає по механізму (1), є одночасно рівноважною концентрацією продукту ензиматичного перетворення субстрату.

Порушення принципу детального балансу може приводити до того, що константа рівноваги циклічної реакції перестає бути незмінною: вона стає залежною від конкретних констант швидкості і часто від концентрацій реагуючих речовин. Перевіримо, чи існує адитивність при порушенні принципу детального балансу.

Рівноважна концентрація продукту ензиматичного перетворення субстрату, що відбувається за механізмом (2), може бути виражена рівнянням (10), яке було нами виведене раніше, а рівноважна концентрація продукту хімічного перетворення субстрату, що відбувається відповідно до механізму (3) – рівнянням (27):

$${}^{eq}[P]_{chem} = \frac{k_3[S]_0}{k_3 + k_{-3}} \quad (27)$$

Щоб вивести рівняння для рівноважної концентрації продукту узагальненої реакції, що протікає за механізмом (1), необхідно розв'язати систему рівнянь:

$$\begin{aligned} k_1([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] &= 0 \\ k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] + k_3([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-3}[P] &= 0 \end{aligned} \quad (28)$$

Рішенням є кубічне рівняння, яке можна представити у наступному вигляді:

$$\begin{aligned} &\{[E]_0(k_2 - k_3) + k_3[S]_0 - {}^{eq}[P]_{tot}(k_3 + k_{-3})\} \{ {}^{eq}[P]_{tot}(k_{-2}[E]_0 + k_3 + k_{-3}) - k_3[S]_0 \} = \\ &= \{[E]_0(k_2 - k_3) + k_3[S]_0 - {}^{eq}[P]_{tot}(k_3 + k_{-3})\} \left[[S]_0 + \left(\frac{k_{-2}}{k_1} - 1 \right) {}^{eq}[P]_{tot} \right] (k_2 - k_3 + k_{-2} {}^{eq}[P]_{tot}) - \\ &- \{ {}^{eq}[P]_{tot}(k_{-2}[E]_0 + k_3 + k_{-3}) - k_3[S]_0 \} (k_2 - k_3 + k_{-2} {}^{eq}[P]_{tot}) K_m \end{aligned} \quad (29)$$

де $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ – константа Міхаеліса.

Цілком зрозуміло, що в даному випадку адитивність не виконується. При порівнянні рівнянь (29) і (10) стає очевидним, що рівноважна концентрація продукту в ензиматичному перетворенні субстрату не співпадає з рівноважною концентрацією продукту узагальненої реакції, як це було характерно в умовах детального балансу. Рівняння (29) перетворюється в рівняння (10) тільки при умові $k_3 = k_{-3} = 0$.

3.2. Початкова швидкість

На відміну від рівноважного стану, розгляд якого дозволяє отримати точне рішення, у випадку дослідження початкової швидкості рішення виходить наближеним, а, тому, може в окремих випадках (які важко контролювати) приводити до певних (іноді значних) похибок.

Відсутність точного рішення пов'язана з тим, що початкова швидкість є більшою або меншою мірою величиною, що усереднена по певному інтервалу часу. Крім того, для знаходження рівняння початкової швидкості реакції в присутності ензиму (реакції (1) і (2)) вдаються до використання квазістаціонарного наближення, яке полягає в тому, що ензиматична реакція досить швидко переходить у стан, коли концентрація проміжних комплексів протягом відносно тривалого періоду часу залишається практично незмінною (або зміна їх концентрацій дуже мала в порівнянні зі зміною концентрації реагентів).

Однак, необхідно враховувати, що у випадку хімічного перетворення субстрату (реакція (3)), стаціонарний стан відсутній, хоча можна розрахувати початкову швидкість такої реакції (тобто швидкість в умовах, коли практично відсутній продукт реакції). Крім того, необхідно приймати до уваги, що стаціонарний стан ензиматичного перетворення субстрату та узагальненої реакції, коли концентрація продукту змінюється пропорційно часу, може не співпадати за часом з початковим моментом хімічного перетворення субстрату, для якого розраховується початкова швидкість.

Швидкість хімічного перетворення субстрату (v_{chem}) в початковий момент часу, коли концентрація продукту настільки мала, що можна нею знехтувати (а тому і швидкість зворотної реакції можна не враховувати), дорівнює:

$$v_{chem} = k_3[S]_0 \quad (30)$$

Як відомо, початкова швидкість ензиматичного перетворення субстрату (v_{enz}), що відбувається за механізмом (2), описується рівнянням Міхаеліса-Ментен (в умовах, коли $[E]_0 \ll [S]_0$) [1, 2, 4]:

$$v_{enz} = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0}{k_2 + k_{-1} + k_1 [S]_0} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (31)$$

Для виведення рівняння початкової швидкості узагальненої реакції (v_{tot}), що підпорядковується принципу детального балансу (в умовах, коли продукт утворюється у вкрай малій кількості, тобто $[P] = 0$), необхідно розв'язати систему з двох рівнянь:

$$k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad (32)$$

$$k_2 [ES] + k_3 [S] = v_{tot} \quad (33)$$

У припущенні, що $[E]_0 \ll [S]_0$, отримуємо рівняння початкової швидкості в наступному вигляді:

$$v_{tot} = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{K_m + [S]_0} + k_3 [S]_0 = \frac{[S]_0 \{k_2 [E]_0 + k_3 ([S]_0 + K_m)\}}{K_m + [S]_0} \quad (34)$$

Цей результат показує, що в умовах детального балансу існує адитивність початкових швидкостей:

$$v_{tot} = v_{enz} + v_{chem} \quad (35)$$

В умовах, коли виконується адитивність початкових швидкостей, має також виконуватись і адитивність концентрацій продукту.

В табл. 1 представлені результати розрахунків, які показують, що адитивність по часу в початковий момент протікання реакції (коли спостерігається лінійне зростання концентрації продукту в часі в реакціях, що відбуваються за механізмами (1) і (3)) виконується як для миттєвих швидкостей (w), так і для початкових (v).

З табл. 2 видно, що адитивність по часу спостерігається також і для концентрацій продукту реакції. Підкреслимо, що точність співпадіння різниці концентрацій продукту узагальненої реакції й хімічного перетворення з концентрацією продукту ензиматичного перетворення субстрату приблизно вдвічі краща, ніж у випадку миттєвих швидкостей (що спостерігалось у всіх проведених нами розрахунках).

Таблиця 1. Миттєві швидкості узагальненої реакції (w_{tot}), хімічного (w_{chem}) та ензиматичного (w_{enz}) перетворення субстрату в момент часу t , а також різниця миттєвих швидкостей узагальненої реакції та хімічного перетворення ($w_{tot} - w_{chem}$) і її порівняння з миттєвою швидкістю ензиматичного перетворення в той же момент часу (%) з застосуванням рівняння: $\frac{100(w_{tot} - w_{chem})}{w_{enz}}$. Аналогічні дані представлені також для початкових швидкостей (v), що були розраховані за тангенсом кута нахилу прямих, побудованих у координатах $[P] - t$, по першим десяти точкам (з першої по десятю секунду). Параметри реакції, що були використані для розрахунків: $k_1 = 1 \cdot 10^5$; $k_{-1} = 80$; $k_2 = 40$; $k_{-2} = 2000$; $k_3 = 5 \cdot 10^{-4}$; $k_{-3} = 2 \cdot 10^{-5}$; $[S]_0 = 1 \text{ M}$; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $K = 25 \text{ Mc}^{-1}$; $K_m = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

t	w_{tot}	w_{chem}	w_{enz}	$w_{tot} - w_{chem}$	%
1	$4,492 \cdot 10^{-3}$	$4,997 \cdot 10^{-4}$	$3,994 \cdot 10^{-3}$	$3,992 \cdot 10^{-3}$	99,95
2	$4,488 \cdot 10^{-3}$	$4,995 \cdot 10^{-4}$	$3,993 \cdot 10^{-3}$	$3,989 \cdot 10^{-3}$	99,89
3	$4,485 \cdot 10^{-3}$	$4,992 \cdot 10^{-4}$	$3,992 \cdot 10^{-3}$	$3,986 \cdot 10^{-3}$	99,85
4	$4,481 \cdot 10^{-3}$	$4,990 \cdot 10^{-4}$	$3,991 \cdot 10^{-3}$	$3,982 \cdot 10^{-3}$	99,77
5	$4,478 \cdot 10^{-3}$	$4,987 \cdot 10^{-4}$	$3,990 \cdot 10^{-3}$	$3,979 \cdot 10^{-3}$	99,72
6	$4,474 \cdot 10^{-3}$	$4,984 \cdot 10^{-4}$	$3,989 \cdot 10^{-3}$	$3,976 \cdot 10^{-3}$	99,67
7	$4,471 \cdot 10^{-3}$	$4,982 \cdot 10^{-4}$	$3,988 \cdot 10^{-3}$	$3,973 \cdot 10^{-3}$	99,62
8	$4,467 \cdot 10^{-3}$	$4,979 \cdot 10^{-4}$	$3,987 \cdot 10^{-3}$	$3,970 \cdot 10^{-3}$	99,57
9	$4,464 \cdot 10^{-3}$	$4,977 \cdot 10^{-4}$	$3,986 \cdot 10^{-3}$	$3,966 \cdot 10^{-3}$	99,50
10	$4,460 \cdot 10^{-3}$	$4,974 \cdot 10^{-4}$	$3,985 \cdot 10^{-3}$	$3,963 \cdot 10^{-3}$	99,45
t	v_{tot}	v_{chem}	v_{enz}	$v_{tot} - v_{chem}$	%
1-10	$4,482 \cdot 10^{-3}$	$4,990 \cdot 10^{-4}$	$3,991 \cdot 10^{-3}$	$3,983 \cdot 10^{-3}$	99,80

Оскільки початкова швидкість є усередненою по кільком першим точкам величиною, точність співпадіння початкових швидкостей відповідає точності співпадіння миттєвих швидкостей приблизно на середині інтервалу, який був вибраний для розрахунку початкової швидкості.

Таблиця. 2. Концентрації продукту узагальної реакції ($[P]_{tot}$), хімічного ($[P]_{chem}$) й ензиматичного ($[P]_{enz}$) перетворення субстрату в момент часу t , а також різниця концентрацій продукту узагальної реакції та хімічного перетворення ($[P]_{tot} - [P]_{chem}$) і її порівняння з концентрацією продукту в ензиматичному перетворенні в той же момент часу (%) з застосуванням рівняння: $\frac{100([P]_{tot} - [P]_{chem})}{[P]_{enz}}$. Параметри реакції, що були використані для розрахунків:

$k_1 = 1 \cdot 10^5$; $k_{-1} = 80$; $k_2 = 40$; $k_{-2} = 2000$; $k_3 = 5 \cdot 10^{-4}$; $k_{-3} = 2 \cdot 10^{-5}$; $[S]_0 = 1$ М; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ М; $K = 25$ Мс $^{-1}$; $K_m = 1,2 \cdot 10^{-3}$ М.

t	$[P]_{tot}$	$[P]_{chem}$	$[P]_{enz}$	$[P]_{tot} - [P]_{chem}$	%
1	$4,493 \cdot 10^{-3}$	$4,999 \cdot 10^{-4}$	$3,995 \cdot 10^{-3}$	$3,994 \cdot 10^{-3}$	99,97
2	$8,983 \cdot 10^{-3}$	$9,995 \cdot 10^{-4}$	$7,988 \cdot 10^{-3}$	$7,984 \cdot 10^{-3}$	99,95
3	$1,347 \cdot 10^{-2}$	$1,499 \cdot 10^{-3}$	$1,198 \cdot 10^{-2}$	$1,197 \cdot 10^{-2}$	99,92
4	$1,795 \cdot 10^{-2}$	$1,998 \cdot 10^{-3}$	$1,597 \cdot 10^{-2}$	$1,595 \cdot 10^{-2}$	99,87
5	$2,243 \cdot 10^{-2}$	$2,497 \cdot 10^{-3}$	$1,996 \cdot 10^{-2}$	$1,993 \cdot 10^{-2}$	99,85
6	$2,691 \cdot 10^{-2}$	$2,995 \cdot 10^{-3}$	$2,395 \cdot 10^{-2}$	$2,391 \cdot 10^{-2}$	99,83
7	$3,138 \cdot 10^{-2}$	$3,494 \cdot 10^{-3}$	$2,794 \cdot 10^{-2}$	$2,789 \cdot 10^{-2}$	99,82
8	$3,585 \cdot 10^{-2}$	$3,992 \cdot 10^{-3}$	$3,193 \cdot 10^{-2}$	$3,186 \cdot 10^{-2}$	99,78
9	$4,032 \cdot 10^{-2}$	$4,489 \cdot 10^{-3}$	$3,592 \cdot 10^{-2}$	$3,583 \cdot 10^{-2}$	99,75
10	$4,478 \cdot 10^{-2}$	$4,987 \cdot 10^{-3}$	$3,990 \cdot 10^{-2}$	$3,979 \cdot 10^{-2}$	99,72

Наприклад, розглянемо реакцію з параметрами: $k_1 = 160$; $k_{-1} = 40$; $k_2 = 75$; $k_{-2} = 100$; $k_3 = 3 \cdot 10^{-2}$; $k_{-3} = 1 \cdot 10^{-2}$; $[S]_0 = 1$ М; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $K = 3$; $K_m = 0,72$ (табл. 3–5). Якщо знаходити концентрацію продукту ензиматичного перетворення субстрату шляхом віднімання концентрації продукту хімічного перетворення субстрату від концентрації продукту узагальної реакції, то на 10 секунді розраховане значення ($[P]_{tot} - [P]_{chem} = 2,320 \cdot 10^{-1}$ М) може бути на третину меншим, ніж справжнє ($[P]_{enz} = 3,409 \cdot 10^{-1}$ М) (табл. 3), у випадку миттєвої швидкості – на дві третини ($w_{tot} - w_{chem} = 8,277 \cdot 10^{-3}$ і $w_{enz} = 2,570 \cdot 10^{-2}$ Мс $^{-1}$ відповідно) (табл. 4), а у випадку початкової швидкості, розрахованій по першим десяти точкам, що вимірювались

Таблиця 3. Концентрації продукту узагальноної реакції ($[P]_{tot}$), хімічного ($[P]_{chem}$) й ензиматичного ($[P]_{enz}$) перетворення субстрату в момент часу t , а також різниця концентрацій продукту узагальноної реакції та хімічного перетворення ($[P]_{tot} - [P]_{chem}$) і її порівняння з концентрацією продукту в ензиматичному перетворенні в той же момент часу (%) з застосуванням рівняння: $\frac{100([P]_{tot} - [P]_{chem})}{[P]_{enz}}$. Параметри реакції, що були використані для розрахунків:

$k_1 = 160$; $k_{-1} = 40$; $k_2 = 75$; $k_{-2} = 100$; $k_3 = 3 \cdot 10^{-2}$; $k_{-3} = 1 \cdot 10^{-2}$; $[S]_0 = 1 \text{ M}$; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $K = 3 \text{ Mc}^{-1}$; $K_m = 0,72 \text{ M}$.

t	$[P]_{tot}$	$[P]_{chem}$	$[P]_{enz}$	$[P]_{tot} - [P]_{chem}$	%
1	$7,028 \cdot 10^{-2}$	$2,941 \cdot 10^{-2}$	$4,242 \cdot 10^{-2}$	$4,087 \cdot 10^{-2}$	96,35
2	$1,346 \cdot 10^{-1}$	$5,766 \cdot 10^{-2}$	$8,295 \cdot 10^{-2}$	$7,698 \cdot 10^{-2}$	92,80
3	$1,934 \cdot 10^{-1}$	$8,481 \cdot 10^{-2}$	$1,215 \cdot 10^{-1}$	$1,086 \cdot 10^{-1}$	89,38
4	$2,469 \cdot 10^{-1}$	$1,109 \cdot 10^{-1}$	$1,581 \cdot 10^{-1}$	$1,360 \cdot 10^{-1}$	86,02
5	$2,956 \cdot 10^{-1}$	$1,360 \cdot 10^{-1}$	$1,928 \cdot 10^{-1}$	$1,596 \cdot 10^{-1}$	82,78
6	$3,398 \cdot 10^{-1}$	$1,600 \cdot 10^{-1}$	$2,258 \cdot 10^{-1}$	$1,798 \cdot 10^{-1}$	79,63
7	$3,800 \cdot 10^{-1}$	$1,832 \cdot 10^{-1}$	$2,570 \cdot 10^{-1}$	$1,968 \cdot 10^{-1}$	76,58
8	$4,164 \cdot 10^{-1}$	$2,054 \cdot 10^{-1}$	$2,865 \cdot 10^{-1}$	$2,110 \cdot 10^{-1}$	73,65
9	$4,494 \cdot 10^{-1}$	$2,267 \cdot 10^{-1}$	$3,145 \cdot 10^{-1}$	$2,227 \cdot 10^{-1}$	70,81
10	$4,793 \cdot 10^{-1}$	$2,473 \cdot 10^{-1}$	$3,409 \cdot 10^{-1}$	$2,320 \cdot 10^{-1}$	68,05

через 1 секунду – на чверть ($v_{tot} - v_{chem} = 2,683 \cdot 10^{-2}$ і $v_{enz} = 3,599 \cdot 10^{-2} \text{ Mc}^{-1}$ відповідно) (табл. 5), хоча залежності концентрації продукту від часу виглядають практично прямими для всіх механізмів (з табл. 5 видно, що середньоквадратичне відхилення для прямої, побудованої по першим десяти точкам, складає 0,992 для хімічного перетворення, 0,986 – для ензиматичного, 0,951 – для узагальноної реакції).

Проте, необхідно враховувати, що адитивність виконується тільки на самому початку реакції й у відносно вузькому часовому інтервалі, який визначається параметрами реакції. Тому в одному й тому ж часовому інтервалі в одній реакції точність дотримання адитивності може бути значно гіршою, ніж у іншій, і чим

Таблиця 4. Миттєві швидкості узагальненої реакції (w_{tot}), хімічного (w_{chem}) й ензиматичного (w_{enz}) перетворення субстрату в момент часу t , а також різниця миттєвих швидкостей узагальненої реакції та хімічного перетворення ($w_{tot} - w_{chem}$) і її порівняння з миттєвою швидкістю ензиматичного перетворення в той же момент часу (%) з застосуванням рівняння: $\frac{100(w_{tot} - w_{chem})}{w_{enz}}$. Параметри реакції, що були використані для розрахунків: $k_1 = 160$; $k_{-1} = 40$; $k_2 = 75$; $k_{-2} = 100$; $k_3 = 3 \cdot 10^{-2}$; $k_{-3} = 1 \cdot 10^{-2}$; $[S]_0 = 1$ М; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-3}$ М; $K = 3$ Мс $^{-1}$; $K_m = 0,72$ М.

t	w_{tot}	w_{chem}	w_{enz}	$w_{tot} - w_{chem}$	%
1	$6,733 \cdot 10^{-2}$	$2,882 \cdot 10^{-2}$	$4,154 \cdot 10^{-2}$	$3,850 \cdot 10^{-2}$	92,68
2	$6,147 \cdot 10^{-2}$	$2,769 \cdot 10^{-2}$	$3,951 \cdot 10^{-2}$	$3,378 \cdot 10^{-2}$	85,50
3	$5,605 \cdot 10^{-2}$	$2,661 \cdot 10^{-2}$	$3,755 \cdot 10^{-2}$	$2,944 \cdot 10^{-2}$	78,40
4	$5,103 \cdot 10^{-2}$	$2,556 \cdot 10^{-2}$	$3,566 \cdot 10^{-2}$	$2,547 \cdot 10^{-2}$	71,42
5	$4,641 \cdot 10^{-2}$	$2,456 \cdot 10^{-2}$	$3,383 \cdot 10^{-2}$	$2,185 \cdot 10^{-2}$	64,59
6	$4,215 \cdot 10^{-2}$	$2,360 \cdot 10^{-2}$	$3,207 \cdot 10^{-2}$	$1,855 \cdot 10^{-2}$	57,84
7	$3,824 \cdot 10^{-2}$	$2,267 \cdot 10^{-2}$	$3,037 \cdot 10^{-2}$	$1,557 \cdot 10^{-2}$	51,27
8	$3,466 \cdot 10^{-2}$	$2,178 \cdot 10^{-2}$	$2,875 \cdot 10^{-2}$	$1,287 \cdot 10^{-2}$	44,77
9	$3,138 \cdot 10^{-2}$	$2,093 \cdot 10^{-2}$	$2,719 \cdot 10^{-2}$	$1,045 \cdot 10^{-2}$	38,43
10	$2,839 \cdot 10^{-2}$	$2,011 \cdot 10^{-2}$	$2,570 \cdot 10^{-2}$	$8,277 \cdot 10^{-3}$	32,21

довше протікає реакція, тим більш суттєвим є відхилення від адитивності. Для прикладу розглянемо іншу реакцію з параметрами: $k_1 = 1 \cdot 10^5$; $k_{-1} = 80$; $k_2 = 40$; $k_{-2} = 2000$; $k_3 = 5 \cdot 10^{-4}$; $k_{-3} = 2 \cdot 10^{-5}$; $[S]_0 = 1$; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$; $K = 25$; $K_m = 1,2 \cdot 10^{-3}$ (табл. 1–2). На відміну від попередньої реакції, розраховане по різниці концентрацій продукту узагальненої реакції та хімічного перетворення субстрату на 10 секунді значення $[P]_{tot} - [P]_{chem} = 3,98 \cdot 10^{-2}$ М лише на 0,28% менше, ніж справжнє ($[P]_{enz} = 3,99 \cdot 10^{-2}$ М) (табл. 2), у випадку миттєвої швидкості – на 0,55% ($w_{tot} - w_{chem} = 3,963 \cdot 10^{-3}$ і $w_{enz} = 3,985 \cdot 10^{-3}$ Мс $^{-1}$ відповідно) (табл. 1), а у випадку початкової швидкості, розрахованій по першим десяти точкам, що вимірювались через 1 секунду – на 0,20% ($v_{tot} - v_{chem} = 3,983 \cdot 10^{-3}$ і $v_{enz} = 3,991 \cdot 10^{-3}$ Мс $^{-1}$ відповідно) (табл. 1).

Таблиця 5. Початкові швидкості узагальненої реакції (v_{tot}), хімічного (v_{chem}) й ензиматичного (v_{enz}) перетворення субстрату, розраховані по n точкам (інтервал між точками 1 с), з відповідними середньоквадратичними відхиленнями (R^2), а також різниця початкових швидкостей узагальненої реакції та хімічного перетворення ($v_{tot} - v_{chem}$) і її порівняння з початковою швидкістю ензиматичного перетворення (%). Порівняння зроблено у вигляді відношення $\frac{100(v_{tot} - v_{chem})}{v_{enz}}$. Параметри реакції,

що були використані для розрахунків: $k_1 = 160$; $k_{-1} = 40$; $k_2 = 75$; $k_{-2} = 100$; $k_3 = 3 \cdot 10^{-2}$; $k_{-3} = 1 \cdot 10^{-2}$; $[S]_0 = 1 \text{ M}$; $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $K = 3 \text{ Mc}^{-1}$; $K_m = 0,72 \text{ M}$.

n	v_{tot}	R^2	v_{chem}	R^2	v_{enz}	R^2	$v_{tot} - v_{chem}$	%
2	$6,791 \cdot 10^{-2}$	0,997	$2,895 \cdot 10^{-2}$	0,999	$4,166 \cdot 10^{-2}$	0,999	$3,896 \cdot 10^{-2}$	93,52
3	$6,569 \cdot 10^{-2}$	0,994	$2,851 \cdot 10^{-2}$	0,999	$4,091 \cdot 10^{-2}$	0,998	$3,718 \cdot 10^{-2}$	90,88
4	$6,357 \cdot 10^{-2}$	0,991	$2,809 \cdot 10^{-2}$	0,998	$4,017 \cdot 10^{-2}$	0,997	$3,548 \cdot 10^{-2}$	88,32
5	$6,155 \cdot 10^{-2}$	0,986	$2,768 \cdot 10^{-2}$	0,998	$3,944 \cdot 10^{-2}$	0,996	$3,387 \cdot 10^{-2}$	85,88
6	$5,960 \cdot 10^{-2}$	0,981	$2,728 \cdot 10^{-2}$	0,997	$3,872 \cdot 10^{-2}$	0,995	$3,232 \cdot 10^{-2}$	83,47
7	$5,774 \cdot 10^{-2}$	0,975	$2,689 \cdot 10^{-2}$	0,996	$3,802 \cdot 10^{-2}$	0,993	$3,085 \cdot 10^{-2}$	81,14
8	$5,596 \cdot 10^{-2}$	0,968	$2,651 \cdot 10^{-2}$	0,995	$3,733 \cdot 10^{-2}$	0,991	$2,945 \cdot 10^{-2}$	78,89
9	$5,424 \cdot 10^{-2}$	0,960	$2,614 \cdot 10^{-2}$	0,993	$3,665 \cdot 10^{-2}$	0,989	$2,810 \cdot 10^{-2}$	76,67
10	$5,260 \cdot 10^{-2}$	0,951	$2,577 \cdot 10^{-2}$	0,992	$3,599 \cdot 10^{-2}$	0,986	$2,683 \cdot 10^{-2}$	74,55
11	$5,103 \cdot 10^{-2}$	0,941	$2,541 \cdot 10^{-2}$	0,990	$3,533 \cdot 10^{-2}$	0,983	$2,562 \cdot 10^{-2}$	72,52
12	$4,952 \cdot 10^{-2}$	0,930	$2,506 \cdot 10^{-2}$	0,989	$3,470 \cdot 10^{-2}$	0,980	$2,446 \cdot 10^{-2}$	70,49
13	$4,808 \cdot 10^{-2}$	0,918	$2,472 \cdot 10^{-2}$	0,987	$3,407 \cdot 10^{-2}$	0,976	$2,336 \cdot 10^{-2}$	68,56
14	$4,669 \cdot 10^{-2}$	0,904	$2,438 \cdot 10^{-2}$	0,985	$3,346 \cdot 10^{-2}$	0,972	$2,231 \cdot 10^{-2}$	66,68
15	$4,536 \cdot 10^{-2}$	0,890	$2,405 \cdot 10^{-2}$	0,983	$3,286 \cdot 10^{-2}$	0,968	$2,131 \cdot 10^{-2}$	63,69
20	$4,253 \cdot 10^{-2}$	0,702	$2,316 \cdot 10^{-2}$	0,951	$3,129 \cdot 10^{-2}$	0,906	$1,937 \cdot 10^{-2}$	61,90

Наведені результати наочно демонструють, що в одному й тому ж проміжку часу точність співпадіння $[P]_{tot} - [P]_{chem}$ з $[P]_{enz}$ для різних реакцій може суттєво відрізнитись. Для досліджених двох реакцій вона відрізняється більше, ніж на два порядки (так же, як і у випадку миттєвих та початкових швидкостей).

3.3. Частина кінетичної кривої між лінійним початковим відрізком та рівновагою

Як було показано вище, при віддаленні від лінійної початкової стадії реакції адитивність концентрацій продукту починає порушуватися і чим довше протікає реакція, тим відхилення від адитивності більше.

Якщо прослідкувати, як змінюється різниця $[P]_{tot} - [P]_{enz}$ з плином часу (в умовах детального балансу), то можна побачити, що вона спочатку збільшується, а потім починає зменшуватись і у стані рівноваги стає рівною нулю.

В той же час $[P]_{chem}$ (яка у випадку дотримання адитивності має дорівнювати різниці $[P]_{tot} - [P]_{enz}$) з плином часу зростає і в стані рівноваги досягає значення $^{eq}[P]_{chem}$. Це можна розцінювати як факт того, що ніде, крім початкового лінійного відрізка кінетичної кривої, адитивність концентрацій продукту реакції не виконується.

Різниця $[P]_{tot} - [P]_{chem}$ з плином часу також спочатку збільшується, а потім починає зменшуватись, хоча $[P]_{enz}$ весь час зростає. В той час, коли хімічне перетворення субстрату, що відбувається за механізмом (3), наближається до рівноваги, різниця $[P]_{tot} - [P]_{chem}$ стає від'ємною, оскільки рівноважна концентрація $^{eq}[P]_{chem}$ є завжди більшою, ніж $^{eq}[P]_{tot}$ (в умовах детального балансу). При цьому очевидно, що адитивність не виконується, тому що концентрація продукту ензиматичного перетворення субстрату не може мати негативного значення.

Якщо в умовах детального балансу концентрація продукту узагальненої реакції завжди вища, ніж для хімічного й ензиматичного шляхів перетворення субстрату, то при порушенні принципу детального балансу можливі випадки, коли в певному часовому інтервалі максимальна концентрація продукту буде спостерігатись для ензиматичного або хімічного перетворень субстрату, а не в узагальненій реакції.

3.4. Початкова швидкість в умовах порушення детальнього балансу

Проаналізуємо, чи виконується адитивність початкових швидкостей в умовах, коли реакція, що відбувається за механізмом (1), не підпорядковується принципу детальнього балансу.

Виведемо рівняння миттєвої швидкості для узагальненої реакції w_{tot} (механізм (1)). Для цього знайдемо стаціонарну концентрацію ензим-субстратного комплексу з рівняння

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] + k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] = 0 \quad (36)$$

і підставимо її в рівняння для миттєвої швидкості

$$w_{tot} = k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P] + k_3[S] - k_{-3}[P] \quad (37)$$

В результаті отримаємо наступне рівняння:

$$w_{tot} = [E]_0 \left(\frac{k_1 k_2 [S]_{tot} - k_{-1} k_{-2} [P]_{tot}}{k_1 ([S]_{tot} + K_m) + k_{-2} [P]_{tot}} \right) + k_3 [S]_{tot} - k_{-3} [P]_{tot} \quad (38)$$

Рівняння (38) виконується не тільки для реакцій, що досягають детальної рівноваги, але також і для реакцій, що досягають циклічної рівноваги, тобто є справедливим в загальному випадку.

Миттєва швидкість ензиматичного перетворення субстрату w_{enz} виражається рівнянням:

$$w_{enz} = [E]_0 \left(\frac{k_1 k_2 [S]_{enz} - k_{-1} k_{-2} [P]_{enz}}{k_1 ([S]_{enz} + K_m) + k_{-2} [P]_{enz}} \right) \quad (39)$$

а для хімічного перетворення субстрату миттєва швидкість w_{chem} визначається рівнянням:

$$w_{chem} = k_3 [S]_{chem} - k_{-3} [P]_{chem} \quad (40)$$

Якщо в цьому рівнянні поточну концентрацію субстрату виразити через початкову, то можна побачити, що для хімічного перетворення субстрату залежність миттєвої швидкості від поточної концентрації продукту є лінійною протягом всієї реакції:

$$w_{chem} = k_3[S]_0 - (k_{-3} + k_3)[P]_{chem} \quad (41)$$

Для реакцій, що відбуваються за механізмами (1) і (2), така властивість не характерна.

Як можна побачити, в початковий момент протікання реакції (коли $[P] = 0$) рівняння (38) перетворюється на рівняння для початкової швидкості (34), отримане раніше для узагальненої реакції, що підпорядковується принципу детального балансу. Тому, можна зробити висновок, що як в умовах детального балансу, так і при його порушенні, в початковий момент часу існує адитивність початкових швидкостей, а, відповідно, і концентрацій продукту реакції. Цей висновок залишається справедливим також для випадку, коли реакції хімічного та/або ензиматичного перетворення субстрату, а, відповідно, й узагальнена реакція, є незворотними (тобто коли $k_{-2} = 0$ та/або $k_{-3} = 0$)

Як показують проведені розрахунки, при дотриманні принципу детального балансу (коли константи рівноваги хімічного й ензиматичного перетворень субстрату однакові) хімічне перетворення субстрату відбувається значно швидше, ніж ензиматичне при величинах констант швидкості і концентрацій реагуючих речовин одного порядку. Якщо ж ензиматичне перетворення субстрату проводити в умовах, коли початкова концентрація субстрату перевищує концентрацію ензиму на 3–4 порядки, то константи швидкості хімічного перетворення субстрату мають бути на 4–5 порядків меншими, ніж константи швидкості ензиматичного перетворення субстрату, щоб початкові швидкості цих перетворень були близькі за величиною.

До такого ж висновку можна прийти, проаналізувавши рівняння (37). Оскільки концентрації субстрату й продукту значно більші, ніж ензиму й ензим-субстратного комплексу, у випадку рівних за порядком величини констант швидкості перші два доданки, які виражають швидкість ензиматичного перетворення субстрату, виявляються значно меншими, в порівнянні з двома останніми, що виражають швидкість хімічного перетворення субстрату ($k_3[S] > k_2[ES]$, $k_{-3}[P] > k_{-2}[E][P]$).

Якщо експериментально встановлено, що реакція за участю ензиму практично закінчилась і концентрація продукту залишається незмінною, а за цей же проміжок

часу в хімічному перетворенні субстрату утворилось продукту значно менше, ніж в ензиматичному, то при дотриманні детального балансу це можливо тільки в одному випадку – коли хімічне перетворення субстрату відбувається дуже далеко від рівноваги, практично на лінійній початковій стадії. Якби за цей час хімічна (неензиматична) реакція досягла б рівноваги, то її рівноважна концентрація продукту перевищувала б рівноважну концентрацію продукту реакції з участю ензиму.

3.5. Наявність продукту реакції у реактивах

Розглянемо також випадок, коли реактиви, що використовуються для проведення реакції, містять домішки продукту (в концентрації $[P]_0$). При виведенні рівняння для початкової швидкості в таких умовах вже не можна нехтувати зворотними реакціями другої та третьої стадій, як було зроблено під час виводу рівнянь (30), (31) та (34). В даному випадку можна використати рівняння (38)–(40), в яких поточна концентрація $[S]$ виражається наступним чином: $[S]_0 + [P]_0 - [ES] - [P]$ для узагальненої реакції та ензиматичного перетворення субстрату, і $[S]_0 + [P]_0 - [P]$ – для хімічного перетворення субстрату.

Оскільки вигляд рівнянь залишається незмінним, можна зробити висновок про те, що адитивність виконується також і у випадку, коли домішки продукту присутні в розчинах реактивів у концентрації $[P]_0$. При цьому рівняння початкової швидкості ензиматичного перетворення субстрату в умовах, коли $[E]_0 \ll [S]_0$ та концентрація продукту реакції змінюється мало, має наступний вигляд:

$$v_{enz} = \frac{k_2[E]_0 \left([S]_0 - \frac{[P]_0}{K} \right)}{K_m + [S]_0 + \frac{k_{-2}}{k_1}[P]_0} \quad (42)$$

Якщо є необхідність привести початкову швидкість ензиматичного перетворення субстрату до умов, коли $[P]_0 = 0$, краще діяти наступним чином: записати рівняння (42) у вигляді

$$v_{enz}[S]_0 = -(K_m)v_{enz} - \left(\frac{k_{-2}}{k_1}\right)v_{enz}[P]_0 + (k_2)[E]_0[S]_0 - \left(\frac{k_2}{K}\right)[E]_0[P]_0 \quad (43)$$

і знайти всі коефіцієнти, що записані у дужках; з цих коефіцієнтів можна розрахувати всі константи швидкості і за рівнянням (31) розрахувати початкову швидкість ензиматичного перетворення субстрату, не враховуючи $[P]_0$. Зазначимо, що для того, щоб визначити всі чотири коефіцієнти необхідно, щоб концентрації продукту $[P]_0$ та субстрату $[S]_0$ змінювались незалежно один від одного.

3.6. Адитивність швидкості по концентрації продукту

Внаслідок того, що швидкість реакції, як було показано, з часом все більше відхиляється від лінійності, адитивність швидкостей по часу порушується. В зв'язку з цим проаналізуємо можливість існування адитивності швидкостей по іншим параметрам, зокрема, по концентрації продукту.

Рівняння, що пов'язують миттєву швидкість з концентраціями субстрату та продукту, для узагальненої реакції, ензиматичного та хімічного перетворення субстрату вже були раніше виведені: рівняння (38), (39) і (40) відповідно.

Можемо побачити, що при однакових значеннях концентрацій субстрату і продукту, у випадку всіх трьох реакцій існує адитивність миттєвих швидкостей. Проте досить складно оцінити, чи може відбуватись таке в дійсності. У точності така рівність не може дотримуватися, оскільки ензиматичне перетворення відбувається через утворення ензим-субстратного комплексу, а при хімічному перетворенні він не утворюється. Але якщо врахувати, що концентрація ензим-субстратного комплексу часто є настільки малою, що можна нею знехтувати, можна припустити, що наближено адитивність миттєвих швидкостей може виконуватися.

Простіше перевірити, чи виконується адитивність миттєвих швидкостей, виразивши їх як функцію концентрації продукту. Для узагальненої реакції отримаємо квадратне рівняння відносно w_{tot} , яке можна представити у вигляді:

$$\begin{aligned}
& \{[E]_0(k_2 - k_3) - w_{tot} + k_3[S]_0 - [P](k_3 + k_{-3})\} \{w_{tot} + [P](k_{-2}[E]_0 + k_3 + k_{-3}) - k_3[S]_0\} = \\
& = \{[E]_0(k_2 - k_3) - w_{tot} + k_3[S]_0 - [P](k_3 + k_{-3})\} \left[[S]_0 + \left(\frac{k_{-2}}{k_1} - 1 \right) [P] \right] (k_2 - k_3 + k_{-2}[P]) - \\
& - \{w_{tot} + [P](k_{-2}[E]_0 + k_3 + k_{-3}) - k_3[S]_0\} (k_2 - k_3 + k_{-2}[P]) K_m
\end{aligned} \quad (44)$$

для ензиматичного перетворення – також квадратне рівняння відносно w_{enz} :

$$\begin{aligned}
& (w_{enz} - k_2[E]_0)(w_{enz} + k_{-2}[E]_0[P]) = (w_{enz} + k_{-2}[E]_0[P])(k_2 + k_{-2}[P]) K_m + \\
& + (w_{enz} - k_2[E]_0) \left[[S]_0 + \left(\frac{k_{-2}}{k_1} - 1 \right) [P] \right] (k_2 + k_{-2}[P])
\end{aligned} \quad (45)$$

а для хімічного перетворення – рівняння (41).

Можна перевірити, чи існує адитивність миттєвих швидкостей при однакових концентраціях продукту у всіх трьох реакціях. Після підстановки в рівняння (44) замість w_{tot} виразу

$$w_{tot} = w_{enz} + w_{chem} = w_{enz} + k_3[S]_0 - (k_{-3} + k_3)[P] \quad (46)$$

рівняння (44) не перетворюється в рівняння (45), що свідчить про відсутність адитивності.

Проте, можна показати, що рівняння (44) перетворюється в рівняння (45) у випадку, якщо виразити w_{tot} у вигляді:

$$w_{tot} = w_{enz} + w_{chem} = \frac{w_{enz}(k_2 - k_3 + k_{-2}[P])}{(k_2 + k_{-2}[P])} - \frac{k_3 k_{-2}[E]_0[P]}{(k_2 + k_{-2}[P])} + k_3[S]_0 - [P](k_3 + k_{-3}) \quad (47)$$

Для того, щоб рівняння (47) спростилося до рівняння (46), необхідно виконання двох умов: щоб можна було знехтувати другим членом правої частини рівняння (47) та одночасно щоб перший член дорівнював w_{enz} . Враховуючи, що $k_3[S]_0 - (k_{-3} + k_3)[P]$ не може бути від'ємною величиною, для виконання першої умови необхідно, щоб величина $w_{enz}(k_2 - k_3 + k_{-2}[P])$ значно перевищувала $k_3 k_{-2}[E]_0[P]$, а для виконання другої умови – щоб значення $(k_2 + k_{-2}[P])$ було набагато більшим, ніж k_3 .

Таким чином, в умовах, коли $w_{enz}(k_2 - k_3 + k_{-2}[P]) \gg k_3 k_{-2}[E]_0[P]$ і $(k_2 + k_{-2}[P]) \gg k_3$, адитивність миттєвих швидкостей по концентрації продукту реакції може існувати (рис. 1).

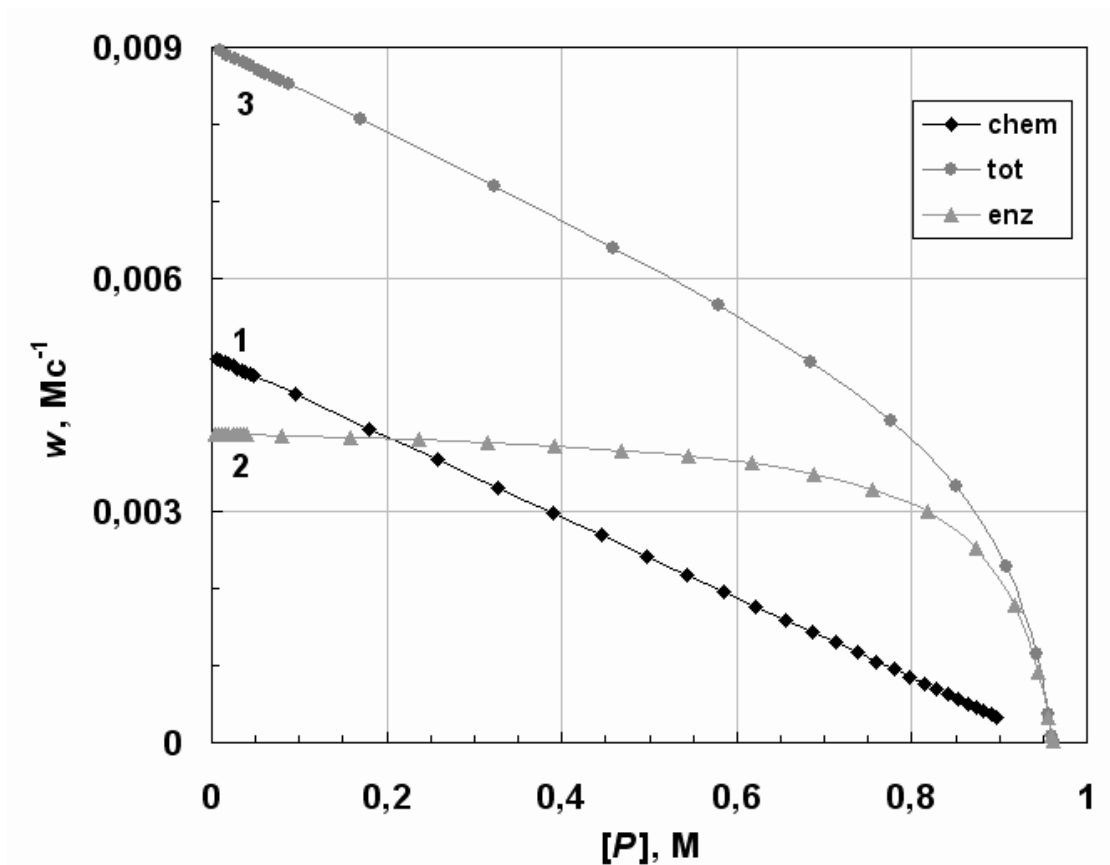


Рис. 1. Залежність миттєвої швидкості (w) від концентрації продукту ($[P]$), що утворюється в ході хімічного перетворення субстрату (крива 1), ензиматичного перетворення субстрату (крива 2), узагальненої реакції (крива 3). Параметри реакції, що були використані для проведення розрахунків: $k_1 = 1 \cdot 10^5$; $k_{-1} = 80$; $k_{-2} = 2000$; $k_2 = 40$; $k_3 = 5 \cdot 10^{-3}$; $k_{-3} = 2 \cdot 10^{-4}$; $K = 25 \text{ Ms}^{-1}$, $K_m = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[S]_0 = 1 \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Перша нерівність може виконуватись під час проведення досліджень при досить низьких концентраціях ензиму і достатньому віддаленні від рівноваги ензиматичного перетворення субстрату (коли w_{enz} досить велика). Друга нерівність, як видається, завжди має виконуватись в умовах детального балансу, оскільки, як було відзначено вище, константи швидкості хімічного перетворення субстрату мають бути значно меншими, ніж константи швидкості ензиматичного перетворення субстрату, щоб початкові швидкості цих перетворень були близькі за величиною.

Результати розрахунків, представлені на рис. 1 для реакції, що підпорядковується принципу детального балансу, показують, що в широкому діапазоні концентрацій продукту реакції виконується адитивність миттєвих

швидкостей. Наприклад, при концентрації продукту 0,009 М сума миттєвих швидкостей $w_{enz} + w_{chem}$ складає 0,00894 Mc^{-1} , а миттєва швидкість узагальненої реакції – 0,00895 Mc^{-1} ; при концентрації продукту 0,032 М сума миттєвих швидкостей $w_{enz} + w_{chem}$ складає 0,00718 Mc^{-1} , а миттєва швидкість узагальненої реакції – 0,00720 Mc^{-1} ; при концентрації продукту 0,0685 М сума миттєвих швидкостей $w_{enz} + w_{chem}$ складає 0,004915 Mc^{-1} , а миттєва швидкість узагальненої реакції – 0,004923 Mc^{-1} ; при концентрації продукту 0,094 М сума миттєвих швидкостей $w_{enz} + w_{chem}$ складає 0,00103 Mc^{-1} , а миттєва швидкість узагальненої реакції – 0,00115 Mc^{-1} .

Таким чином, можна пересвідчитись в тому, що адитивність миттєвих швидкостей по концентрації продукту реакції може виконуватись для реакцій, що підпорядковуються принципу детального балансу.

Розглянемо також випадок, коли досліджувана реакція не підпорядковується принципу детального балансу. Рівняння (44), виведене нами раніше, є справедливим в загальному випадку: як в умовах детального балансу, так і при його порушенні. Тому отриманий раніше висновок залишається також справедливим: в умовах циклічної рівноваги адитивність миттєвих швидкостей по концентрації продукту може існувати в умовах, коли $w_{enz} (k_2 - k_3 + k_{-2}[P]) \gg k_3 k_{-2} [E]_0 [P]$ і $(k_2 + k_{-2}[P]) \gg k_3$.

3.7. Резюме

В результаті проведених досліджень показано, що адитивність концентрацій продукту та початкових швидкостей виконується (як в умовах детального балансу, так і при його порушенні) лише в початковий період протікання реакції, коли відбувається лінійне зростання концентрації продукту в часі. В таких умовах адитивність не порушується і при наявності продукту реакції в реактивах. Проте, чим довше протікає реакція, тим більше порушується адитивність концентрацій продукту та початкових швидкостей.

В умовах рівноваги (як детальної, так і циклічної) адитивність рівноважних концентрацій продукту відсутня, проте в умовах детального балансу рівноважна

концентрація продукту узагальненої реакції одночасно є також і рівноважною концентрацією продукту ензиматичного перетворення субстрату.

Таким чином, для ензиматичних реакцій, у яких у контролі утворюється досить багато продукту реакції (тобто коли хімічне перетворення субстрату проходить з відносно великою швидкістю), точно можна визначити концентрацію продукту ензиматичного перетворення субстрату лише у двох точках: в початковий період протікання реакції, коли концентрація продукту зростає лінійно в часі (по різниці концентрацій продукту, що утворюється в присутності ензиму та в контролі), та в стані рівноваги, де рівноважна концентрація продукту узагальненої реакції одночасно є й рівноважною концентрацією продукту ензиматичного перетворення субстрату (лише в умовах, коли виконується принцип детального балансу). Між цими точками (тобто, фактично протягом всієї реакції) похибка визначення концентрації продукту ензиматичного перетворення субстрату по різниці концентрацій продукту, що утворюється в присутності ензиму та в контролі, може бути досить великою.

При дотриманні умов $(k_2 + k_{-2}[P]) \gg k_3$ і $w_{enz} (k_2 - k_3 + k_{-2}[P]) \gg k_3 k_{-2} [E]_0 [P]$ може виконуватись адитивність миттєвих швидкостей по концентрації продукту. В умовах детального балансу ймовірність дотримання вказаних умов видається досить високою, а при його порушенні ймовірність має бути значно нижчою.

РОЗДІЛ 4

КОЕФІЦІЄНТ ІНГІБУВАННЯ I_{50}

ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ У ФІЗИКО-ХІМІЧНІЙ БІОЛОГІЇ *

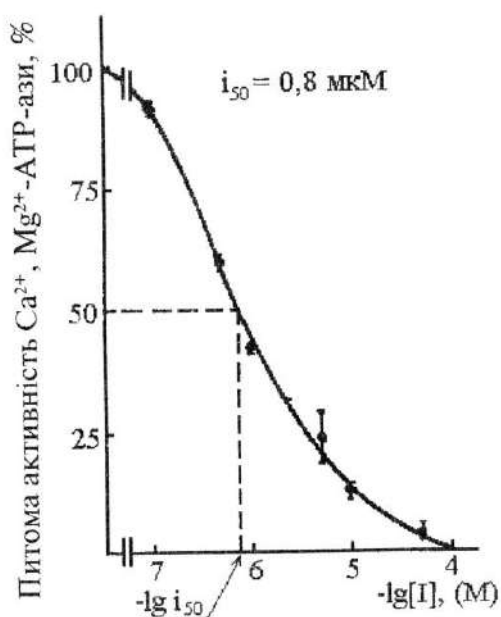
Природні та штучні оборотні інгібітори – низькомолекулярні метаболіти, nereакційноздатні аналоги субстратів, неорганічні іони, фізіологічно-активні фармакологічні сполуки тощо, широко застосовуються у різних галузях біохімії та біофізики, а вивчення їхнього впливу на біохімічні та біофізичні процеси – це одна із типових експериментальних задач сучасної фізико-хімічної біології. Досліджуючи кінетичні закономірності дії цих інгібіторів, наприклад, на каталітичну активність ензимів, активне та пасивне перенесення речовин, зв'язування лігандів з білками і біомембранами, можна, зокрема, одержати корисну інформацію щодо механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту, ліганд-рецепторної взаємодії, а також особливостей регуляції цих процесів низькомолекулярними сполуками [1, 2].

При проведенні кінетичного аналізу дії оборотних інгібіторів I на вищезгадані процеси широкого розповсюдження набуло використання так званого коефіцієнта інгібування – I_{50} . За визначенням, I_{50} – це така концентрація інгібітора, за якої спостерігається зниження початкової швидкості v_0 каталітичного, транспортного чи будь-якого іншого біохімічного або біофізичного процесів на 50 % відносно контролю, тобто за умов відсутності інгібітора у середовищі інкубації [3–6]. Для наочності на рисунку, як зразок, наведено дані Н.М.Слінченко (відділ біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України) стосовно впливу еозину Y (2', 4', 5', 7'-тетрабромфлюоресцеїну) – неспецифічного оборотного інгібітора Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани – на активність високоочищеної транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази, солюбілізованої зі сарколеми гладенького м'язу. У цьому випадку значення I_{50} становить 0,8 мкМ [7].

* Викладений в розділі 4 матеріал був опублікований у статті:

Костерін С.О. Коефіцієнт інгібування I_{50} та його використання у фізико-хімічній біології // Укр. біохім. журн.– 1999.– Т. 71, № 2.– С. 100–103.

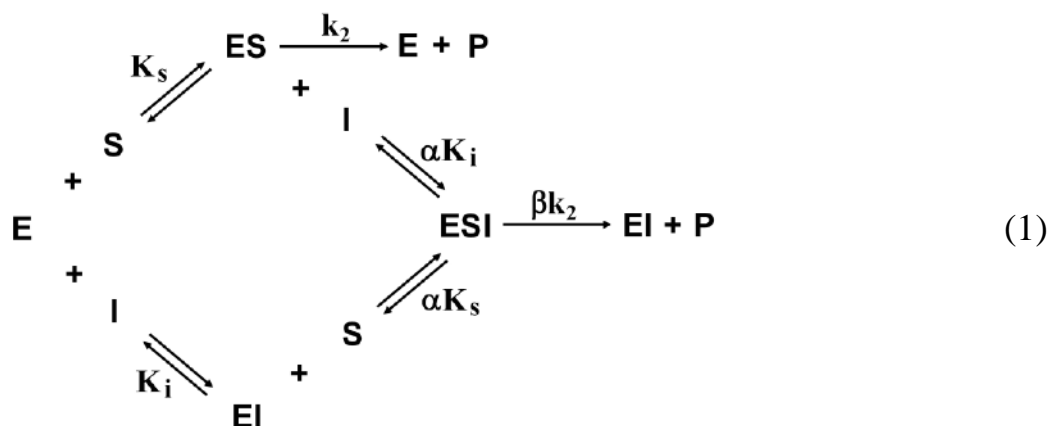
Слід зауважити, що деякі дослідники вважають коефіцієнт інгібування I_{50} показником спорідненості оборотного інгібітора I до ензиму (транспортної системи) E (за принципом: чим більше значення I_{50} , тим менша спорідненість, і навпаки), і тому, використовуючи цей параметр, можна порівнювати різноманітні оборотні інгібітори за їхньою спорідненістю до будь-якої ензиматичної чи транспортної системи.



Каталітичне титрування оборотним інгібітором еозином Y високоочищеної транспортної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТР-ази, солюбілізованої із плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин, з метою визначення коефіцієнта інгібування $I_{50} = 0,8 \text{ мкМ}$ ($n = 4$). Склад середовища інкубації (об'єм – 0,2 мл): 50 мМ трис-НСІ-буфер (рН 7,4), 3 мМ $MgCl_2$, 100 мкМ $CaCl_2$, 3 мМ АТР, 125 мМ KCl , 25 мМ $NaCl$, 100 мкМ ЕГТА. Вміст білка ензимного препарату –

1,5–2,5 мкг. Час інкубації – 10 хв (режим вимірювання початкової швидкості v_0 АТР-гідролізної реакції). За 100 % прийнято значення питомої ензиматичної активності, що спостерігається за відсутності інгібітора у середовищі інкубації [7].

Проте результати відповідного кінетичного аналізу є свідченням того, що точка зору на параметр I_{50} , як показник спорідненості оборотного інгібітора до ензиму (транспортної системи), не є вірною [3, 4, 6]. Проаналізуємо відому в ензимології універсальну кінетичну схему впливу оборотного інгібітора I на ензим (транспортну систему) E :



де S і P – субстрат і продукт ензиматичного (транспортного) процесу відповідно, ES та EI – подвійні комплекси «ензим (транспортна система) – субстрат» та «ензим (транспортна система) – інгібітор» відповідно, EIS – потрійний комплекс «ензим (транспортна система) – інгібітор – субстрат», K_s та K_i – субстратна константа та константа інгібування, які характеризують спорідненість субстрату S та інгібітора I до ензиму (транспортної системи) E відповідно, k_2 – константа швидкості першого порядку («число обертів»), α та β – коефіцієнти модифікації.

Згідно зі схемою (1) окремі випадки дії оборотних інгібіторів відповідають таким значенням цих коефіцієнтів [6]:

- 1) $\alpha = \infty$, β не визначено – повне конкурентне інгібування;
- 2) $\alpha = 1$, $\beta = 0$ – повне неконкурентне інгібування;
- 3) $\alpha = \beta < 1$ – безконкурентне інгібування;
- 4) $\alpha > 1$, $\beta = 0$ – змішане інгібування;
- 5) $\beta = 1$ – псевдоконкурентне інгібування.

Відповідно до кінетичного аналізу реакції (1), який було проведено у рівноважному режимі, для початкової швидкості v_0 ензиматичного чи транспортного процесу можна одержати рівняння Міхаеліса-Ментен:

$$v_0 = \frac{V_m S_0}{K_m + S_0} \quad (2)$$

де V_m та K_m – уявні гранична початкова швидкість та константа Міхаеліса відповідно, S_0 – початкова (загальна) концентрація субстрату ензиматичної чи транспортної реакції за умов, коли

$$V_m = \frac{\alpha K_i + \beta I_0}{\alpha K_i + I_0} k_2 E_0 \quad (3)$$

$$K_m = \frac{K_i + I_0}{\alpha K_i + I_0} \alpha K_s \quad (4)$$

де E_0 та I_0 – загальні концентрації ензиму (транспортної системи) та інгібітора відповідно [6].

Згідно з визначенням I_{50} , як такої загальної концентрації оборотного інгібітора I_0 , при якій значення початкової швидкості v_0 каталітичного (транспортного) процесу дорівнює 50 % від контрольної величини, що спостерігається за відсутності інгібітора, та, використовуючи рівняння (2)–(4), матимемо співвідношення:

$$\frac{k_2 E_0 S_0}{2(K_s + S_0)} = \frac{\frac{\alpha K_i + \beta I_{50}}{\alpha K_i + I_{50}} k_2 E_0 S_0}{\frac{K_i + I_{50}}{\alpha K_i + I_{50}} \alpha K_s + S_0} \quad (5)$$

звідки, після перетворень, одержимо вираз для коефіцієнта інгібування I_{50} :

$$I_{50} = \frac{\frac{\alpha K_i}{1 - 2\beta} (K_s + S_0)}{\frac{\alpha - 2\beta}{1 - 2\beta} K_s + S_0} \quad (6)$$

Проведемо аналіз рівняння (6).

По-перше, у загальному випадку, тобто відповідно до універсальної схеми (1), коефіцієнт інгібування I_{50} не є мірою спорідненості інгібітора I до ензиму (транспортної системи) E , бо безпосередньо він не дорівнює константі інгібування K_i , яка за своїм фізико-хімічним змістом дійсно характеризує цю спорідненість, а є лише пропорційним цій константі.

По-друге, коефіцієнт інгібування I_{50} – це суттєво уявна характеристика інгібуючої дії ефектора, бо значення цього параметра визначається іншими кінетичними характеристиками реакції (1).

Дійсно, через коефіцієнти модифікації α і β коефіцієнт I_{50} залежить від типу дії оборотного інгібітора I (конкурентний, неконкурентний, безконкурентний та т.ін.), а через рівноважні константи K_s та K_i – відповідно від спорідненості субстрату

S та оборотного інгібітора I до ензиму (транспортної системи) E . Крім того, коефіцієнт I_{50} залежить і від початкової (загальної) концентрації субстрату S_0 у середовищі інкубації.

По-третє, залежність I_{50} від S_0 віддзеркалює чутливість коефіцієнта інгібування до концентраційних умов проведення досліду, які вибрані експериментатором суб'єктивно. Таким чином, навіть якщо різні дослідники працюють з одним і тим самим оборотним інгібітором і однаковою ензиматичною (транспортною) системою, яка характеризується фіксованими значеннями α , β , K_s , а також K_i щодо даного інгібітора, вони, в залежності від концентрації субстрату S_0 в інкубаційному середовищі, будуть одержувати різні величини I_{50} .

По-четверте, відповідно до рівняння (6), лише у випадку повного неконкурентного інгібування, коли $\alpha = 1$, $\beta = 0$, коефіцієнт інгібування I_{50} буде безпосередньо дорівнювати константі інгібування K_i , незалежно від концентрації субстрату S_0 . Таким чином, виключно тільки у випадку повного неконкурентного інгібування параметр I_{50} є мірою спорідненості оборотного інгібітора I до ензиму (транспортної системи) E .

Наприклад, для повного конкурентного інгібування, коли $\alpha = \infty$, β не визначено, з рівняння (6) одержуємо такий вираз для коефіцієнта інгібування: $I_{50} = K_i (1 + S_0/K_s)$. Отже, виходячи з цього виразу, у випадку повного конкурентного інгібування параметр I_{50} не буде дорівнювати константі інгібування K_i і відповідно характеризувати спорідненість оборотного інгібітора I до ензиматичної чи транспортної системи E [3, 4, 6]. Але лише за концентраційних умов, коли $S_0 \ll K_s$, тобто коли дослідник працює у концентраційному режимі, який відповідає режиму суттєвої ненасиченості цієї системи субстратом S , матимемо з останнього виразу $I_{50} = K_i$.

Таким чином, лише за умов роботи з низькими (які ненасичують) концентраціями субстрату коефіцієнт I_{50} буде характеризувати спорідненість повного конкурентного інгібітора до ензиму (транспортної системи). Зрозуміло, що такий концентраційний режим має суттєві недоліки, бо для нього буде властивим незначна початкова швидкість v_0 ензиматичного (транспортного) процесу у зв'язку

із використанням субстрату у низьких концентраціях. Така обставина, безумовно, перешкоджатиме проведенню відповідних експериментальних кінетичних вимірювань.

Таким чином, навіть за умов використання однакової концентрації субстрату S_0 , коефіцієнт інгібування I_{50} неможливо надійно застосовувати у біофізичних та біохімічних дослідженнях як показник спорідненості оборотного інгібітора (крім повного неконкурентного інгібітора) до ензиматичної (транспортної) системи. Це положення стосується, перш за все, деяких порівняльних дослідів:

1) Вивчення впливу різних за механізмом дії інгібіторів (повного конкурентного, повного неконкурентного, безконкурентного, змішаного, псевдоконкурентного та т.і.) на будь-який біохімічний (біофізичний) процес. У цьому випадку величина I_{50} залежатиме від властивих для кожної системи «інгібітор – ензиматичний (транспортний) білок» значень коефіцієнтів модифікації α і β та константи інгібування K_i (якщо субстратна константа K_s є постійною).

2) Дослідження впливу одного і того самого інгібітора на різні ензиматичні (транспортні) процеси. Для цього випадку величина I_{50} буде залежати від властивих для кожної системи «інгібітор – ензиматичний (транспортний) білок» значень коефіцієнтів модифікації α і β , константи інгібування K_i та субстратної константи K_s .

Якщо у випадку зазначених порівняльних дослідів є потреба характеризувати саме спорідненість оборотного інгібітора (оборотних інгібіторів) до ензиматичної (ензиматичних) чи транспортної (транспортних) систем, то необхідним є визначення констант інгібування K_i , які дійсно є мірою такої спорідненості. Класичні методи розрахунку цих констант з урахуванням типу дії оборотного інгібітора описано у літературі, що стосується методів кінетичного аналізу у фізико-хімічній біології [3–6, 8].

Таким чином, базуючись на кінетичному аналізі узагальненої схеми дії оборотного інгібітора на ензиматичну/транспортувальну систему, розглянутий коефіцієнт інгібування I_{50} – це емпіричний концентраційний параметр, що широко використовується у біохімічних та біофізичних експериментах з метою кількісної

оцінки ефективності інгібуючої дії. В загальному випадку I_{50} не є мірою спорідненості інгібітора до ензиму (переноснику), а є суттєво уявною величиною, що залежить від:

1) значення коефіцієнтів модифікації α і β , що характеризують тип дії оборотного інгібітора (повне конкурентне, повне неконкурентне, безконкурентне, змішане, псевдоконкурентне інгібування і т.д.);

2) субстратної константи та константи інгібування, які є відповідно мірою спорідненості субстрату й інгібітора бо білка;

3) початкової (загальної) концентрації субстрату в середовищі інкубації.

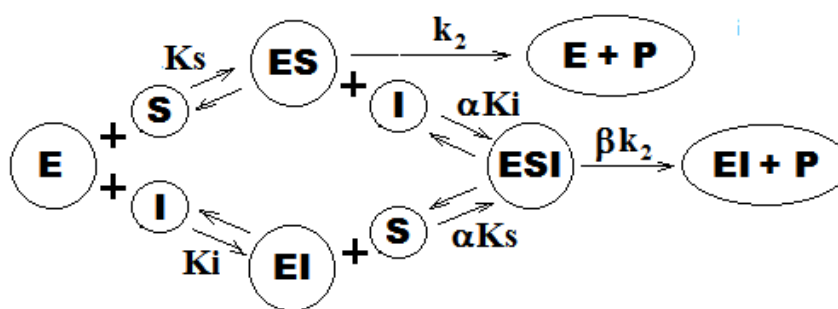
Тому необхідно бути обережним при інтерпретації результатів, одержаних з використанням коефіцієнта інгібування у порівняльних експериментах з вивчення впливу різних за механізмом своєї дії інгібіторів на одну й ту ж ензиматичну (транспортувальну) систему, або при дослідженні дії одного й того ж інгібітора на різні ензиматичні (транспортувальні) системи.

В зв'язку з цим, коефіцієнт інгібування I_{50} , який крім випадку повного неконкурентного інгібування, не є мірою спорідненості даного оборотного ефектора до каталітичного (транспортного) білка, варто трактувати лише як феноменологічний концентраційний параметр, що кількісно характеризує інгібуючий вплив даного ефектора на конкретну ензиматичну (транспортну) систему за умов використання довільної початкової (загальної) концентрації субстрату.

РОЗДІЛ 5 СПОСОБИ

ОЦІНКИ ВПЛИВУ ОБОРОТНИХ ІНГІБІТОРІВ НА ЕНЗИМАТИЧНИЙ ПРОЦЕС ТА РОЗРАХУНКУ КІНЕТИЧНИХ КОНСТАНТ *

Оборотні інгібітори широко застосовуються у біохімії та біофізиці для дослідження механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту, ліганд-рецепторної взаємодії та регулювання активності ензиматичних і транспортних білків. При вивченні цих процесів кількісну оцінку ефективності дії інгібітора часто виражають через коефіцієнт інгібування (I_{50}), значення якого відповідає концентрації інгібітора, при якій досягається зниження початкової швидкості досліджуваного процесу (v_0^i) на 50 % відносно початкової швидкості неінгібованої реакції (v_0) [1–7]. Іноді вважають, що коефіцієнт інгібування I_{50} є показником спорідненості оборотного інгібітора (I) до ензиматичного або транспортного білка (E), а тому, беручи за основу цей параметр, можна порівнювати дію різних оборотних інгібіторів на досліджувані ензиматичні або транспортні системи. Узагальнений механізм дії інгібітора на ензим (транспортний білок) ілюструє така схема [4, 8]:



де S – субстрат ензиматичного або транспортного процесу; K_s й K_i – субстратна й інгібіторна константи відповідно; α й β – термодинамічний та кінетичний коефіцієнти модифікації відповідно; k_2 – число обертів; P – продукт реакції.

* Частина результатів з представлених в розділі 5 була опублікована в статті:

Карахін С.О., Костерін С.О., Жук П.Ф. Новий спосіб оцінки оборотних інгібіторів на ензиматичний процес // Доп. НАН України.– 2010.– № 10.– С. 179–183.

Проте на прикладі даної універсальної кінетичної схеми впливу оборотного інгібітора I на ензим (транспортну систему) E було показано, що в загальному випадку коефіцієнт інгібування I_{50} не є мірою спорідненості інгібітора до білка [4–5, 8], оскільки він, як правило (за винятком випадку повністю неконкурентного інгібування), не дорівнює константі інгібування K_i , яка тільки і може бути показником спорідненості.

Нагадаємо, що за визначенням, I_{50} – це така концентрація інгібітора, використання якої дозволяє знизити початкову швидкість ензиматичної реакції вдвічі відносно контролю, коли інгібітор був відсутній у середовищі інкубації.

При вивченні впливу оборотних інгібіторів на кінетику ензиматичної реакції дослідники співставляють експериментальні дані з теоретичними результатами, одержаними при аналізі узагальненої схеми дії оборотних інгібіторів на ензиматичний процес.

В експериментальних дослідженнях з титрування ензиму оборотним інгібітором, які, як правило, проводять при певній незмінній концентрації субстрату у середовищі інкубації, зазвичай визначають концентрацію інгібітора, при якій початкова швидкість інгібованої реакції v_0^i зменшується в 2 рази відносно швидкості неінгібованої реакції v_0 , тобто коефіцієнт інгібування I_{50} .

В результаті титрування ензиму оборотним інгібітором можна також визначити до якої групи механізмів інгібування відноситься досліджувана реакція: до групи повного, як його часто називають [8, 10] (або лінійного, як рекомендують його називати в [11]) інгібування, коли в результаті дії інгібітора утворюється неактивний ензим-інгібітор-субстратний комплекс EIS (або він зовсім не утворюється, як у випадку повного конкурентного інгібування), що не здатний до розпаду з утворенням продукту реакції (тобто $\beta = 0$); чи до групи часткового [8–10, 12] (гіперболічного [13, 14], або нелінійного, як рекомендують його називати в [11]) інгібування, коли утворюється активний ензим-інгібітор-субстратний комплекс EIS , здатний до розпаду з утворенням продукту реакції P (тобто $0 < \beta \leq 1$).

Ці дві групи механізмів можуть бути легко ідентифіковані, якщо побудувати графік залежності $\frac{1}{v_0^i}$ від початкової концентрації інгібітора I_0 . Для механізмів лінійного інгібування цей графік буде мати вигляд прямої лінії (крива 1, рис. 1), про що й говорить їх назва, а для механізмів нелінійного інгібування на даному графіку пряма лінія не буде утворюватись (крива 2, рис. 1).

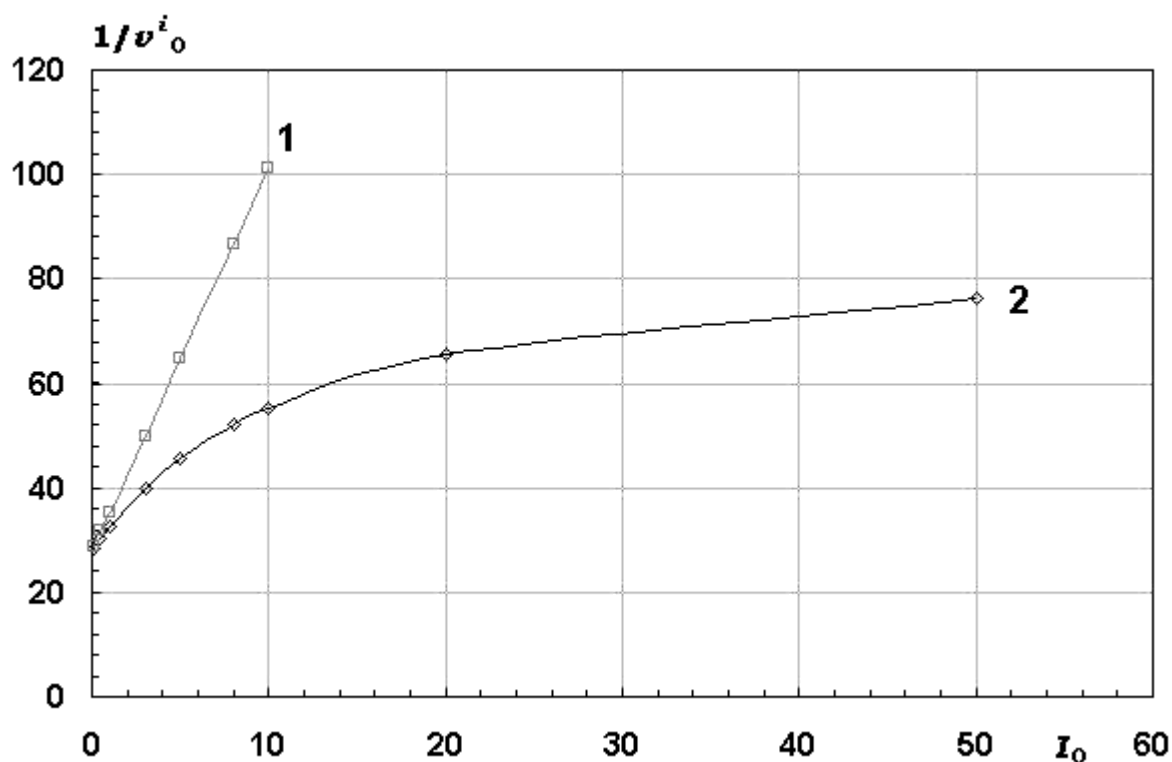


Рис. 1. Залежність оберненої початкової швидкості $\frac{1}{v_0^i}$ (v_0^i виражена в мМс^{-1}) від концентрації інгібітора I_0 (мМ) у випадку лінійного (крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування.

Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ с}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування.

Крім того, у цих двох груп механізмів є й інші суттєві відмінності. При титруванні ензиму оборотним інгібітором активність ензиму у випадку лінійного інгібування знижується до нуля при збільшенні концентрації інгібітора (рис. 2), в той час, як у випадку нелінійного інгібування вона не зменшується до нуля, а залишається на певному, досить високому рівні навіть при високих концентраціях

інгібітора, як показано на рис. 3 (позначимо v_0^{\min} початкову швидкість ензиматичної реакції у присутності великого надлишку оборотного інгібітора). Ці відмінності необхідно враховувати при визначенні коефіцієнта інгібування I_{50} . В загальному випадку значення початкової швидкості, що вдвічі менша за початкову швидкість неінгібованої реакції, має визначатись, як середнє арифметичне між v_0 та v_0^{\min} :

$$v_{0,5}^i = \frac{v_0 + v_0^{\min}}{2} \quad (1)$$

Зрозуміло, що у випадку лінійного інгібування, коли $v_0^{\min} = 0$, це значення буде складати половину від v_0 .

Зазначимо також, що для узагальненого механізму дії інгібітора на ензим коефіцієнт інгібування I_{50} може бути виражений рівнянням:

$$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha K_s + S_0)} \quad (2)$$

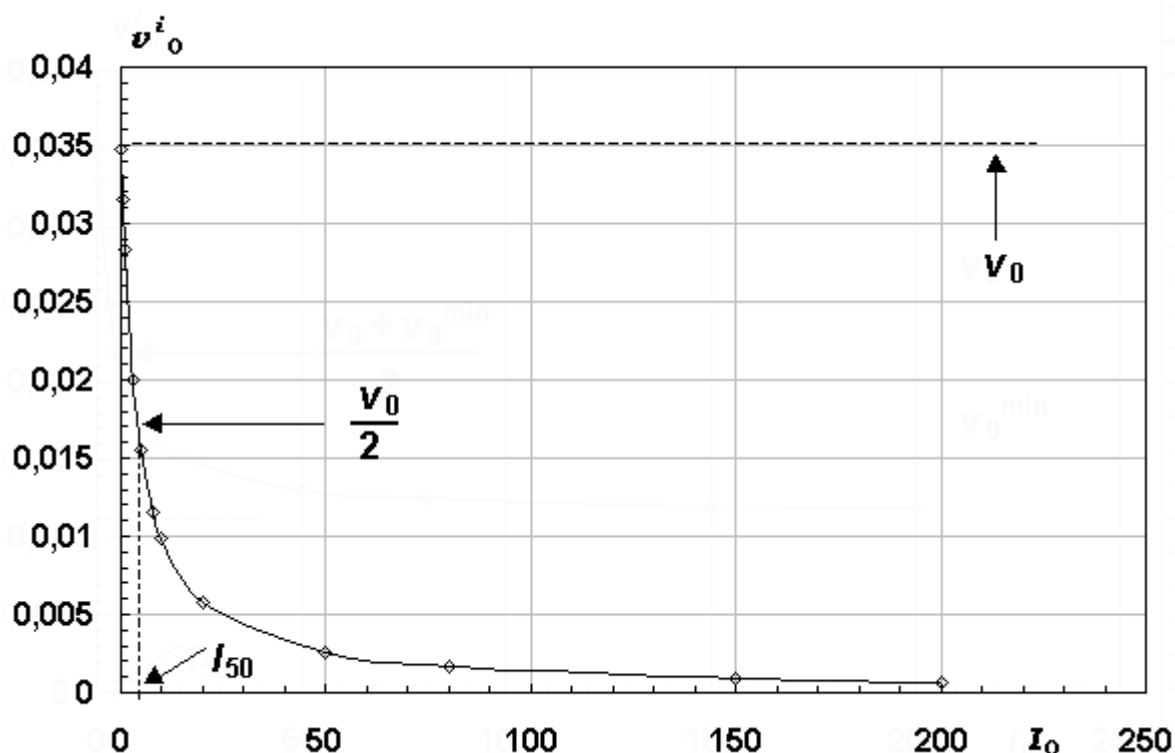


Рис. 2. Залежність початкової швидкості v_0^i (мМс⁻¹) від концентрації інгібітора I_0 (мМ) у випадку лінійного інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50$ с⁻¹, $K_s = 8$ мМ, $K_i = 2$ мМ, $\alpha = 3$, $\beta = 0$, $E_0 = 1$ мкМ, $S_0 = 20$ мМ.

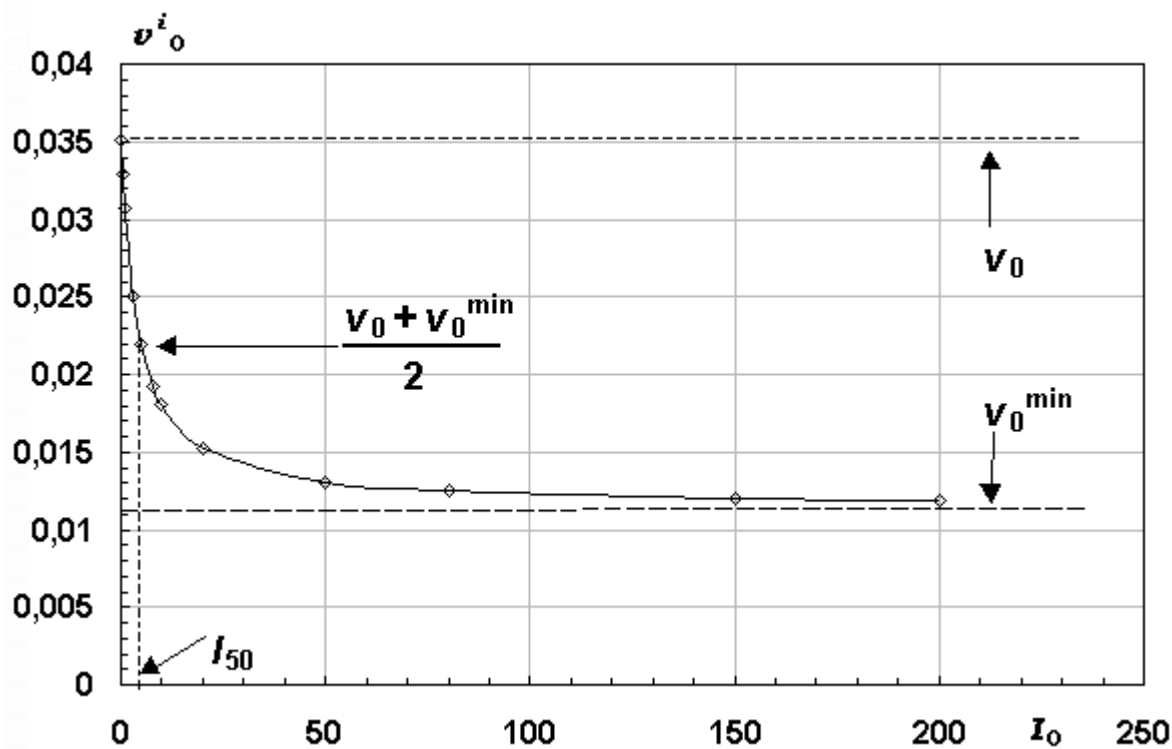


Рис. 3. Залежність початкової швидкості v_0^i ($\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$) від концентрації інгібітора I_0 (mM) у випадку нелінійного інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ mM}$, $K_i = 2 \text{ mM}$, $\alpha = 3$, $\beta = 0,5$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ mM}$.

З даного рівняння видно, що коефіцієнт інгібування I_{50} залежить від концентрації субстрату у середовищі інкубації, а також від констант α , K_i та K_s (і не залежить від коефіцієнта β).

Як свідчить табл. 1, коефіцієнти інгібування I_{50} , що відносяться до різних механізмів, дійсно залежать від констант дисоціації ензим-субстратного (K_s) та ензим-інгібіторного (K_i) комплексів, а також від загальної концентрації субстрату S_0 у середовищі інкубації. Тільки у випадках повністю та неповністю неконкурентного інгібування коефіцієнт інгібування I_{50} дорівнює константі інгібування K_i і не залежить від концентрації субстрату S_0 , а тому може бути використаний в якості міри спорідненості оборотного інгібітора I до ензиму E .

Залежність від загальної концентрації субстрату S_0 у середовищі інкубації є суттєвим недоліком коефіцієнта інгібування I_{50} , що не дозволяє порівнювати результати, які отримані різними дослідниками при вивченні дії інгібіторів на

досліджувану ензиматичну реакцію, якщо вони працювали з різними концентраціями субстрату S_0 в середовищі інкубації.

У ході роботи нами досліджено кількісні аспекти процесу титрування ензиму E оборотним інгібітором I , що проводиться з метою визначення коефіцієнта інгібування I_{50} , для того, щоб, не збільшуючи об'єм експериментальних досліджень, визначити такий параметр, який би не залежав від концентрації субстрату S_0 у середовищі інкубації, адекватно відображав інгібуючу дію і тому був би більш об'єктивним при порівнянні ефективності дії оборотних інгібіторів на досліджувану ензиматичну або транспортувальну систему, ніж коефіцієнт інгібування I_{50} . Крім того, був проведений аналіз узагальненого механізму дії оборотного інгібітора на ензиматичну реакцію з точки зору можливості розрахунку всіх констант, виходячи лише зі значень початкових швидкостей інгібованої та неінгібованої реакцій, що можуть бути легко визначені в процесі титрування ензиму оборотним інгібітором.

Для того, щоб отримати криву титрування для визначення коефіцієнта інгібування I_{50} , необхідно провести вимірювання початкової швидкості v_0^i для кількох різних загальних концентрацій інгібітора I_0 та при незмінній концентрації субстрату S_0 [13]. У відсутності інгібітора початкова швидкість v_0 буде мати найбільше значення.

Побудувавши залежність швидкості v_0^i від загальної концентрації інгібітора I_0 , можна визначити величину I_{50} , що відповідає, як було зазначено вище, концентрації інгібітора при швидкості, що визначається рівнянням (1).

Таким чином, крім визначеного коефіцієнту інгібування I_{50} , в розпорядженні дослідників є також величини початкових швидкостей інгібованої реакції v_0^i та початкова швидкість неінгібованої реакції v_0 , що виражається рівнянням Міхаеліса-Ментен.

Як видно з табл. 1, рівняння початкових швидкостей v_0^i для різних механізмів дії оборотного інгібітора на ензиматичний (транспортний) процес мають певні відмінності, що викликає необхідність проводити кінетичний аналіз окремо для кожного механізму.

Таблиця 1. Рівняння для початкової швидкості інгібованої ензиматичної реакції v_0^i та коефіцієнта інгібування I_{50} для різних механізмів оборотного інгібування

Тип інгібування та значення коефіцієнтів модифікації	Рівняння для початкової швидкості v_0^i	Рівняння для коефіцієнта інгібування I_{50}
1. Повністю конкурентний, $\alpha = \infty$, β – не визначено	$v_0^i = \frac{K_i k_2 E_0 S_0}{K_s K_i + K_i S_0 + K_s I_0}$	$I_{50} = \frac{K_i (K_s + S_0)}{K_s}$
2. Неповністю конкурентний, $\alpha > 1$, $\beta < 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha K_s + S_0)}$
3. Частково конкурентний, $\alpha > 1$, $\beta = 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha K_s + S_0)}$
4. Конкурентно-неконкурентний, $\alpha > 1$, $\beta = 0$	$v_0^i = \frac{\alpha K_i k_2 E_0 S_0}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + \alpha K_s I_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{\alpha K_s + S_0}$
5. Повністю неконкурентний, $\alpha = 1$, $\beta = 0$	$v_0^i = \frac{K_i k_2 E_0 S_0}{(K_s + S_0)(K_i + I_0)}$	$I_{50} = K_i$
6. Неповністю неконкурентний, $\alpha = 1$, $\beta < 1$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (K_i + \beta I_0)}{(K_s + S_0)(K_i + I_0)}$	$I_{50} = K_i$
7. Повністю безконкурентний, $K_i = \infty$, $\beta = 0$, $\alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{\alpha K_i k_2 E_0 S_0}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0}$
8. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty$, $\beta < 1$, $\alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0}$
9. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty$, $\beta = 1$, $\alpha K_s = 0$	$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + I_0)}{\alpha K_s K_i + \alpha K_i S_0 + S_0 I_0}$	$I_{50} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0}$

Відповідно до універсальної кінетичної схеми впливу оборотного інгібітора I на ензим E виділяють кілька типів інгібування, що пов'язані з певним співвідношенням швидкостей елементарних стадій реакції через коефіцієнти модифікації α і β [4, 8, 12, 13]. Для кожного з цих типів інгібування в табл. 1 приведені рівняння для початкової швидкості v_0^i та коефіцієнта інгібування I_{50} .

5.1. Константа інгібуючої дії

Аналіз універсальної кінетичної схеми впливу оборотного інгібітора на ензим, проведений у рівноважному наближенні, показує, що є можливість отримати деяку нову додаткову інформацію про досліджувану ензиматичну реакцію, використовуючи не тільки коефіцієнт інгібування I_{50} , але також і початкові швидкості реакції при досліджуваних концентраціях інгібітора (I_0).

Початкова швидкість для неінгібованої ензиматичної реакції може бути записана рівнянням Міхаеліса-Ментен:

$$v_0 = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_s + S_0} \quad (3)$$

В присутності інгібітора початкова швидкість змінюється і для узагальненого механізму вона може бути виражена наступним рівнянням:

$$v_0^i = \frac{k_2 E_0 S_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_i (K_s + S_0) + I_0 (\alpha K_s + S_0)} \quad (4)$$

Для того, щоб визначити, у скільки разів інгібітор загальмував реакцію, розділимо рівняння (3) на рівняння (4):

$$\frac{v_0}{v_0^i} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0) + I_0 (\alpha K_s + S_0)}{(K_s + S_0) (\alpha K_i + \beta I_0)} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0) + I_0 (\alpha K_s + S_0)}{\alpha K_i (K_s + S_0) + \beta I_0 (K_s + S_0)} \quad (5)$$

Поглянувши на одержане рівняння, можна побачити, що чисельник і знаменник майже співпадають – невелика різниця є тільки в останніх доданках. Додамо й віднімемо в чисельнику $\beta I_0 (K_s + S_0)$

$$\frac{v_0}{v_0^i} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0) + I_0 (\alpha K_s + S_0) + \beta I_0 (K_s + S_0) - \beta I_0 (K_s + S_0)}{\alpha K_i (K_s + S_0) + \beta I_0 (K_s + S_0)} \quad (6)$$

і отримаємо рівняння в наступному вигляді:

$$\frac{v_0}{v_0^i} = 1 + \frac{I_0 [(\alpha K_s + S_0) - \beta (K_s + S_0)]}{(K_s + S_0)(\alpha K_i + \beta I_0)} \quad (7)$$

Тепер можна перенести одиницю в ліву частину рівняння:

$$\frac{v_0}{v_0^i} - 1 = \frac{I_0 [(\alpha - \beta) K_s + (1 - \beta) S_0]}{(K_s + S_0)(\alpha K_i + \beta I_0)} = \frac{I_0 [(\alpha K_s + S_0) - \beta (K_s + S_0)]}{(K_s + S_0)(\alpha K_i + \beta I_0)} \quad (8)$$

Вираз з лівого боку може бути інтерпретований, як величина, що означає у скільки разів змінилась швидкість реакції (від рівня неінгібованої реакції) по відношенню до швидкості реакції у присутності даної концентрації інгібітора. Такі співвідношення часто називають індексом гальмування, або ступенем гальмування [15]. Таким чином, визначенням індексу гальмування, (позначимо його грецькою буквою φ) є рівняння:

$$\varphi = \left(\frac{v_0}{v_0^i} - 1 \right) = \frac{(v_0 - v_0^i)}{v_0^i} \quad (9)$$

Тепер рівняння (8) може бути приведенне до вигляду:

$$\frac{I_0}{\varphi} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0) + (K_s + S_0) \beta I_0}{(\alpha - \beta) K_s + (1 - \beta) S_0} = \frac{\alpha K_i + \beta I_0}{\frac{(\alpha K_s + S_0)}{(K_s + S_0)} - \beta} = \frac{\alpha K_i + \beta I_0}{\frac{\alpha K_i}{I_{50}} - \beta} = \frac{\left(\frac{\alpha K_i}{\beta} + I_0 \right) I_{50}}{\frac{\alpha K_i}{\beta} - I_{50}} \quad (10)$$

(з рівняння (10) випливає, що співвідношення αK_i до β завжди більше, ніж I_{50}).

Це рівняння є лінійним у координатах $\frac{I_0}{\varphi} - I_0$, тому, побудувавши графік

прямої ми можемо визначити тангенс кута її нахилу ($tg\alpha$), та відрізок, який вона відсікає на осі ординат (Y):

$$Y = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha - \beta) K_s + (1 - \beta) S_0} = \frac{\alpha K_i I_{50}}{\alpha K_i - \beta I_{50}} \quad (11)$$

$$tg \alpha = \frac{\beta (K_s + S_0)}{(\alpha - \beta) K_s + (1 - \beta) S_0} = \frac{\beta I_{50}}{\alpha K_i - \beta I_{50}} \quad (12)$$

Проведений аналіз (табл. 2) показує, що графік залежності $\frac{I_0}{\varphi}$ від I_0 (або

$\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$ від I_0), завжди є прямою лінією, яка може бути або паралельною осі

абсцисс, або проходити під певним кутом нахилу до неї (рис. 4).

Якщо отримана пряма є паралельною до осі абсцисс, то це означає, що механізм дії інгібітора на досліджувану ензиматичну реакцію полягає в тому, що утворюється неактивний ензим-інгібітор-субстратний комплекс (або він взагалі не утворюється, як у випадку повного конкурентного інгібування), який не розпадається з утворенням продукту (продукт утворюється тільки внаслідок розпаду ензим-субстратного комплексу), тобто, для досліджуваного механізму інгібування коефіцієнт модифікації β (див. схему) дорівнює нулеві (повне або лінійне інгібування [9, 14]). Для таких механізмів (див. 1, 4, 5, 7 у табл. 2) величина $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$

точно дорівнює величині коефіцієнта інгібування I_{50} , чим можна послуговатися для ідентифікації цих механізмів (крива 1, рис. 4).

Механізми нелінійного інгібування (див. 2, 3, 6, 8, 9 у табл. 2) з активним ензим-інгібітор-субстратним комплексом (часткове або гіперболічне інгібування [9, 12, 14]) дають пряму, що має певний кут нахилу до осі абсцисс (крива 2, рис. 4).

Таблиця 2. Ідентифікація механізмів оборотного інгібування з активним та неактивним ензим-інгібітор-субстратним комплексом методом лінеаризації експериментальних даних у координатах $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)} - I_0$. Для механізмів з $\beta = 0$ спостерігається відповідність між величинами $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$ та I_{50} , а механізми з активним ензим-інгібітор-субстратним комплексом можуть бути охарактеризовані за допомогою константи інгібувальної дії Q_I , яка включає в себе тільки ті параметри, які визначаються інгібітором (α , β та K_i).

Тип інгібування та значення коефіцієнтів модифікації	Лінеаризація у координатах $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)} - I_0$	Значення параметра Q_I	Відповідність I_{50} та $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$
1. Повністю конкурентний, $\alpha = \infty$, β – не визначено	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{K_i(K_s + S_0)}{K_s}$	–	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
2. Неповністю конкурентний, $\alpha > 1$, $\beta < 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i(K_s + S_0) + (K_s + S_0)\beta I_0}{K_s(\alpha - \beta) + S_0(1 - \beta)}$	$Q_I = \frac{\alpha K_i}{\beta}$	–
3. Частково конкурентний, $\alpha > 1$, $\beta = 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(K_s + S_0)(\alpha K_i + I_0)}{K_s(\alpha - 1)}$	$Q_I = \alpha K_i$	–
4. Конкурентно-неконкурентний, $\alpha > 1$, $\beta = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i(K_s + S_0)}{\alpha K_s + S_0}$	–	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
5. Повністю неконкурентний, $\alpha = 1$, $\beta = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = K_i$	–	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
6. Неповністю неконкурентний, $\alpha = 1$, $\beta < 1$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{K_i + \beta I_0}{(1 - \beta)}$	$Q_I = \frac{K_i}{\beta}$	–

7. Повністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 0, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{S_0}$	-	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = I_{50}$
8. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta < 1, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(\alpha K_i + \beta I_0)(K_s + S_0)}{S_0 - \beta(K_s + S_0)}$	$Q_i = \frac{\alpha K_i}{\beta}$	-
9. Неповністю безконкурентний, $K_i = \infty, \beta = 1, \alpha K_s = 0$	$\frac{v_0^i I_0}{v_0 - v_0^i} = \frac{(\alpha K_i + I_0)(K_s + S_0)}{-K_s}$	$Q_i = \alpha K_i$	-

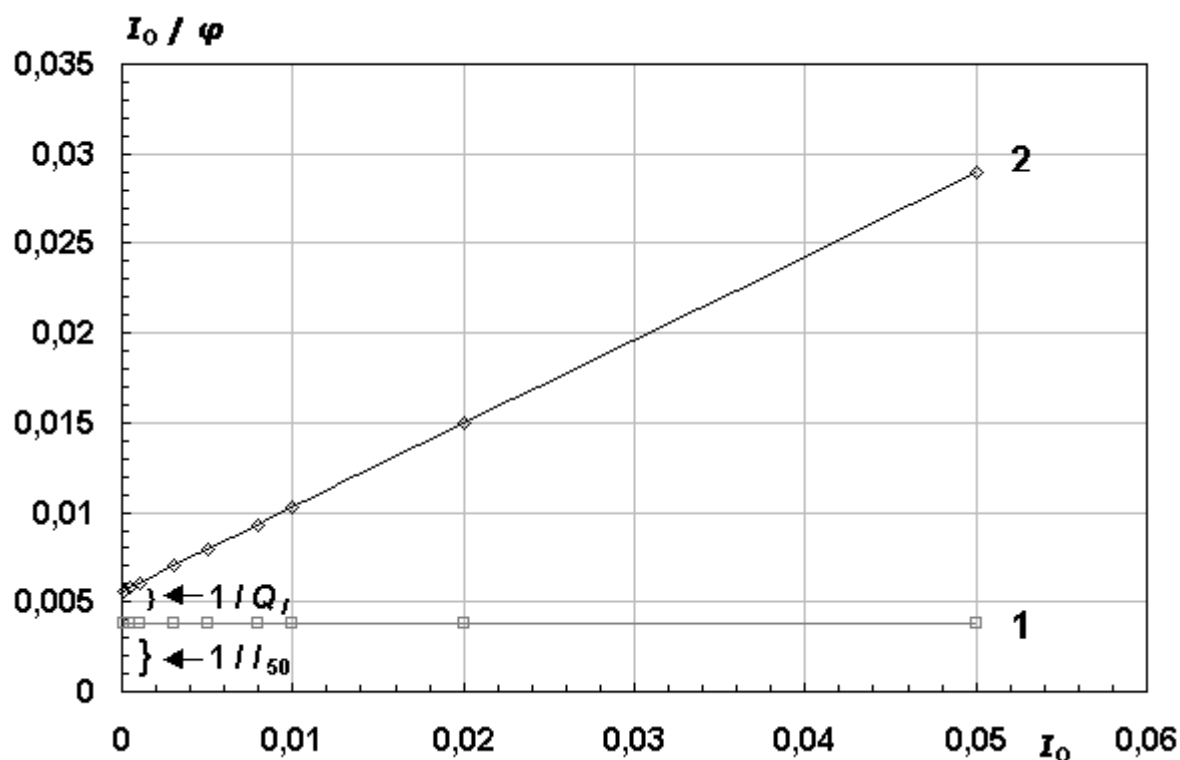


Рис. 4. Залежність $\frac{I_0}{\varphi}$ від концентрації інгібітора I_0 (М) у випадку лінійного

(крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ s}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування.

Ця пряма перетинає вісь абсцис у точці $I_0 = -\frac{\alpha K_i}{\beta}$. Це значення можна отримати також розділивши величину відрізка, який пряма відсікає на осі ординат (Y), на величину тангенса кута нахилу прямої ($tg\alpha$). Розрахована величина залежить тільки від коефіцієнтів модифікації та константи інгібування K_i , а тому і сама є константою для досліджуваної ензиматичної реакції. Вона може бути названа константою інгібуючої дії Q_I (розмірність – концентраційна):

$$Q_I = \frac{Y}{tg\alpha} = \frac{\alpha K_i}{\beta} \quad (13)$$

Фактично константа інгібуючої дії Q_I включає в себе саме ті (і тільки ті) параметри, які визначаються інгібітором. Вона не залежить ні від субстратної константи K_s , ні від концентрації субстрата S_0 в середовищі інкубації (на відміну від коефіцієнта інгібування I_{50}), і може використовуватися для порівняння даних, одержаних різними дослідниками при вивченні процесів інгібування однієї й тієї самої ензиматичної реакції певним інгібітором при різних концентраціях субстрату (як було зазначено вище, зазвичай концентрації субстрату S_0 та інгібітора I_0 вибирають довільно). Константа інгібуючої дії Q_I може бути корисною при порівнянні даних, одержаних при титруванні досліджуваного білка певним інгібітором в присутності субстратів-аналогів. Такий підхід дозволяє оцінити співвідношення $\frac{\alpha}{\beta}$, оскільки Q_I не залежить від K_s , а K_i при цьому залишається незмінною.

У загальному випадку за допомогою константи інгібуючої дії Q_I можна порівнювати дію різних інгібіторів на різні ензиматичні реакції (що відбуваються за механізмами нелінійного інгібування 2, 3, 6, 8, 9 з табл. 2): при цьому слід просто пам'ятати, що Q_I змінюється пропорційно αK_i і обернено пропорційно β .

Таким чином, для всіх можливих механізмів нелінійного інгібування, в яких ензим-інгібітор-субстратним комплекс є активним (див. механізми 2, 3, 6, 8, 9 з табл. 2), параметр Q_I визначається за однаковою методикою.

Для механізмів лінійного інгібування, в яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс залишається неактивним ($\beta = 0$), неможливо визначити параметр Q_I , оскільки значення $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$ виявляється незалежним від концентрації інгібітора I_0 .

Але в цих випадках значення $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$ повністю ідентичне коефіцієнту інгібування

I_{50} . Практично факт незалежності $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)}$ від концентрації інгібітора I_0 і збігу його

з I_{50} є критерієм визначення механізмів лінійного інгібування (з неактивним ензим-інгібітор-субстратним комплексом).

З табл. 2 видно, що для механізмів лінійного інгібування, в яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс не здатен розпадатись з утворенням продукту (або зовсім не утворюється), пряма у координатах $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)} - I_0$ є паралельною осі абсцис

і відсікає на осі ординат відрізок, який чисельно дорівнює коефіцієнту інгібування $Y = I_{50}$ (крива 1, рис. 4).

Для механізмів нелінійного інгібування, у яких ензим-інгібітор-субстратний комплекс розпадається з утворенням продукту, пряма у координатах $\frac{v_0^i I_0}{(v_0 - v_0^i)} - I_0$

нахиляється відносно осі абсцис і точка перетину прямої та осі ординат внаслідок цього зміщується, в результаті чого відрізок, що відсікається на осі ординат Y , перестає бути таким, який чисельно дорівнює коефіцієнту інгібування I_{50} (крива 2, рис. 4). Константа інгібуючої дії Q_I якраз і відображає ступінь відхилення Y від I_{50} :

$$\frac{1}{Y} - \frac{1}{I_{50}} = \frac{1}{Q_I} = \frac{\beta}{\alpha K_i} \quad (14)$$

З даного рівняння видно, що для механізмів з $\beta = 0$ справджується рівність $Y = I_{50}$ і для них неможливо розрахувати параметр Q_I .

Можна також показати, що Q_I відповідає такій концентрації інгібітора, яка дозволяє зменшити початкову швидкість інгібованої реакції v_0^i у z разів відносно початкової швидкості неінгібованої реакції v_0 , і значення z визначається рівнянням:

$$z = \frac{1}{2} + \frac{(\alpha K_s + S_0)}{2\beta(K_s + S_0)} = \frac{1}{2} + \frac{\alpha K_i}{2\beta I_{50}} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{Q_I}{I_{50}} \right) \quad (15)$$

Крім описаних вище методів, що дозволяють визначити, до якої групи механізмів відноситься експериментально досліджувана реакція – до лінійного чи нелінійного інгібування, можна запропонувати також інший метод, в якому індекс гальмування виражається як функція $\left(\frac{I_0}{I_{50}} \right)^n$:

$$\varphi = \left(\frac{I_0}{I_{50}} \right)^n \quad (16)$$

Якщо з рівняння (2) знайти $(\alpha K_s + S_0)$ і підставити його в рівняння (8), то будемо мати:

$$\varphi = \frac{I_0 \left[\frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{I_{50}} - \beta (K_s + S_0) \right]}{(K_s + S_0)(\alpha K_i + \beta I_0)} = \frac{I_0 (\alpha K_i - \beta I_{50})}{I_{50} (\alpha K_i + \beta I_0)} = \frac{I_0 (Q_I - I_{50})}{I_{50} (Q_I + I_0)} \quad (17)$$

Порівнюючи рівняння (17) з рівнянням (16) можна дійти висновку, що для узагальненого механізму рівняння (16) не виконується. Внаслідок існування множника $\frac{(\alpha K_i - \beta I_{50})}{(\alpha K_i + \beta I_0)}$ показник ступеня n у рівнянні (16) має відрізнитись від одиниці (крива 2, рис.5).

Для механізмів лінійного інгібування, для яких $\beta = 0$, рівняння (17) перетворюється на рівняння

$$\varphi = \frac{I_0}{I_{50}} \quad (18)$$

яке свідчить про те, що для механізмів лінійного інгібування рівняння (16) виконується. При цьому показник ступеня n має завжди бути рівним одиниці, а графік, побудований за рівнянням

$$\log \varphi = n \log I_0 - n \log I_{50} \quad (19)$$

має бути прямою лінією (крива 1, рис. 5).

Таким чином, якщо значення показника ступеня n , розрахованого за допомогою лінеаризованого рівняння (19), дорівнює одиниці, то досліджувана реакція протікає за одним з механізмів лінійного інгібування. Якщо ж визначене значення n відрізняється від одиниці, то досліджувана реакція протікає за одним з механізмів нелінійного інгібування.

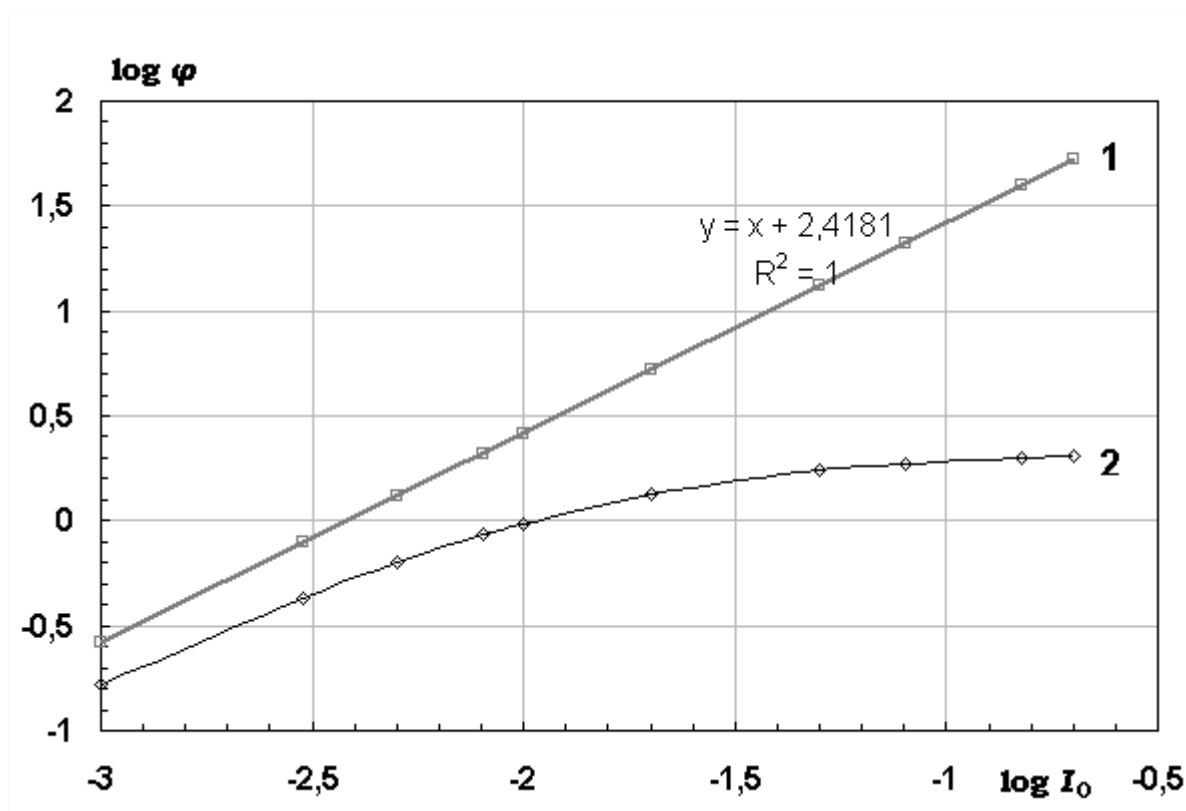


Рис. 5. Залежність φ від концентрації інгібітора I_0 (у логарифмічних координатах) у випадку лінійного (крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ с}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування. Тангенс кута нахилу кривої 1 (тобто n) дорівнює 1, а для кривої 2 $n < 1$ і зменшується зі зростанням концентрації інгібітора.

5.2. Використання методу лінеаризації для визначення Q_I та I_{50}

Можна застосувати інший метод визначення коефіцієнта інгібування I_{50} (для механізмів лінійного та нелінійного інгібування) та константи інгібуючої дії Q_I (для механізмів нелінійного інгібування). Візьмемо певну концентрацію інгібітора за базову I_0^b , й відповідну початкову швидкість позначимо v_0^b

$$v_0^b = \frac{(\alpha K_i + \beta I_0^b) k_2 E_0 S_0}{\alpha K_i (K_s + S_0) + (\alpha K_s + S_0) I_0^b} \quad (20)$$

а всі подальші концентрації інгібітора подамо у вигляді $I_0 = I_0^b + \Delta I$ з відповідними початковими швидкостями v_0^i

$$v_0^i = \frac{[\alpha K_i + \beta (I_0^b + \Delta I_0)] k_2 E_0 S_0}{\alpha K_i (K_s + S_0) + (\alpha K_s + S_0) (I_0^b + \Delta I_0)} \quad (21)$$

Розрахуємо співвідношення $\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)}$:

$$\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)} = \frac{[(\alpha K_i + \beta I_0^b + \beta \Delta I_0)] [\alpha K_i (K_s + S_0) + (\alpha K_s + S_0) I_0^b]}{\alpha K_i [(\alpha K_s + S_0) - \beta (K_s + S_0)] \Delta I_0} \quad (22)$$

запишемо його через коефіцієнт інгібування I_{50} (враховуючи рівняння (2))

$$\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)} = \frac{\beta \left(\frac{\alpha K_i}{\beta} + I_0^b + \Delta I_0 \right) \left[\frac{\alpha K_i (K_s + S_0)}{(\alpha K_s + S_0)} + I_0^b \right]}{\alpha K_i \left[1 - \beta \frac{(K_s + S_0)}{(\alpha K_s + S_0)} \right] \Delta I_0} = \frac{\beta \left(\frac{\alpha K_i}{\beta} + I_0^b + \Delta I_0 \right) (I_{50} + I_0^b)}{\alpha K_i \left(1 - \frac{\beta}{\alpha K_i} I_{50} \right) \Delta I_0} \quad (23)$$

та через константу інгібуючої дії Q_I (враховуючи рівняння (13))

$$\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)} = \frac{(Q_I + I_0^b + \Delta I_0) (I_{50} + I_0^b)}{Q_I \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I} \right) \Delta I_0} = \frac{(Q_I + I_0^b) (I_{50} + I_0^b) + \Delta I_0 (I_{50} + I_0^b)}{(Q_I - I_{50}) \Delta I_0} \quad (24)$$

Отримане рівняння можна лінеаризувати

$$\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)} = \frac{(I_{50} + I_0^b)}{(Q_I - I_{50})} + \frac{(Q_I + I_0^b)(I_{50} + I_0^b)}{(Q_I - I_{50})} \frac{1}{\Delta I_0} \quad (25)$$

Для узагальненого механізму та механізмів нелінійного (часткового або гіперболічного) інгібування графік у координатах $\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)}$ від $\frac{1}{\Delta I_0}$ буде прямою лінією, що перетинає вісь абсцис у точці $\Delta I_0 = -\frac{1}{Q_I + I_0^b}$ (крива 2, рис. 6), звідки, знаючи I_0^b , можна розрахувати константу інгібуючої дії Q_I .

Q_I може бути також розрахована зі співвідношення тангенса кута нахилу прямої $tg\alpha$ та відрізка, що відсікається прямою на осі ординат Y :

$$\frac{tg\alpha}{Y} = Q_I + I_0^b \quad (26)$$

Після цього, знаючи величини відрізка, що відсікається прямою на осі ординат Y та константи інгібуючої дії Q_I , можна розрахувати й значення коефіцієнта інгібування I_{50}

$$I_{50} = \frac{Q_I Y - I_0^b}{(Y + 1)} \quad (27)$$

Для механізмів лінійного (повного) інгібування графік у координатах $\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)}$ від $\frac{1}{\Delta I_0}$ також буде прямою лінією, але вона буде проходити через початок системи координат (крива 1, рис. 6)

$$\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)} = \frac{I_{50} + I_0^b}{\Delta I_0} \quad (28)$$

Відповідно, для механізмів лінійного (повного) інгібування з величини тангенса кута нахилу прямої $tg\alpha = I_{50} + I_0^b$ можна визначити значення I_{50} .

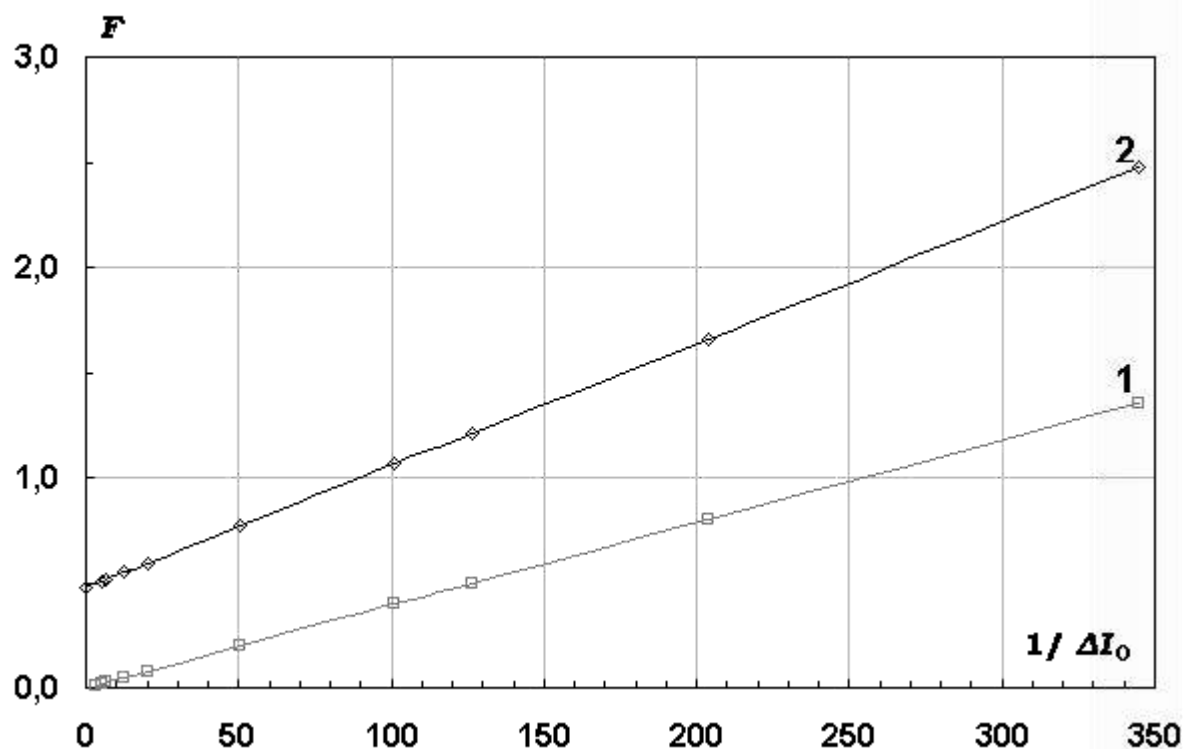


Рис. 6. Залежність $\frac{v_0^i}{(v_0^b - v_0^i)}$ (на графіку позначено як F) від $\frac{1}{\Delta I_0}$ у випадку

лінійного (крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ mM}$, $K_i = 2 \text{ mM}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ mM}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування.

Ще одним рівнянням, що може бути використане для розрахунку константи інгібуючої дії Q_I та коефіцієнта інгібування I_{50} у випадку дослідження реакцій з механізмами нелінійного інгібування, є рівняння, що показує, як співвідносяться дані константи з швидкостями реакції v_0^i і v_0^{\min} :

$$\frac{v_0^i}{v_0^{\min}} = \left(\frac{Q_I + I_0}{I_{50} + I_0} \right) \quad (29)$$

Це рівняння можна лінеаризувати

$$\frac{(v_0^i - v_0^{\min}) I_0}{v_0^{\min}} = Q_I - \frac{v_0^i}{v_0^{\min}} I_{50} \quad (30)$$

і розрахувати константи: величина тангенса кута нахилу прямої лінії буде рівна I_{50} , а величина відрізка, що відсікається прямою на осі ординат, буде рівна Q_I (рис. 7).

Можна показати, що співвідношення початкових швидкостей v_0 та v_0^{\min} дорівнює співвідношенню Q_I й I_{50} :

$$\frac{v_0}{v_0^{\min}} = \frac{Q_I}{I_{50}} \quad (31)$$

Для одночасного розрахунку Q_I і I_{50} можна використовувати також наступне рівняння:

$$\frac{v_0^i}{v_0} = \frac{I_{50}(\alpha K_i + \beta I_0)}{\alpha K_i(I_{50} + I_0)} = \frac{I_{50}(Q_i + I_0)}{Q_I(I_{50} + I_0)} \quad (32)$$

Його можна привести до лінійного вигляду й розрахувати обидві константи Q_I й I_{50} (криві 2, рис.8 та рис. 9 відповідно)

$$\frac{(v_0 - v_0^i)}{v_0 I_0} = \frac{v_0^i}{v_0 I_{50}} - \frac{\beta}{\alpha K_i} = \frac{v_0^i}{v_0 I_{50}} - \frac{1}{Q_i} \quad (33)$$

$$\frac{\varphi}{I_0} = \frac{1}{I_{50}} - \frac{v_0 \beta}{v_0^i \alpha K_i} = \frac{1}{I_{50}} - \frac{v_0}{v_0^i Q_i} \quad (34)$$

Якщо досліджувана реакція протікає за одним з механізмів лінійного інгібування, то в координатах $\frac{(v_0 - v_0^i)}{v_0 I_0} - \frac{v_0^i}{v_0}$ утворюється пряма лінія, що проходить

через початок системи координат, тангенс кута нахилу якої дорівнює $\frac{1}{I_{50}}$ (крива 1, рис.8).

В координатах $\frac{\varphi}{I_0} - \frac{v_0}{v_0^i}$ пряма лінія розташовується паралельно осі абсцис і

відсікає на осі ординат відрізок, рівний за величиною $\frac{1}{I_{50}}$ (крива 1, рис.9).

Якщо в рівняння (32) замість I_0 підставити Q_I , то можна пересвідчитись, що в результаті утворюється рівняння (15), в якому z виражається співвідношенням початкових швидкостей v_0 та v_0^i .

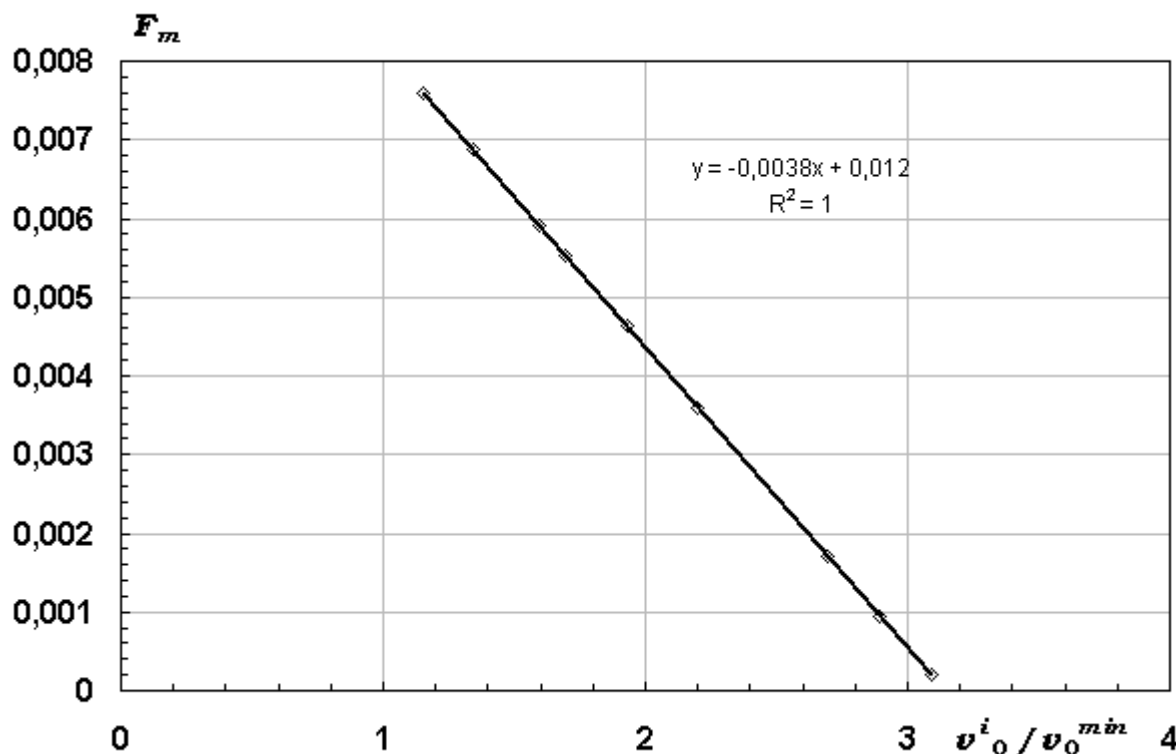


Рис. 7. Залежність $\frac{(v_0^i - v_0^{\min}) I_0}{v_0^{\min}}$ (на графіку позначено як F_m) від $\frac{v_0^i}{v_0^{\min}}$ у

випадку нелінійного інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ с}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\alpha = 3$, $\beta = 0,5$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$.

5.3. Площа під кривою титрування

Ще один спосіб визначення константи інгібуючої дії Q_I та коефіцієнта інгібування I_{50} базується на розрахунку площі під кривою титрування ензиму оборотним інгібітором θ .

Проінтегруємо від нуля до I_0 рівняння для початкової швидкості узагальненого механізму. В результаті отримаємо рівняння:

$$\theta = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0 \beta I_0}{\alpha K_s + [S]_0} + \frac{\alpha K_i k_2 [E]_0 [S]_0}{\alpha K_s + [S]_0} \left[1 - \frac{\beta (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0} \right] \ln \left[1 + \frac{I_0 (\alpha K_s + [S]_0)}{\alpha K_i (K_s + [S]_0)} \right] \quad (35)$$

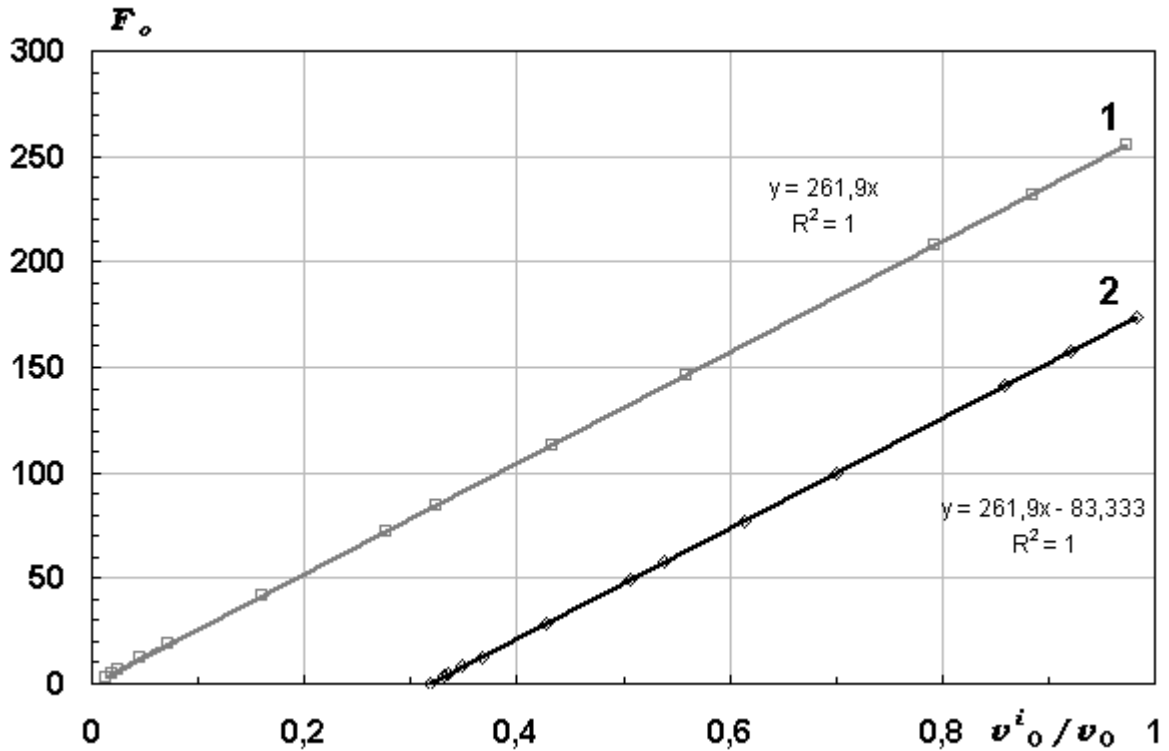


Рис. 8. Залежність $\frac{(v_0 - v_0^i)}{v_0 I_0}$ (на графіку позначено як F_o) від $\frac{v_0^i}{v_0}$ у випадку

лінійного (крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ mM}$, $K_i = 2 \text{ mM}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ mM}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування. Тангенс кута нахилу прямих дорівнює $\frac{1}{I_{50}}$, але крива 1 проходить через початок системи координат, а крива 2 відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює $-\frac{1}{Q_I}$.

З рівняння (35) видно, що площа під кривою залежить від всіх параметрів. Для аналізу й практичного використання рівняння, краще привести його до безрозмірного вигляду.

Враховуючи, що існує взаємозв'язок різних параметрів (наприклад, рівняння (31)) можна одержати різноманітні форми безрозмірного рівняння.

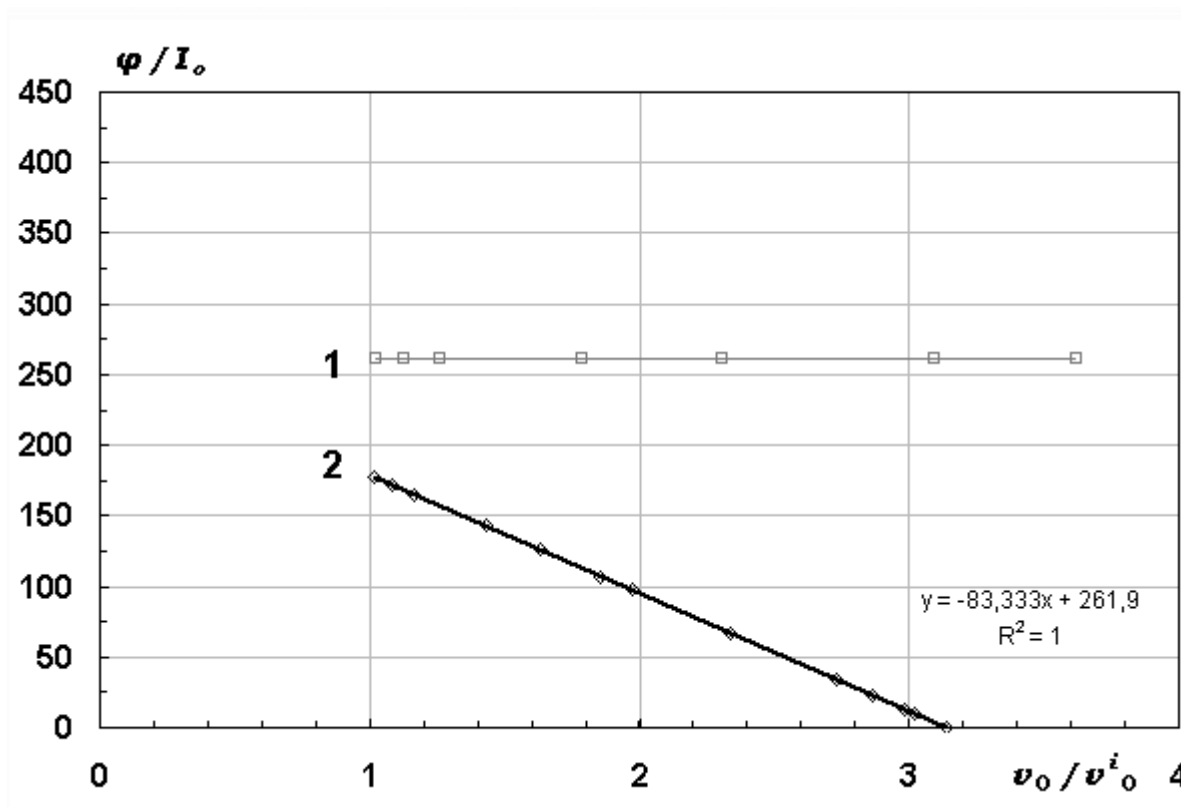


Рис. 9. Залежність $\frac{\varphi}{I_0}$ від $\frac{v_0}{v_0^i}$ у випадку лінійного (крива 1) та нелінійного (крива 2) інгібування. Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування.

Наприклад, можна виразити перший доданок через мінімальну початкову швидкість v_0^{\min} , а можна – через співвідношення $\frac{I_{50}v_0}{Q_I}$

$$\frac{k_2[E]_0[S]_0\beta I_0}{\alpha K_s + [S]_0} = I_0 v_0^{\min} = I_0 \frac{I_{50}}{Q_I} v_0 \quad (36)$$

Аналогічно можна виразити й інші співвідношення:

$$\frac{\alpha K_i k_2 [E]_0 [S]_0}{(\alpha K_s + [S]_0)} = I_{50} v_0 = Q_I v_0^{\min} \quad (37)$$

$$\frac{\beta(K_s + [S]_0)}{(\alpha K_s + [S]_0)} = \frac{I_{50}}{Q_I} = \frac{v_0^{\min}}{v_0} \quad (38)$$

$$\frac{I_0(\alpha K_s + [S]_0)}{\alpha K_i(K_s + [S]_0)} = \frac{I_0}{I_{50}} = \frac{I_0 v_0}{Q_I v_0^{\min}} \quad (39)$$

Таким чином, рівняння (35) може мати мінімум 8 різних виразів. З практичної точки зору перші два рівняння (36)–(37) краще записати або через v_0^{\min} , або через v_0 , а два останніх (38)–(39) – через I_{50} .

$$\theta = I_0 v_0^{\min} + Q_I v_0^{\min} \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I}\right) \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}}\right) \quad (40)$$

$$\theta = I_0 \frac{I_{50}}{Q_I} v_0 + I_{50} v_0 \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I}\right) \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}}\right) \quad (41)$$

Тоді у безрозмірному вигляді рівняння (40)–(41) можуть бути представлені наступним чином:

$$\frac{\theta}{I_0 v_0^{\min}} = 1 + \frac{Q_I}{I_0} \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I}\right) \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}}\right) = 1 + \frac{(Q_I - I_{50})}{I_0} \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}}\right) \quad (42)$$

$$\frac{\theta}{I_0 v_0} = \frac{I_{50}}{Q_I} + \frac{I_{50}}{I_0} \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I}\right) \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}}\right) \quad (43)$$

Безрозмірність досягається за рахунок того, що площа під кривою співвідноситься з площею прямокутника, сторонами якого є v_0^{\min} та I_0 (у випадку рівняння (42)), v_0 та I_0 (у випадку рівняння (43)).

З рівнянь (29) та (31) можна отримати співвідношення

$$\frac{I_0}{I_{50}} = \frac{v_0 - v_0^i}{v_0^i - v_0^{\min}} \quad (44)$$

яке дозволяє замінити співвідношення концентрацій інгібітора на співвідношення початкових швидкостей реакції, які можуть бути легко виміряні.

С врахуванням рівняння (44) можна переписати рівняння (43) у вигляді

$$\frac{\theta}{I_0 v_0} = \frac{I_{50}}{Q_I} + I_{50} \left(1 - \frac{I_{50}}{Q_I}\right) \frac{1}{I_0} \ln \left(\frac{v_0 - v_0^{\min}}{v_0^i - v_0^{\min}} \right) \quad (45)$$

і використовувати для одночасного розрахунку Q_I і I_{50} (крива 2, рис.10).

Для механізмів лінійного інгібування рівняння (43) і (45) матимуть вигляд (приймаючи до уваги рівняння (18)):

$$\frac{\theta}{I_0 v_0} = \frac{I_{50}}{I_0} \ln \left(1 + \frac{I_0}{I_{50}} \right) = \frac{I_{50}}{I_0} \ln(1 + \varphi) = \frac{I_{50}}{I_0} \ln \left(\frac{v_0}{v_0^i} \right) \quad (46)$$

Отримане рівняння дозволяє розраховувати коефіцієнт інгібування I_{50} у випадку дослідження механізмів лінійного інгібування (крива 1, рис.10).

Підставивши рівняння (18) в рівняння (46) можна отримати формулу, яка дозволяє розраховувати безрозмірну площу за початковими швидкостями для реакцій, що протікають за механізмами лінійного інгібування:

$$\frac{\theta}{I_0 v_0} = \frac{1}{\varphi} \ln(1 + \varphi) = \left(\frac{v_0^i}{v_0 - v_0^i} \right) \ln \left(\frac{v_0}{v_0^i} \right) \quad (47)$$

З врахуванням рівнянь (31) та (44) можна виразити рівняння (45) через початкові швидкості, що дозволяє розраховувати безрозмірну площу для реакцій, що протікають за механізмами нелінійного інгібування

$$\frac{\theta}{I_0 v_0} = \frac{v_0^{\min}}{v_0} + \left(1 - \frac{v_0^{\min}}{v_0} \right) \left(\frac{v_0^i - v_0^{\min}}{v_0 - v_0^i} \right) \ln \left(\frac{v_0 - v_0^{\min}}{v_0^i - v_0^{\min}} \right) = \frac{v_0^{\min}}{v_0} + \frac{(v_0 - v_0^{\min})(v_0^i - v_0^{\min})}{v_0(v_0 - v_0^i)} \ln \left(\frac{v_0 - v_0^{\min}}{v_0^i - v_0^{\min}} \right) \quad (48)$$

Можна показати також, що співвідношення між константою інгібування K_i та коефіцієнтом інгібування I_{50} визначається величиною коефіцієнта α . Для цього запишемо рівняння (4) у вигляді

$$v_0^i = \frac{k_2 E_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\frac{\alpha K_s (K_i + I_0)}{S_0} + (\alpha K_i + I_0)}, \quad (49)$$

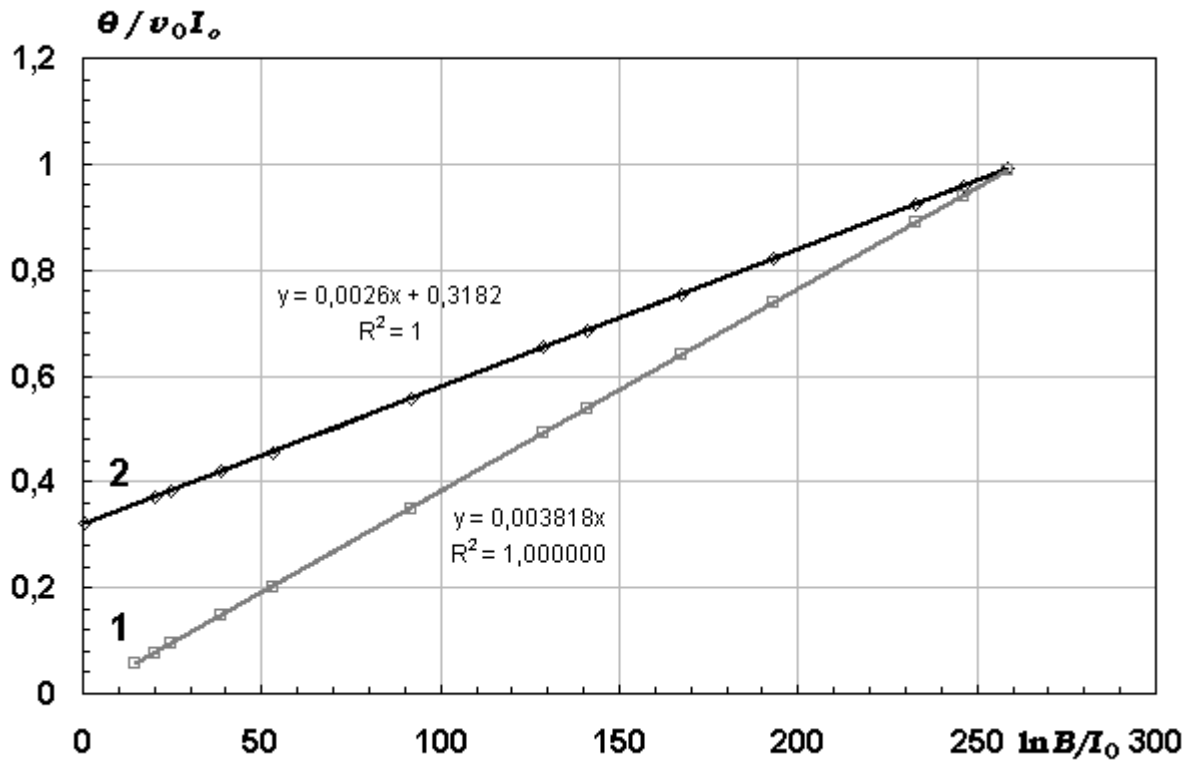


Рис. 10. Залежність $\frac{\theta}{v_0 I_0}$ від $\frac{\ln B}{I_0}$, де $B = \frac{v_0}{v_0^i}$ у випадку лінійного інгібування

(крива 1), та $B = \frac{v_0 - v_0^{\min}}{v_0^i - v_0^{\min}}$ у випадку нелінійного інгібування (крива 2). Параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ mM}$, $K_i = 2 \text{ mM}$, $\alpha = 3$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ mM}$, а також $\beta = 0$ у випадку лінійного, та $\beta = 0,5$ у випадку нелінійного інгібування. При лінійному інгібуванні пряма проходить через початок системи координат, а тангенс кута її нахилу дорівнює I_{50} .

а рівняння (2) у вигляді

$$S_0 = \frac{\alpha K_s (I_{50} - K_i)}{(\alpha K_i - I_{50})} \quad (50)$$

Підставимо замість S_0 в рівнянні (49) вираз (50) і в результаті отримаємо:

$$v_0^i = \frac{k_2 E_0 (\alpha K_i + \beta I_0)}{\frac{(K_i + I_0)(\alpha K_i - I_{50})}{(I_{50} - K_i)} + (\alpha K_i + I_0)} = \frac{k_2 E_0 (\alpha K_i + \beta I_0)(I_{50} - K_i)}{(I_{50} + I_0) K_i (\alpha - 1)} \quad (51)$$

Рівняння (51) показує, що існує взаємозв'язок між величиною α та співвідношенням величин коефіцієнта інгібування I_{50} та константи інгібування K_i : якщо $\alpha > 1$, то $I_{50} > K_i$, якщо $\alpha < 1$, то $I_{50} < K_i$, а якщо $\alpha = 1$, то $I_{50} = K_i$, як у випадку повного неконкурентного інгібування.

5.4. Способи оцінки впливу оборотних інгібіторів на ензиматичний процес

З представлених результатів видно, що константа інгібуючої дії Q_I , яка об'єднує константи α , β та K_i , і коефіцієнт інгібування I_{50} , який об'єднує константи α , K_i та K_s , є такими «інтегральними» параметрами, за допомогою яких можна отримувати рівняння в найбільш компактному вигляді. Наприклад, для механізмів лінійного інгібування можна записати рівняння початкової швидкості у вигляді:

$$v_0^i = v_0 \left[\frac{I_{50}}{I_{50} + I_0} \right] \quad (52)$$

а для механізмів нелінійного інгібування – у вигляді

$$v_0^i = v_0 \left[\frac{I_{50} (Q_i + I_0)}{Q_i (I_{50} + I_0)} \right] \quad (53)$$

Рівняння (52) та (53) показують, що вираз для початкової швидкості реакції в присутності інгібітора завжди складається з двох блоків: блоку, що не залежить від впливу інгібітора (представлений початковою швидкістю v_0), та блоку, що виражає дію інгібітора (представлений у квадратних дужках), який можна назвати інгібіторним фактором (I_F) і в той же час відносною швидкістю, тобто швидкістю інгібованої реакції відносно неінгібованої.

Відзначимо, що у випадку лінійного інгібування відносну початкову швидкість можна виразити за допомогою лише одного «інтегрального» параметру: коефіцієнта інгібування I_{50} . Щоб виразити відносну початкову швидкість у випадку нелінійного інгібування необхідний ще один «інтегральний» параметр – константа інгібуючої дії Q_I .

Також рівняння (52) та (53) можна записати в іншому вигляді:

$$\frac{1}{v_0^i} = \frac{I_{50} + I_0}{I_{50}v_0} = \frac{1}{v_0} + \frac{I_0}{I_{50}v_0} \quad (54)$$

$$\frac{1}{v_0^i} = \frac{Q_I I_{50} + I_0 Q_I}{v_0 [I_{50} Q_i + I_{50} I_0]} = \frac{1}{v_0} + \frac{I_0 (Q_I - I_{50})}{v_0 I_{50} (Q_i + I_0)} \quad (55)$$

Другі доданки показують внесок інгібітора у початкову швидкість, бо вони відображають зміну початкової швидкості реакції, викликану виключно дією інгібітора (при будь-яких початкових концентраціях реагуючих речовин), і ця інгібіторна складова (I_C) може розглядатись як міра інгібуючого ефекту, що показує, наскільки початкова швидкість неінгібованої реакції зміниться при певному механізмі дії інгібітора.

Якщо доданки $\frac{1}{v_0}$ перенести в ліву частину рівнянь (54) і (55), то вони перетворяться на рівняння (18) і (17) відповідно. До такого ж вигляду можна привести й рівняння (52) та (53). Таким чином, індекс гальмування пов'язаний з інгібіторною складовою простим рівнянням:

$$\varphi = I_C v_0 \quad (56)$$

Очевидно, що рівняння (52) і (53), а також (54) і (55) можна виразити через індекс гальмування, в якому будуть зібрані всі початкові швидкості. В такому разі ці рівняння можна подати в наступному вигляді:

$$\frac{I_0}{\varphi} = I_{50} \quad (57)$$

$$\frac{I_0}{\varphi} = I_{50} \left(\frac{Q_i + I_0}{Q_I - I_{50}} \right) \quad (58)$$

Як видно, співвідношення концентрації інгібітора до індексу гальмування дає можливість описати кінетику оборотного інгібування у найбільш компактному вигляді (за допомогою константи інгібуючої дії Q_I та коефіцієнту інгібування I_{50}). Вираз у дужках з правого боку рівняння (58) можна назвати компонентою нелінійного інгібування (I_{NLC}), оскільки завдяки її наявності у рівнянні (58) для нелінійного інгібування, воно відрізняється від рівняння (57) для лінійного

інгібування. Порівнюючи ці рівняння можна побачити, що у випадку лінійного інгібування компонента нелінійного інгібування дорівнює одиниці (внаслідок того, що $\beta = 0$).

Як видно з рівняння (57) при дослідженні реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмами лінійного інгібування, коефіцієнт інгібування I_{50} можна розрахувати, провівши лише два експерименти: вимірявши початкову швидкість реакції без інгібітора, та початкову швидкість реакції у присутності інгібітора при однаковій концентрації субстрату в обох експериментах.

Можна показати, як буде змінюватись величина коефіцієнта інгібування I_{50} в залежності від концентрації субстрату, при якій він був виміряний. Для механізмів лінійного інгібування запишемо рівняння (57) у вигляді:

$$\frac{\varphi}{I_0} = \frac{(\alpha K_s + S_0)}{\alpha K_i (K_s + S_0)} = \frac{1}{I_{50}} \quad (59)$$

З цього рівняння випливає, що чим більше значення $\frac{\varphi}{I_0}$, тим менша величина коефіцієнта інгібування I_{50} , і тим активніше відбувається інгібування ензиматичної реакції. Нехай для досліджуваної реакції один коефіцієнт інгібування $I_{50}^{(1)}$ був визначений при концентрації субстрату $S_0^{(1)}$, а інший коефіцієнт інгібування $I_{50}^{(2)}$ був визначений при концентрації субстрату $S_0^{(2)}$. Тоді співвідношення коефіцієнтів інгібування може бути виражене наступним чином:

$$\frac{I_{50}^{(2)}}{I_{50}^{(1)}} = \frac{(\alpha K_s + S_0^{(1)})(K_s + S_0^{(2)})}{(\alpha K_s + S_0^{(2)})(K_s + S_0^{(1)})} = \frac{(\alpha K_s K_s + S_0^{(1)} S_0^{(2)}) + (\alpha K_s S_0^{(2)} + K_s S_0^{(1)})}{(\alpha K_s K_s + S_0^{(1)} S_0^{(2)}) + (\alpha K_s S_0^{(1)} + K_s S_0^{(2)})} \quad (60)$$

До чисельника додамо й віднімемо $(\alpha K_s S_0^{(1)} + K_s S_0^{(2)})$:

$$\frac{I_{50}^{(2)}}{I_{50}^{(1)}} = 1 + \frac{\alpha K_s (S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) + K_s (S_0^{(1)} - S_0^{(2)})}{(\alpha K_s K_s + S_0^{(1)} S_0^{(2)}) + (\alpha K_s S_0^{(1)} + K_s S_0^{(2)})} \quad (61)$$

і після математичних перетворень отримаємо рівняння:

$$\frac{I_{50}^{(2)}}{I_{50}^{(1)}} - 1 = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)})K_s(\alpha - 1)}{(K_s + S_0^{(1)})(\alpha K_s + S_0^{(2)})} \quad (62)$$

Аналогічним чином проведемо аналіз для механізмів нелінійного інгібування. Запишемо рівняння (58) у вигляді:

$$\frac{\varphi}{I_0} = \frac{(\alpha K_s + S_0) - \beta(K_s + S_0)}{\alpha K_i(K_s + S_0) + \beta I_0(K_s + S_0)} = \frac{(Q_i - I_{50})}{I_{50}(Q_i + I_0)} \quad (63)$$

Нехай для досліджуваної реакції один коефіцієнт інгібування $I_{50}^{(1)}$ був визначений при концентрації субстрату $S_0^{(1)}$, а інший коефіцієнт інгібування $I_{50}^{(2)}$ був визначений при концентрації субстрату $S_0^{(2)}$. В обох випадках розрахуємо співвідношення $\frac{\varphi}{I_0}$ при однаковій концентрації інгібітора (у випадку лінійного інгібування ця вимога не була обов'язковою, оскільки співвідношення $\frac{\varphi}{I_0}$ не залежало від концентрації інгібітора). Тоді можна записати:

$$\frac{\varphi_1 I_0}{\varphi_2 I_0} = \frac{(K_s + S_0^{(2)})[(\alpha K_s + S_0^{(1)}) - \beta(K_s + S_0^{(1)})]}{(K_s + S_0^{(1)})[(\alpha K_s + S_0^{(2)}) - \beta(K_s + S_0^{(2)})]} \quad (64)$$

Після математичних перетворень отримаємо:

$$\frac{\varphi_1 I_0}{\varphi_2 I_0} = 1 + \frac{(K_s + S_0^{(2)})[(\alpha K_s + S_0^{(1)}) - \beta(K_s + S_0^{(1)})] - (K_s + S_0^{(1)})[(\alpha K_s + S_0^{(2)}) - \beta(K_s + S_0^{(2)})]}{(K_s + S_0^{(1)})[(\alpha K_s + S_0^{(2)}) - \beta(K_s + S_0^{(2)})]} \quad (65)$$

і після спрощень маємо рівняння:

$$\frac{\varphi_1 I_0}{\varphi_2 I_0} - 1 = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)})K_s(\alpha - 1)}{(K_s + S_0^{(1)})[(\alpha K_s + S_0^{(2)}) - \beta(K_s + S_0^{(2)})]} \quad (66)$$

З іншого боку існує також рівність

$$\frac{\varphi_1 I_0}{\varphi_2 I_0} = \frac{I_{50}^{(2)}(Q_i - I_{50}^{(1)})}{I_{50}^{(1)}(Q_i - I_{50}^{(2)})} = 1 + \frac{Q_i(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)})}{I_{50}^{(1)}(Q_i - I_{50}^{(2)})} \quad (67)$$

В такому разі можна прирівняти праві частини рівнянь (66) та (67)

$$\frac{Q_I (I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)})}{I_{50}^{(1)} (Q_I - I_{50}^{(2)})} = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) K_s (\alpha - 1)}{(K_s + S_0^{(1)}) [(\alpha K_s + S_0^{(2)}) - \beta (K_s + S_0^{(2)})]} \quad (68)$$

В знаменнику виразу, що знаходиться з правого боку рівняння, можна виділити множник $(Q_I - I_{50}^{(2)})$

$$\frac{Q_I (I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)})}{I_{50}^{(1)} (Q_I - I_{50}^{(2)})} = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) K_s (\alpha - 1) I_{50}^{(2)}}{(K_s + S_0^{(1)}) (K_s + S_0^{(2)}) \beta \left(\frac{\alpha K_i - I_{50}^{(2)}}{\beta} \right)} = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) K_s (\alpha - 1) I_{50}^{(2)}}{(K_s + S_0^{(1)}) (K_s + S_0^{(2)}) \beta (Q_I - I_{50}^{(2)})} \quad (69)$$

і після підстановки $I_{50}^{(2)}$ (у відповідності до рівняння (2)) в кінцевому результаті отримаємо:

$$\frac{I_{50}^{(2)}}{I_{50}^{(1)}} - 1 = \frac{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) K_s (\alpha - 1)}{(K_s + S_0^{(1)}) (\alpha K_s + S_0^{(2)})} \quad (70)$$

Одержане рівняння ідентичне рівнянню, виведеному для механізмів лінійного інгібування. Тому, як для лінійного, так і для нелінійного інгібування виконуються наступні співвідношення:

– якщо $\alpha = 1$, то $I_{50}^{(2)} = I_{50}^{(1)} = K_i$ при будь-яких концентраціях субстрату (тобто I_{50} не залежить від концентрації субстрату);

– якщо $\alpha > 1$, то у випадку $(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) > 0$ маємо: $(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)}) > 0$, а якщо $(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) < 0$, то $(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)}) < 0$.

– якщо $\alpha < 1$, то у випадку $(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) < 0$ маємо $(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)}) > 0$, а якщо $(S_0^{(2)} - S_0^{(1)}) > 0$, то маємо $(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)}) < 0$.

Як можна бачити, величина співвідношення $\frac{(I_{50}^{(2)} - I_{50}^{(1)})}{(S_0^{(2)} - S_0^{(1)})}$ дозволяє оцінити

величину константи α відносно одиниці: якщо воно додатне, то $\alpha > 1$, а якщо від'ємне – $\alpha < 1$.

Таким чином, видно, що в якості міри впливу інгібітора на ензиматичний процес можна використовувати такі параметри, як інгібіторний фактор та інгібіторна складова. В свою чергу ці параметри можуть бути виражені через два

«інтегральні» параметри – через константу інгібуючої дії Q_I та коефіцієнт інгібування I_{50} , які також можуть використовуватись для оцінки впливу інгібіторів на ензиматичний процес. Разом з тим можна робити висновок про вплив інгібітора на протікання ензиматичної реакції на основі аналізу величин індивідуальних кінетичних та термодинамічних констант K_i , α , β , K_s та k_2 .

Кожен з перерахованих способів оцінки впливу інгібіторів на ензиматичний процес має свої переваги й свої недоліки, але, на нашу думку, оптимальним варіантом є використання з цією метою коефіцієнта інгібування I_{50} та константи інгібуючої дії Q_I . Константа інгібуючої дії Q_I є співвідношенням лише трьох індивідуальних констант, які визначають вплив інгібітора на ензиматичний процес, і як показують результати проведеного дослідження, її можна визначити, використовуючи різні методи, викладені в даній роботі, однак, як видно, приведені рівняння не дають змоги визначити окремі константи.

5.5. Визначення індивідуальних кінетичних констант

Проте головною метою кінетичних досліджень є все ж таки визначення індивідуальних констант K_i , K_s , α , β та k_2 .

Для визначення індивідуальних констант дуже важливим рівнянням є рівняння мінімальної початкової швидкості:

$$v_0^{\min} = \frac{k_2 E_0 S_0 \beta}{\alpha K_s + S_0} = \frac{V_m S_0 \beta}{\alpha K_s + S_0} \quad (71)$$

Воно може бути лінеаризоване

$$\frac{V_m}{v_0^{\min}} = \frac{\alpha K_s}{\beta} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{\beta} \quad (72)$$

і це дає змогу розрахувати константи β та αK_s . Зазначимо, що V_m може бути розраховане при дослідженні реакції без участі інгібітора, так же як k_2 та K_s . Якщо значення K_s відоме, можна розрахувати константу α , а знаючи β та Q_I , можна визначити й величину константи інгібування K_i . Таким чином можуть бути знайдені значення всіх констант.

Можна також звернути увагу на рівняння (31), яке можна записати у наступному вигляді:

$$\frac{v_0}{v_0^{\min}} = \frac{Q_I}{I_{50}} = \frac{(\alpha K_s + S_0)}{\beta(K_s + S_0)} \quad (73)$$

Це рівняння можна представити у вигляді, що дозволяє використати для розрахунку коефіцієнтів рівняння множинну лінійну регресію на основі методу найменших квадратів:

$$S_0 v_0^{\min} = (\beta K_s) v_0 + (\beta) S_0 v_0 - (\alpha K_s) v_0^{\min} \quad (74)$$

Цей тип регресії застосовується для аналізу залежності величини y , що змінюється (в даному випадку в якості y виступає $S_0 v_0^{\min}$), від кількох незалежних змінних x (тобто, від v_0 , $S_0 v_0$ і v_0^{\min}). За допомогою методу множинної лінійної регресії можна розрахувати (наприклад у середовищі Microsoft Excel) коефіцієнти цього рівняння (коефіцієнти рівняння показані у дужках). Рівняння (73) можна також представити у вигляді

$$\frac{S_0}{v_0} = (\beta K_s) \frac{1}{v_0^{\min}} + (\beta) \frac{S_0}{v_0^{\min}} - (\alpha K_s) \frac{1}{v_0} \quad (75)$$

або

$$S_0 = (\beta K_s) \frac{v_0}{v_0^{\min}} + (\beta) \frac{S_0 v_0}{v_0^{\min}} - (\alpha K_s) \quad (76)$$

і за допомогою методу множинної лінійної регресії розрахувати ті самі коефіцієнти.

Для розрахунку коефіцієнтів з використанням рівнянь (74)–(76) необхідно мати експериментально виміряні значення початкових швидкостей v_0 і v_0^{\min} при різних початкових концентраціях субстрату S_0 (потрібно мати дані не менше ніж для чотирьох різних концентрацій субстрату).

Розрахувавши коефіцієнти β , βK_s та αK_s , можна визначити значення індивідуальних констант α , β і K_s , а, знаючи Q_I , знайти й величину константи інгібування K_i . Таким чином можна визначити всі індивідуальні константи для реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмами нелінійного інгібування.

Відзначимо, що у випадку, коли $\alpha = 1$, метод множинної лінійної регресії не дозволяє розраховувати коефіцієнти рівнянь (74)–(76), оскільки при цьому $I_{50} = K_i$ і не залежить від S_0 . В результаті співвідношення початкових швидкостей залишається незмінним і рівним $\frac{1}{\beta}$:

$$\frac{v_0}{v_0^{\min}} = \frac{Q_I}{I_{50}} = \frac{1}{\beta} \quad (77)$$

Тому, перед розрахунком коефіцієнтів за рівняннями (74) та (75) необхідно розрахувати співвідношення $\frac{v_0}{v_0^{\min}}$ і впевнитись в тому, що це співвідношення не є константою (якщо для визначення коефіцієнтів використовувати рівняння (76), то можна відразу перевірити, чи однакові значення мають дані у колонці $\frac{v_0}{v_0^{\min}}$), або побудувати графік у координатах $\frac{v_0}{v_0^{\min}} - S_0$ і впевнитись, що цей графік не є лінійним (крива 2, рис. 11). Якщо ж $\alpha = 1$, графік є прямою лінією (крива 1, рис. 11), паралельною осі абсцис, і відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює $\frac{1}{\beta}$ (рівняння (77)). В такому випадку відразу визначаються константи α та β , а знаючи величину Q_I , можна розрахувати й величину константи інгібування K_i .

Так визначаються індивідуальні константи у випадку дослідження механізмів нелінійного інгібування. Для механізмів лінійного інгібування описаний метод визначення констант не може використовуватись, тому що при $\beta = 0$ мінімальна початкова швидкість v_0^{\min} також дорівнює нулю. В такому випадку для визначення індивідуальних констант можна використати рівняння (2), оскільки I_{50} може бути легко визначене експериментально, або розраховане як $\frac{I_0}{\varphi}$ (рівняння (57)).

Рівняння (2) може бути записане у вигляді, що дозволяє використати для розрахунку коефіцієнтів рівняння множинну лінійну регресію

$$I_{50}S_0 = (\alpha K_i K_s) + (\alpha K_i)S_0 - (\alpha K_s)I_{50} \quad (78)$$

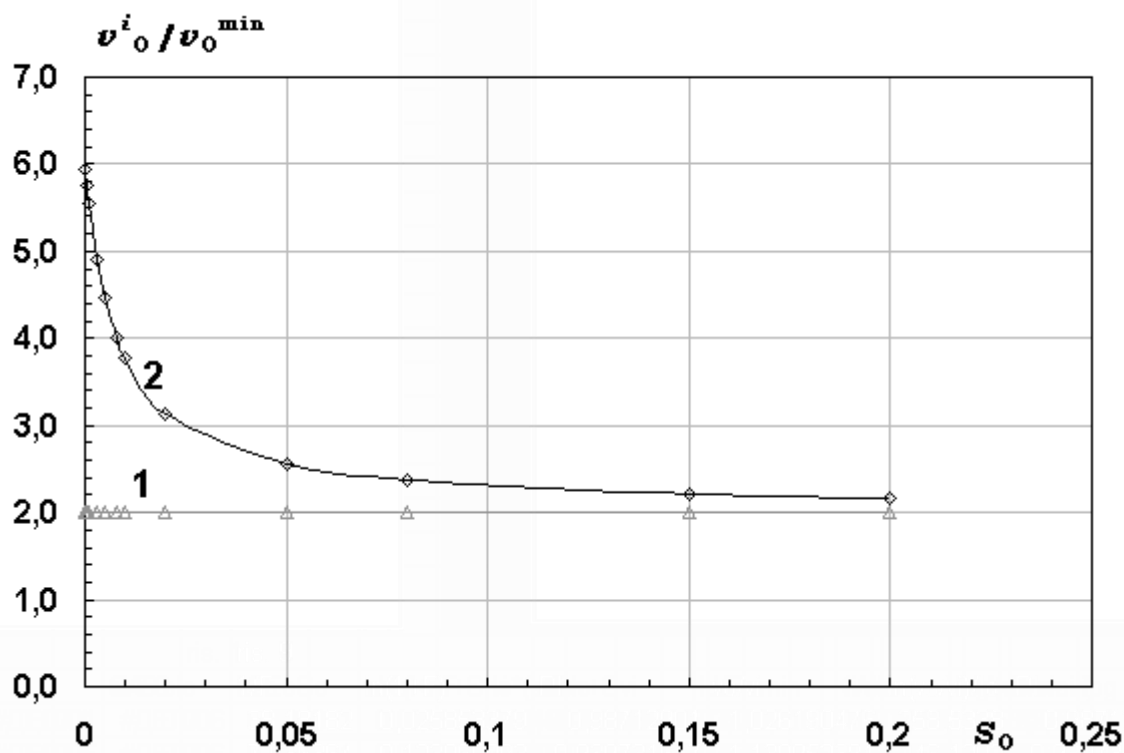


Рис. 11. Залежність $\frac{v_0^i}{v_0^{\min}}$ від S_0 , для випадку, коли $\alpha = 1$ (крива 1), та для випадку, коли $\alpha = 3$ (крива 2). Інші параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ с}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\beta = 0,5$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $I_0 = 20 \text{ мМ}$. Якщо $\alpha = 1$, графік є прямою, паралельною осі абсцис, якщо $\alpha = 3$ – графік нелінійний.

або

$$\frac{I_0 S_0}{\varphi} = (\alpha K_i K_s) + (\alpha K_i) S_0 - (\alpha K_s) \frac{I_0}{\varphi} \quad (79)$$

Тут знову є два виключення, коли розрахунок коефіцієнтів за рівняннями (78) та (79) неможливий: коли $\alpha = 1$, та якщо досліджувана реакція відбувається за механізмом повного конкурентного інгібування. Тому попередньо рекомендуємо побудувати графік у координатах $I_{50} - S_0$ або $\frac{I_0}{\varphi} - S_0$. Якщо графік в даних координатах є нелінійним (криві 2, 3, рис. 12), то можна користуватись рівняннями (78) та (79) для розрахунку коефіцієнтів, що представлені у круглих дужках. Знаючи ці коефіцієнти, можна розрахувати індивідуальні константи α , K_i та K_s .

У випадку, коли $\alpha = 1$, коефіцієнт інгібування I_{50} за величиною дорівнює K_i , а тому не залежить від S_0 . Це можна легко помітити по даним, що знаходяться у колонці I_{50} . При цьому графік у координатах $I_{50} - S_0$ є прямою лінією, паралельною осі абсцис (крива 1, рис. 12) і відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює K_i (рівняння (2)). В такому випадку відразу визначаються константи α та K_i .

У випадку, коли досліджувана реакція відбувається за механізмом повного конкурентного інгібування, графік у координатах $I_{50} - S_0$ є прямою лінією, що відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює K_i , а тангенс кута нахилу прямої дорівнює співвідношенню інгібіторної та субстратної констант (крива 4, рис. 12). В даному випадку визначаються константи K_i та K_s .

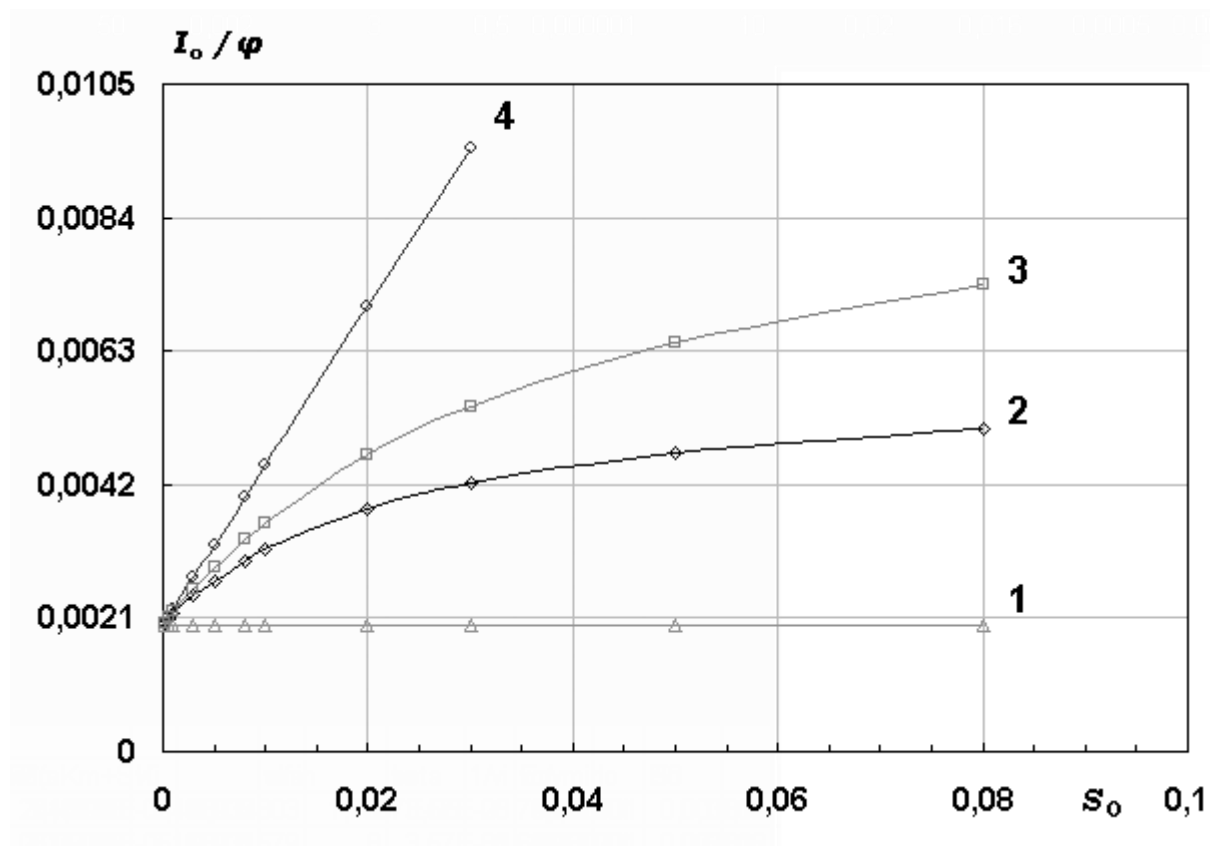


Рис. 12. Залежність $\frac{I_0}{\varphi}$ від S_0 , для різних механізмів лінійного інгібування:

1 – повністю неконкурентний ($\alpha = 1$); 2 – конкурентно-неконкурентний ($\alpha = 3$); 3 – повністю безконкурентний ($\alpha = 5$), 4 – повністю конкурентний ($\alpha = \infty$). Інші параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ c}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $\beta = 0$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $I_0 = 20 \text{ мМ}$.

Рівняння (5) також може бути використане для розрахунку індивідуальних констант методом множинної лінійної регресії. Для цього запишемо його у вигляді:

$$\alpha K_i (K_s + S_0) v_0 + \beta I_0 (K_s + S_0) v_0 = \alpha K_i (K_s + S_0) v_0^i + I_0 (\alpha K_s + S_0) v_0^i \quad (80)$$

Після перегрупування членів отримаємо таке рівняння:

$$\alpha K_i K_s (v_0 - v_0^i) + \alpha K_i S_0 (v_0 - v_0^i) + \beta K_s I_0 v_0 - \alpha K_s v_0^i I_0 + \beta S_0 I_0 v_0 - S_0 v_0^i I_0 = 0 \quad (81)$$

Нарешті, після того, як всі члени рівняння поділимо на початкову швидкість інгібованої реакції, рівняння матимемо наступний вигляд:

$$\alpha K_i K_s \varphi + \alpha K_i S_0 \varphi + \beta K_s I_0 \frac{v_0}{v_0^i} - \alpha K_s I_0 + \beta S_0 I_0 \frac{v_0}{v_0^i} - S_0 I_0 = 0 \quad (82)$$

Тепер перепишемо його у вигляді, що дозволить використати метод множинної лінійної регресії для визначення коефіцієнтів рівняння, що приведені у дужках:

$$\frac{\varphi}{I_0} = \left(\frac{1}{\alpha K_i K_s} \right) S_0 - \left(\frac{1}{K_s} \right) \frac{\varphi}{I_0} S_0 - \left(\frac{\beta}{\alpha K_i} \right) \frac{v_0}{v_0^i} - \left(\frac{\beta}{\alpha K_i K_s} \right) \frac{v_0}{v_0^i} S_0 + \left(\frac{1}{K_i} \right) \quad (83)$$

Для розрахунку коефіцієнтів рівняння (83) необхідно мати експериментально виміряні значення початкових швидкостей v_0 і v_0^i при різних співвідношеннях початкових концентрацій субстрату S_0 й інгібітора I_0 . Наприклад, при концентрації субстрату 1 мМ виміряти початкову швидкість v_0 , а потім додати 1 мМ інгібітора і виміряти початкову швидкість v_0^i . Потім провести аналогічні вимірювання початкових швидкостей при концентрації субстрату й інгібітора, наприклад, 3 мМ і 5 мМ, 7 мМ і 2 мМ відповідно.

Концентрації субстрату й інгібітора мають змінюватись незалежно один від одного (не змінюватись пропорційно). Для того, щоб застосувати метод множинної лінійної регресії для визначення коефіцієнтів рівняння, експериментально мають бути виміряні початкові швидкості v_0 і v_0^i при не менше ніж шести концентраціях субстрату й інгібітора (рис. 13).

З цих даних формуємо 5 колонок, в останній з яких (в крайній з правого боку) представлені розраховані значення y (в даному випадку – це $\frac{\varphi}{I_0}$).

U15 = (=ЛИНЕЙН(U2:U12;Q2:T12;1;1))																
	A	B	C	D	E	F	G	H	M	N	P	Q	R	S	T	U
1	K_s	k_2	K_i	α	β	E_0	S_0	I_0	v'_0	v_0		v_0 / v'_0	$S_0 v_0 / v'_0$	$S_0 \varphi / I_0$	S_0	φ / I_0
2	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,0001	0,02	5,76E-07	9,80E-07		1,703081	0,00017	0,00352	0,0001	35,1541
3	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,0005	0,002	4,22E-06	4,55E-06		1,076006	0,000538	0,019	0,0005	38,003
4	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,001	0,05	3,66E-06	8,33E-06		2,27451	0,002275	0,02549	0,001	25,4902
5	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,003	0,01	1,48E-05	1,88E-05		1,269231	0,003808	0,08077	0,003	26,9231
6	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,005	0,005	2,23E-05	2,50E-05		1,12	0,0056	0,12	0,005	24
7	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,008	0,3	1,09E-05	3,08E-05		2,813187	0,022505	0,04835	0,008	6,04396
8	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,01	0,1	1,62E-05	3,33E-05		2,060606	0,020606	0,10606	0,01	10,6061
9	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,02	0,2	1,88E-05	4,00E-05		2,125	0,0425	0,1125	0,02	5,625
10	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,03	0,08	2,63E-05	4,29E-05		1,628571	0,048857	0,23571	0,03	7,85714
11	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,05	0,06	3,13E-05	4,55E-05		1,454545	0,072727	0,37879	0,05	7,57576
12	0,005	50	0,02	3	0,5	1E-06	0,08	0,09	3,08E-05	4,71E-05		1,529412	0,122353	0,47059	0,08	5,88235
13												3333,333	-200	-1666,67	-8,333	50
14												3,06E-11	1,8E-12	1,7E-11	2E-13	2,7E-13
15												1	1,63E-13	#Н/Д	#Н/Д	#Н/Д
16																
18												$1 / \alpha K_i K_s$	$1 / K_s$	$1 / Q_i K_s$	$1 / Q_i$	$1 / K_i$
19												3333,333	200	1666,67	8,3333	50
20																

Рис. 13. Застосування методу множинної лінійної регресії для визначення коефіцієнтів рівняння (83) у середовищі Microsoft Excel.

Результат розрахунків коефіцієнтів рівняння обведений рамкою, де в першому рядку вказані розраховані значення коефіцієнтів. Для порівняння в нижньому правому куті (рис. 13) показані значення коефіцієнтів, розрахованих з індивідуальних констант (тобто їх істинні значення). Видно, що методом множинної лінійної регресії розраховані всі коефіцієнти й точність їх розрахунку досить висока.

У випадку неповністю безконкурентних механізмів, представлених під номерами 8 та 9 у табл. 1 (для яких $K_i = \infty$), коефіцієнт $\frac{1}{K_i}$ (знаходиться в останній колонці) не розраховується. Для механізмів неповністю неконкурентних (для яких $\alpha = 1$) рівняння (83) перетворюється на рівняння (34), тому правильно розраховуються лише коефіцієнти $\frac{1}{K_i}$ та $\frac{1}{Q_i}$, що знаходяться в двох останніх колонках.

У випадку механізмів лінійного інгібування, для яких $\beta = 0$, коефіцієнти $\frac{\beta}{\alpha K_i}$ та $\frac{\beta}{\alpha K_i K_s}$ не розраховуються. В таких випадках досить лише трьох колонок:

$$\frac{\varphi}{I_0} S_0, S_0 \text{ та } \frac{\varphi}{I_0} :$$

$$\frac{\varphi}{I_0} = \left(\frac{1}{\alpha K_i K_s} \right) S_0 - \left(\frac{1}{K_s} \right) \frac{\varphi}{I_0} S_0 + \left(\frac{1}{K_i} \right) \quad (84)$$

У випадку лінійного інгібування для повністю безконкурентного механізму (для якого $K_i = \infty$) коефіцієнт $\frac{1}{K_i}$ не розраховується.

Для повністю неконкурентного механізму (для якого $\alpha = 1$) рівняння (83) перетворюється на рівняння (57), тому правильно розраховується лише коефіцієнт $\frac{1}{K_i}$.

Для повністю конкурентного механізму (для якого $\alpha = \infty$, а β – не визначено) розраховуються лише коефіцієнти $\frac{1}{K_i}$ та $\frac{1}{K_s}$.

Розрахувавши коефіцієнти рівнянь (83) та (84) можна визначити значення індивідуальних констант α , β , K_i та K_s .

Кращі результати при використанні методу множинної лінійної регресії показує рівняння (49). Записане у вигляді

$$v_0^i = (k_2 E_0) + \left(\frac{\beta k_2 E_0}{\alpha K_i} \right) I_0 - (K_s) \frac{v_0^i}{S_0} - \left(\frac{K_s}{K_i} \right) \frac{v_0^i}{S_0} I_0 - \left(\frac{1}{\alpha K_i} \right) I_0 v_0^i \quad (85)$$

воно не змінює своєї структури при $\alpha = 1$, а тому в таких умовах розраховуються всі коефіцієнти рівняння. При дослідженні механізмів нелінійного інгібування лише у випадку неповністю безконкурентних механізмів, представлених під номерами 8 та 9 у табл. 1 (для яких $K_i = \infty$), коефіцієнт $\frac{K_s}{K_i}$ не розраховується.

Для механізмів лінійного інгібування, для яких $\beta = 0$, коефіцієнт $\frac{\beta k_2 E_0}{\alpha K_i}$ не розраховується, тому що рівняння (85) перетворюється на рівняння

$$v_0^i = (k_2 E_0) - (K_s) \frac{v_0^i}{S_0} - \left(\frac{K_s}{K_i} \right) \frac{v_0^i}{S_0} I_0 - \left(\frac{1}{\alpha K_i} \right) I_0 v_0^i \quad (86)$$

За ним не можна розрахувати коефіцієнт $\frac{1}{\alpha K_i}$ для механізму повного конкурентного інгібування (для якого $\alpha = \infty$), та коефіцієнт $\frac{K_s}{K_i}$ для повністю безконкурентного механізму (для якого $K_i = \infty$).

В літературі вважається, що визначення індивідуальних констант можливо лише при використанні вторинних графіків, тобто завдяки побудові графіків за даними, що були визначені в інших графіках [12]. Проте запропоновані методи досить складні, а побудова вторинних графіків до того ж значно зменшує точність визначення констант.

Наведені методи визначення індивідуальних констант за рівняннями (72), (74)–(76), (78)–(79) та (83)–(86) не потребують побудови вторинних графіків, а використовують для розрахунку констант первинні дані – початкові швидкості інгібованих та неінгібованих реакцій, що досить точно вимірюються.

Таким чином, можна запропонувати наступний алгоритм для визначення індивідуальних констант.

1. Побудувати графіки у відповідності до рівнянь 10 (або (58)), 25, 33, 34, 45, щоб визначити до якої групи механізмів (лінійного чи нелінійного інгібування) відноситься механізм досліджуваної реакції, а також визначити величини коефіцієнта інгібування I_{50} та константи інгібувальної дії Q_I . Для визначення цих параметрів у випадку нелінійного інгібування можна також застосувати рівняння (30). Рівняння (51) також можна використовувати для визначення I_{50} та Q_I методом множинної лінійної регресії:

$$v_0^i I_0 = \left[\frac{\alpha K_i (I_{50} - K_i) k_2 E_0}{K_i (\alpha - 1)} \right] + \left[\frac{\beta (I_{50} - K_i) k_2 E_0}{K_i (\alpha - 1)} \right] I_0 - [I_{50}] v_0^i \quad (87)$$

Відношення першого коефіцієнта до другого дорівнює Q_I , а третій дає значення I_{50} .

Рівняння (51) можна також записати у вигляді

$$1 = \left[\frac{(\alpha - 1) I_{50}}{\alpha (I_{50} - K_i) k_2 E_0} \right] v_0^i + \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha (I_{50} - K_i) k_2 E_0} \right] v_0^i I_0 - \left[\frac{\beta}{\alpha K_i} \right] I_0 \quad (88)$$

В даному разі співвідношення першого й другого коефіцієнтів дає значення I_{50} , а третій – $\frac{1}{Q_I}$.

Побудувавши графік у координатах $v_0^i I_0 - v_0^i$ можна розрізнити лінійне й нелінійне інгібування. У випадку лінійного інгібування графік буде прямою лінією з тангенсом кута нахилу рівним за величиною I_{50} (крива 2, рис. 14)

$$v_0^i I_0 = \frac{\alpha k_2 E_0 (I_{50} - K_i)}{(\alpha - 1)} - v_0^i I_{50} \quad (89)$$

причому навіть для механізмів, в яких $\alpha = 1$, а $I_{50} = K_i$ (крива 1, рис. 14).

Якщо ж залежність $v_0^i I_0$ від v_0^i є нелінійною (крива 3, рис. 14), то досліджувана реакція протікає за одним з механізмів нелінійного інгібування і в такому випадку можна використовувати рівняння (87) або (88) для визначення I_{50} та Q_I методом множинної лінійної регресії.

2. Для визначення індивідуальних констант у випадку нелінійного інгібування можна використати рівняння (72), (83) та (85). Інший спосіб – побудувати графік у координатах $\frac{v_0}{v_0^{\min}} - S_0$ і впевнитись, що графік не є лінійним, після чого застосувати рівняння (74)–(76). Якщо ж графік лінійний, то $\alpha = 1$, а відрізок, що відсікається на осі ординат дорівнює $\frac{1}{\beta}$.

3. Для визначення індивідуальних констант у випадку лінійного інгібування можна використати рівняння (84) та (86). Інший спосіб – побудувати графік у координатах $I_{50} - S_0$ або $\frac{I_0}{\varphi} - S_0$. Якщо графік в даних координатах є нелінійним, то можна користуватись рівняннями (78) та (79). Якщо графік у координатах $I_{50} - S_0$ є прямою лінією, паралельною осі абсцис, то $\alpha = 1$, а пряма відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює K_i . У випадку, коли графік у координатах $I_{50} - S_0$ є прямою лінією, що не є паралельною до осі абсцис, то вона відсікає на осі ординат відрізок, величина якого дорівнює K_i , а тангенс кута нахилу прямої дорівнює співвідношенню констант K_i та K_s .

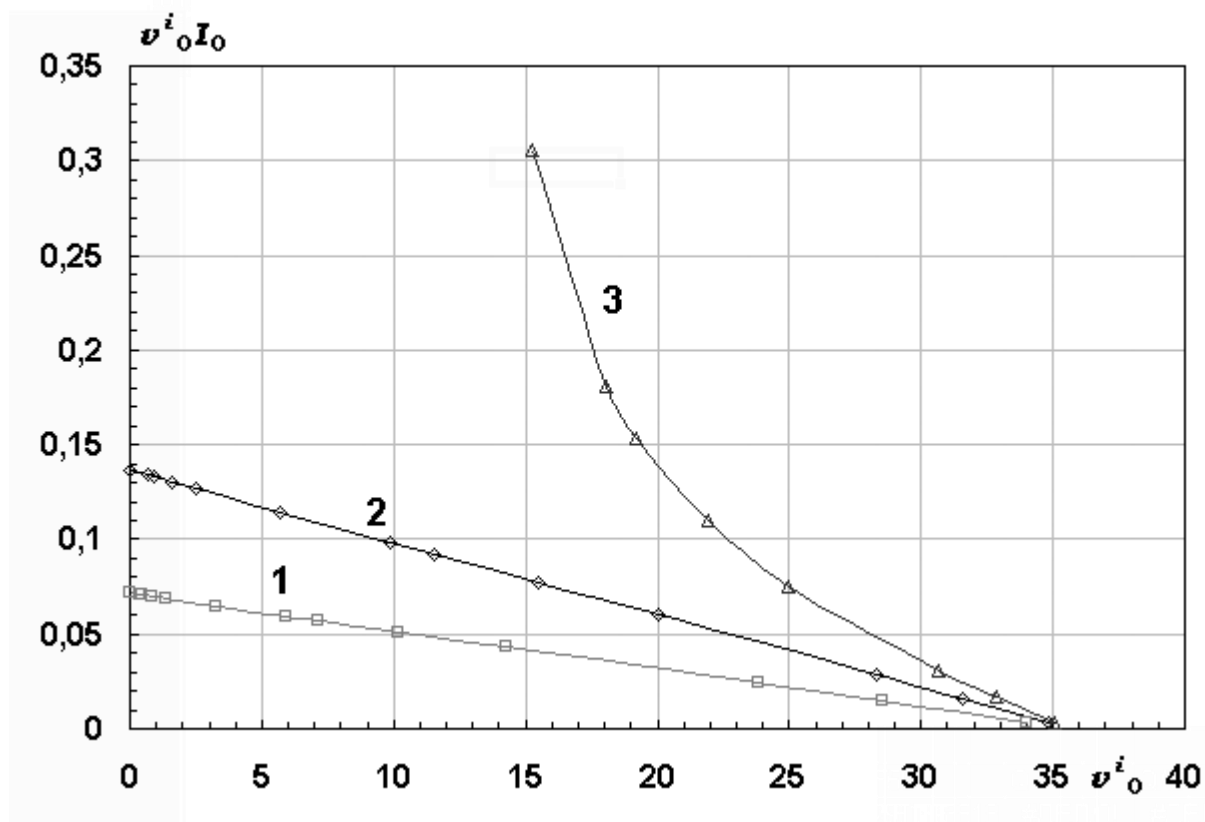


Рис. 14. Залежність $v_0^i I_0$ від v_0^i (початкова швидкість виражена у мкМс^{-1}), для механізмів лінійного інгібування з $\alpha = 1$ (крива 1), та з $\alpha = 3$ (крива 2); а також для механізмів нелінійного інгібування (крива 3, $\alpha = 5$, $\beta = 0,5$). Інші параметри ензиматичної реакції: $k_2 = 50 \text{ с}^{-1}$, $K_s = 8 \text{ мМ}$, $K_i = 2 \text{ мМ}$, $E_0 = 1 \text{ мкМ}$, $S_0 = 20 \text{ мМ}$.

5.6. Основні результати дослідження

Отже, у рівноважному наближенні був проведений аналіз універсальної кінетичної схеми впливу оборотного інгібітора на ензиматичну реакцію з метою:

1. визначити такий параметр, який би не залежав від концентрації субстрату S_0 у середовищі інкубації, адекватно відображав інгібуючу дію і тому був би більш об'єктивним при порівнянні ефективності дії оборотних інгібіторів на досліджувану ензиматичну систему, ніж коефіцієнт інгібування I_{50} .

2. знайти можливості для розрахунку всіх констант, виходячи лише зі значень початкових швидкостей інгібованої та неінгібованої реакцій, що можуть бути легко визначені в процесі дослідження впливу оборотного інгібітора на ензиматичний процес.

Показано, що рівняння початкової швидкості реакції в присутності інгібітора завжди складається з двох блоків: блоку, що не залежить від впливу інгібітора (представлений початковою швидкістю неінгібованої реакції), та блоку, що виражає дію інгібітора. Блоки, що виражають дію інгібітора (інгібіторний фактор та інгібіторна складова) можуть використовуватись в якості міри впливу інгібітора на ензиматичний процес.

В свою чергу інгібіторний фактор та інгібіторну складову можна виразити за допомогою двох величин: коефіцієнта інгібування I_{50} , та константи інгібуючої дії Q_I . Причому у випадку лінійного інгібування вплив інгібітора на ензиматичну реакцію можна виразити за допомогою лише одного параметра – коефіцієнта інгібування I_{50} , а у випадку нелінійного інгібування необхідний ще один один – константа інгібуючої дії Q_I . При цьому найпростіший вигляд рівняння приймають, якщо їх виразити через індекс гальмування, в якому будуть зібрані всі початкові швидкості.

Константа інгібуючої дії Q_I , яка об'єднує константи α , β та K_i , і коефіцієнт інгібування I_{50} , який об'єднує константи α , K_i та K_s , є такими «інтегральними» параметрами, за допомогою яких можна отримувати рівняння, що описують кінетику оборотного інгібування, в найбільш компактному вигляді.

Константа інгібуючої дії Q_I включає в себе саме ті (і тільки ті) параметри, які визначаються інгібітором. Вона не залежить ні від субстратної константи K_s , ні від концентрації субстрата S_0 в середовищі інкубації (на відміну від коефіцієнта інгібування I_{50}), і може використовуватися для порівняння даних, отриманих різними дослідниками, при дослідженні механізмів нелінійного інгібування.

Продемонстровані різні способи розрізнення лінійного та нелінійного інгібування та визначення величин коефіцієнта інгібування I_{50} та константи інгібуючої дії Q_I , що базуються на методі лінеаризації кінетичних рівнянь.

Представлений алгоритм для розрахунку всіх кінетичних констант, що описують узагальнену кінетичну схему впливу оборотного інгібітора на ензиматичну реакцію. При цьому проаналізовані всі можливі «парціальні» механізми інгібування та враховані всі особливості цих механізмів щодо можливості отримання адекватних результатів в процесі розрахунку кінетичних констант.

РОЗДІЛ 6

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МЕХАНІЗМУ

ЕНЗИМАТИЧНОГО /ТРАНСПОРТНОГО ПРОЦЕСУ

(СИСТЕМА «ЕНЗИМ/ПЕРЕНОСНИК – СУБСТРАТ – ЕФЕКТОР»)

ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ СПІВВІДНОШЕННЯ ПОЧАТКОВИХ ШВИДКОСТЕЙ

УТВОРЕННЯ ДВОХ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ (МЕТОД «RATIO») *

Вивчення закономірностей протікання, властивостей та механізмів ензиматичних реакцій та процесів мембранного транспорту речовин – одна із фундаментальних задач сучасних біохімії та біофізики. Одним із шляхів встановлення механізму ензиматичної реакції та/чи транспортного процесу є дослідження їхньої кінетики. При цьому необхідно співставляти кінетичні залежності, що були одержані в експерименті, з теоретично передбаченими. Для цього зазвичай вибираються декілька найбільш вірогідних модельних схем, за якими може відбуватися реакція, та для кожної схеми теоретично розраховується початкова швидкість процесу $v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}$ за зміною концентрації продукту реакції P за найбільш короткий експериментально можливий час інкубації t . Порівняння теоретично розрахованих кінетичних залежностей з експериментальними доцільно проводити, подаючи їх у лінеаризованому вигляді (так званий «критерій лінеаризації» – адже «найкраща крива – то є пряма»!).

По-перше, «критерій лінеаризації» є дуже важливим при встановленні конкретного механізму реакції. Дійсно, кожному механізму властивий свій набір лінеаризованих кінетичних залежностей, за яким і можна його ідентифікувати.

* Викладений в розділі 6 матеріал був опублікований у статті:

Карахін С.О., Горчев В.Ф., Костерін С.О. Ідентифікація механізму ферментативного/транспортного процесу для системи «фермент/переносник – субстрат – ефектор» із використанням методу «ratio» // Укр. біохім. журн.– 2007.– Т. 79, № 2.– С. 97–113.

І хоча повне співпадання теоретичних та експериментальних залежностей не завжди може на 100 % гарантувати, що досліджувана реакція протікає саме по даному конкретному механізму (бо, цілком можливо, що існує ще кілька механізмів, що описуються тим же набором лінеаризованих залежностей, або є ще якісь механізми, не прийняті нами до уваги, для яких є характерним аналогічний набір лінеаризованих залежностей), ми, однак, можемо відібрати для подальшого дослідження один конкретний механізм (чи кілька механізмів), відкинувши всі інші, у випадку яких співпадання теоретичних та експериментальних залежностей не спостерігали. По-друге, використання лінеаризованих графіків дає змогу розрахувати (за нахилом прямої та відрізками, що віддзеркалюються на осях) важливі характеристичні константи ензиматичної реакції чи транспортного процесу [1–6].

Зазвичай в ензимології чи в біохімічній мембранології розраховують початкову швидкість v_0 односубстратних ензиматичних реакцій чи транспортних процесів, тестуючи їхню динаміку по накопиченню одного з продуктів P . При цьому ґрунтуються на тлумаченні кінетики ензиматичного чи транспортного процесу в межах теорії «проміжного комплексу» та відповідно до класичного рівняння Міхаеліса-Ментен:

$$v_0 = \frac{V_m [S]_0}{K_s + [S]_0} \quad (1)$$

де $[S]_0$ – початкова концентрація субстрату, K_m – константа Міхаеліса, V_m – максимальна (гранична) швидкість реакції [6–10].

Втім, у фізико-хімічній біології дослідники при проведенні дослідів *in vitro* часто-густо мають справу з процесами, коли один протеїн (ензиматичний чи транспортний) забезпечує реалізацію двох динамічних процесів, які відбуваються у так званому «паралельному» режимі.

Так, наприклад, при проведенні ензимологічних експериментів часто спостерігають каталітичне перетворення двох субстратів S_1 та S_2 під дією одного ензиму F . Таке перетворення має місце тоді, коли для ензиму не є властивою абсолютна субстратна специфічність. У таких випадках утворюються два продукти ензиматичного перетворення – P_1 та P_2 .

При дослідженні мембранного переносу зустрічаються випадки, коли мембранозв'язана транспортна система (іонна помпа, іонний обмінник тощо) може одночасно транспортувати два субстрати переносу – S_1 та S_2 . Так, Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій F може одночасно здійснювати не лише перенос іонів Ca^{2+} , але й іонів Sr^{2+} чи Mn^{2+} . У цьому випадку продуктами P_1 та P_2 транспортного процесу виступають два різні катіони, які транспортувалися через внутрішню мітохондріальну мембрану.

Іншими словами, узагальнюючи розглянуті випадки реакцій з двома продуктами, що утворюються незалежно з двох різних субстратів, можемо вважати, що в подібних ензиматичних/транспортних процесах, які забезпечуються ензиматичним/транспортним протеїном F , приймають участь один субстрат S (в результаті каталітичного перетворення чи транспортування через біологічну мембрану утворює продукт P_1) та другий субстрат-ефектор E (в результаті каталітичного перетворення чи транспортування через біологічну мембрану утворює продукт P_2).

Треба відзначити, що на теперішній час кінетична теорія двохсубстратних ензиматичних реакцій добре розроблена [7–8], але навіть у тих випадках, коли в результаті реакції утворюються два продукти, здебільшого розрахунки початкової швидкості проводять по одному продукту, оскільки в досліджуваних моделях, як правило, всі продукти утворюються з одного ензим-субстратного комплексу. Проте виявляється, що розрахунок початкової швидкості ензиматичної реакції v_0 одночасно по двом різним продуктам – P_1 та P_2 (особливо в тих випадках, коли ці продукти утворюються з різних ензим-субстратних комплексів) надає набагато більші можливості для ідентифікації її механізму, ніж у випадку реєстрації по одному «головному» продукту P_1 . Справді, в такому випадку встановлення механізму реакції можна проводити не лише за одним показником (початковою швидкістю реакції v_0), а за трьома показниками – двома початковими швидкостями $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ (по відповідних продуктах P_1 та P_2) та їх співвідношенням $R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}$ (так

зване «ratio»). При цьому, звичайно, припускається, що дослідник має можливість

експериментально одночасно визначати початкову швидкість реакції, як по першому P_1 , так і по другому P_2 продукту – $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ відповідно.

Нижче наведені теоретичні основи методу кінетичного аналізу «ratio», використаного для дослідження ензиматичного/транспортного акту (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»), який підпорядковується класичному рівнянню Міхаеліса-Ментен.

6.1. Узагальнена модель ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

Для визначення механізму конкретного ензиматичного/транспортного процесу необхідно знайти відповідність експериментальних кінетичних даних теоретично розрахованим для певного механізму. Оскільки в системі «ензим (переносник) – субстрат – ефектор» можуть протікати різноманітні реакції за різними механізмами, які заздалегідь невідомі, не так просто визначитись з тим, який конкретний механізм варто обрати для кінетичних розрахунків. Тому ми на основі загальних властивостей системи розробили узагальнену модель ензиматичного/транспортного процесу, з якої при різних параметрах можна отримати будь-який конкретний механізм (парціальний механізм), який знаходиться в рамках загальних властивостей системи, закладених в узагальнену модель.

Таким чином, розглянемо систему «ензим (переносник) – субстрат – ефектор» з точки зору визначення її загальних властивостей, враховуючи експериментальні факти та приймаючи до уваги уявлення Боттса-Моралеса та Березіна-Мартінека [7–10], які багато уваги приділили вивченню дії оборотних ефекторів на кінетику ензиматичних реакцій. Ми вважаємо, що перший продукт (P_1) утворюється з одного субстрату (S) в результаті розпаду подвійного ензим-субстратного комплексу (FS), а другий продукт (P_2) утворюється з іншого субстрата-ефектора (E) в результаті розпаду подвійного ензим-субстратного комплексу (FE).

Ми також не відкидаємо можливості того, що, внаслідок одночасної присутності у розчині обох субстратів, ензим може утворювати потрійний комплекс

«ензим-субстрат-ефектор» (FSE) шляхом приєднання одного з субстратів до подвійного комплексу ензиму з іншим субстратом. Якщо таке відбувається, то не можна не враховувати, що потрійний комплекс також може розпадатись з утворенням одного чи іншого продукту (P_1 чи P_2), а також з одночасною появою обох продуктів (P_1 і P_2).

Постулюється також те, що існує основна реакція ензиму F з субстратом S , яка обов'язково проходить через утворення ензим-субстратного комплексу FS , в той час як взаємодія з субстратом-ефектором E може відбуватись двома шляхами: через реакцію безпосередньо з вільним ензимом F або через реакцію з комплексом FS .

Таким чином узагальнений механізм ензиматичного/транспортного процесу у присутності двох субстратів, кожний з яких утворює відповідний продукт, можна подати так, як показано на схемі 1.

В кінетичній схемі закладено декілька загальноприйнятих спрощень: реакції розпаду подвійних (FS , FE) і потрійного (FSE) комплексів представлені як незворотні; також не врахована можливість утворення комплексів продуктів з іншими учасниками реакції. Однак, оскільки ми будемо досліджувати тільки початкову швидкість реакції v_0 , коли концентрація продуктів P_1 і P_2 складає незначну величину відносно початкових концентрацій субстратів $[S]_0$ та $[E]_0$, можна вважати, що вищезазначені спрощення не будуть вносити значних похибок в кінетичні розрахунки.

6.2. Можливі парціальні механізми ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

Як було зазначено вище, заздалегідь невідомо, по якому конкретному механізму може протікати досліджуваний ензиматичний/транспортний процес. Тому для вивчення узагальненої моделі (схема 1) ми виділили з неї всі можливі варіанти парціальних механізмів – всього – 75 (табл. 1), провели їх кінетичний аналіз в рівноважному наближенні і для кожного з них одержали рівняння для

початкових швидкостей v_0 по кожному продукту, а також розраховували співвідношення цих швидкостей («ratio») $R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}$.

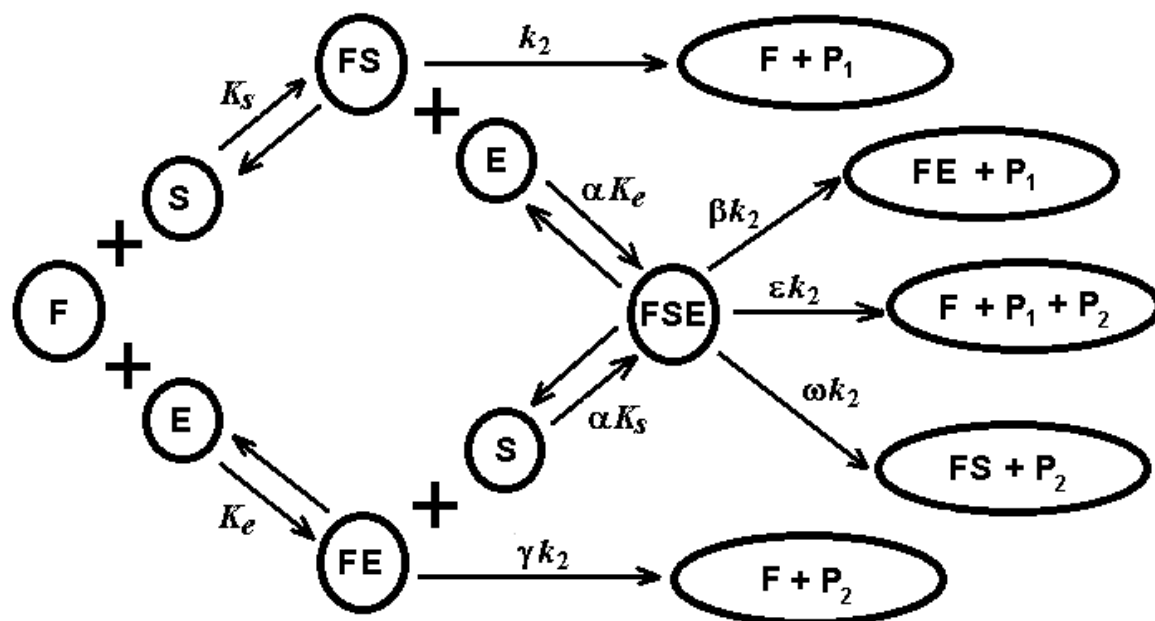


Схема 1. Узагальнений механізм ензиматичного/транспортного процесу для системи «ензим (переносник) – субстрат – ефектор», в якій, в результаті каталітичного перетворення чи транспортування через біологічну мембрану, субстрат S утворює продукт P_1 , а ефектор E – відповідно продукт P_2 .

В схемі використані наступні позначення: F – ензиматичний/ транспортний протеїн, S – субстрат; E – субстрат-ефектор, FS , FE – подвійні ензим-субстратні комплекси; FSE – потрійний ензим-субстратний комплекс; P_1 та P_2 – продукти реакції; K_s , K_e , αK_s та αK_e – константи дисоціації комплексів FS на F і S , FE на F і E , FSE на FE і S та FSE на FS і E відповідно, що виступають як константи рівноваги для окремих стадій; k_2 – число обертів на рівні розпаду комплексу FS ; β , γ , ε та ω – кінетичні коефіцієнти модифікації, які характеризують відхилення значень числа обертів на рівні розпаду комплексів FSE та FE від значення числа обертів k_2 (коефіцієнти β , γ , ε та ω можуть бути рівними нулю, рівними одиниці або більшими за неї, та мати значення між нулем та одиницею); α – термодинамічний коефіцієнт модифікації, пов'язаний із використанням закону збереження енергії до циклічного фрагменту схеми.

Досліджувані парціальні механізми для зручності сприйняття показані в табл. 1 у вигляді графів, розташованих у «вертикальних» групах 1–8 і «горизонтальних» періодах I–VII. У свою чергу кожна група складається з основної та побічної підгрупи (групи, в яких клітинки пронумеровані у нижньому лівому куті є основними, а в нижньому правому куті – побічними).

Зі збільшенням номеру групи в послідовності конкретних механізмів збільшується кількість продуктів, які утворюються при розпаді комплексів FS і FSE , а в побічних підгрупах (окрім періоду I, який не містить підгрупи) додається також розпад комплексу FE з утворенням продукту P_2 : $FE \rightarrow F + P_2$.

Зі збільшенням номеру періоду збільшується кількість оборотних стадій, а при однаковій їх кількості (як у II–III та IV–VI періодах) кожний період відрізняється від інших різним набором оборотних стадій. Крім того, кожна клітинка таблиці, в якій схематично відображений певний механізм, пронумерована, отже кожний механізм має свій порядковий номер.

6.3. Початкові швидкості $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ утворення продуктів реакції P_1 та P_2 в ензиматичному/транспортному процесі (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

Зробивши припущення про те, що в ході реакції встановилась рівновага між всіма ензим-субстратними комплексами, ми записали відповідні рівняння для кожної рівноважної (оборотної) стадії досліджуваного механізму і, таким чином, одержали систему алгебраїчних рівнянь з кількома невідомими (кількість невідомих відповідала кількості ензим-субстратних комплексів, концентрацію яких нам і потрібно було знайти). Відповідні рівняння рівноваги для кожної стадії реакції, наведені на схемі 1, виражаються наступним чином:


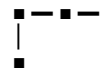
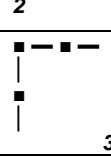
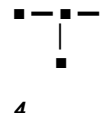
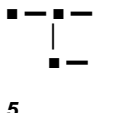
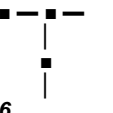
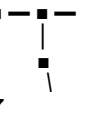
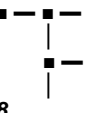
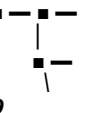
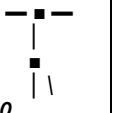
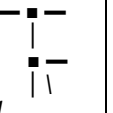
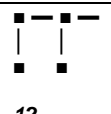
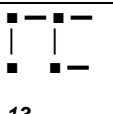

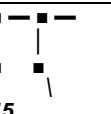
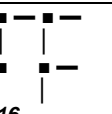
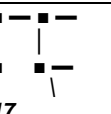
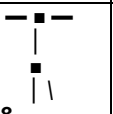
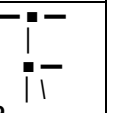
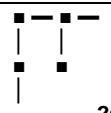
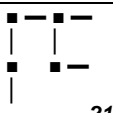
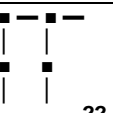
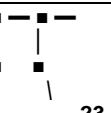
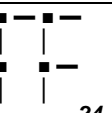
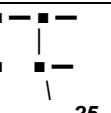
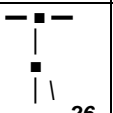
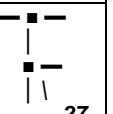
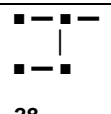
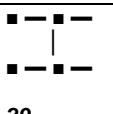
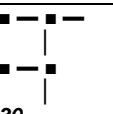
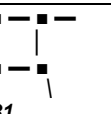
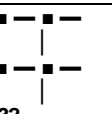
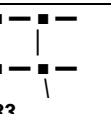
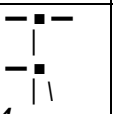
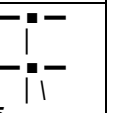
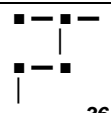
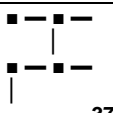
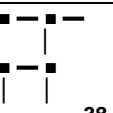
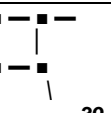
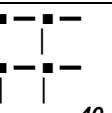
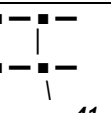
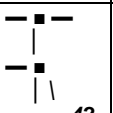
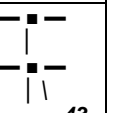

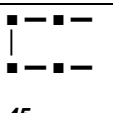
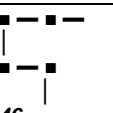
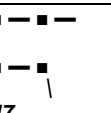
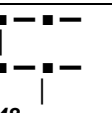
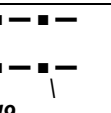
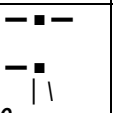
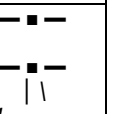
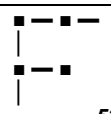
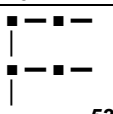
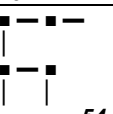
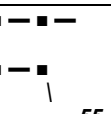
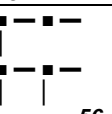

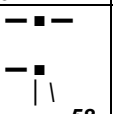
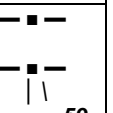
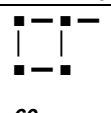
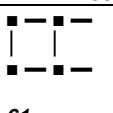
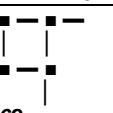
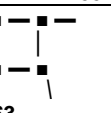
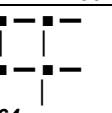
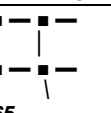
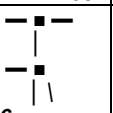
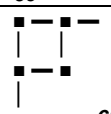
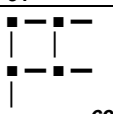

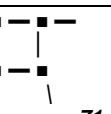
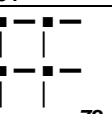
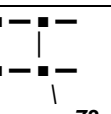
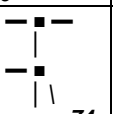
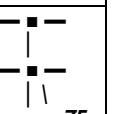
$$[F] [S] = K_s [FS] \quad (2)$$

$$[F] [E] = K_e [FE] \quad (3)$$

$$[FS] [E] = \alpha K_e [FSE] \quad (4)$$

$$[FE] [S] = \alpha K_s [FSE] \quad (5)$$

Таблиця 1. Всі можливі парціальні механізми, подані у вигляді графів, ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»), представленого на схемі 1.

ПЕРІОДИ*	ГРУПИ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>I</i> (K_s)								
<i>II</i> (K_s, K_e)								
								
<i>III</i> (K_s, aK_e)								
								
								
								
								
								
								
	<i>VII</i> (K_s, aK_s, aK_e, K_e)							
								

*) поряд з номером періоду зазначені константи рівноваги оборотних стадій, які задіяні в механізмах, що відносяться до даного періоду

Оскільки в даних рівняннях концентрації всіх речовин виражені через концентрації їх вільних форм у розчині, які, як правило, невідомі, нам потрібно виразити їх через початкові (загальні) концентрації. Це можна зробити наступним чином: концентрації вільних ензиматичного/транспортного білка F , субстрата S і ефектора E записуються відповідно як:

$$[F] = [F]_0 - [FS] - [FE] - [FSE] \quad (6)$$

$$[S] = [S]_0 - [FS] - [FSE] \quad (7)$$

$$[E] = [E]_0 - [FE] - [FSE] \quad (8)$$

Проте, підставивши ці вирази у рівняння (2–5) ми не зможемо аналітично розв'язати нову систему рівнянь, оскільки з'являються квадратні і кубічні рівняння, які не дають змоги отримати рішення у вигляді, придатному для подальшого аналізу. Тому в подібних випадках намагаються спростити вирази, виходячи з експериментальних умов проведення процесу.

В даному випадку приймають до уваги своєрідний концентраційний режим проведення ензиматичного/ транспортного процесу: оскільки реакцію проводять при великому надлишку субстратів по відношенню до ензиматичного/транспортного білка ($[S]_0 + [E]_0 \gg [F]_0$), то в рівняннях (7) та (8) можна знехтувати значеннями концентрацій ензим-субстратних комплексів $[FS]$, $[FE]$ та $[FSE]$. Після такого припущення рівняння (7) та (8) набувають наступного простого вигляду:

$$[S] = [S]_0 \quad (9)$$

$$[E] = [E]_0 \quad (10)$$

Підставивши тепер вирази (6), (9) і (10) замість відповідних концентрацій вільних форм ензиматичного/транспортного протеїна F , субстрата S та субстрата-ефектора E у рівняння (2–5), отримаємо систему з чотирьох рівнянь першого ступеня з трьома невідомими:

$$[S]_0 [F]_0 - [S]_0 [FS] - [S]_0 [FE] - [S]_0 [FSE] = K_s [FS] \quad (11)$$

$$[E]_0 [F]_0 - [E]_0 [FS] - [E]_0 [FE] - [E]_0 [FSE] = K_e [FE] \quad (12)$$

$$[FS] [E]_0 = \alpha K_e [FSE] \quad (13)$$

$$[FE] [S]_0 = \alpha K_s [FSE] \quad (14)$$

Розв'язавши систему рівнянь (11–14) знайдемо концентрації вільних форм ензим-субстратних комплексів $[FS]$, $[FE]$ та $[FSE]$. Після цього легко розрахувати початкові швидкості утворення продуктів P_1 та P_2 :

$$v_{0,1} = k_2 [FS] + \beta k_2 [FSE] + \varepsilon k_2 [FSE] \quad (15)$$

$$v_{0,2} = \gamma k_2 [FE] + \omega k_2 [FSE] + \varepsilon k_2 [FSE] \quad (16)$$

Одержані рівняння для початкових швидкостей $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ утворення відповідно продуктів P_1 та P_2 представлені в таблицях 2 і 3. У явному вигляді ці рівняння є рівняннями Міхаеліса-Ментен і в загальному вигляді можуть бути записані наступним чином:

$$v_{0,1} = \frac{A_1 [S]_0}{B_1 + [S]_0} \quad (17)$$

$$v_{0,2} = \frac{A_2 [E]_0}{B_2 + [E]_0} \quad (18)$$

Тут вирази для A_1 та A_2 будуть відповідати уявним максимальним (граничним) швидкостям V_m , а вирази для B_1 та B_2 – уявним константам Міхаеліса K_m .

В результаті аналізу в рівноважному наближенні виявилось, що вся сукупність механізмів, представлених у табл. 1, описується за допомогою комбінації 10 рівнянь для початкової швидкості $v_{0,1}$ по продукту P_1 (табл. 2) та 11 рівнянь для початкової швидкості $v_{0,2}$ по продукту P_2 (табл. 3).

Таблиця 2. Рівняння для початкової швидкості $v_{0,1}$ утворення продукту P_1 , уявної максимальної швидкості A_1 та уявної константи Міхаеліса B_1 для всіх досліджених парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»).

№ п/п	Початкова швидкість $v_{0,1}$ утворення продукту P_1	Уявна максимальна (гранична) швидкість A_1 (по $[S]_0$)	Уявна константа Міхаеліса B_1 (по $[S]_0$)	Номер механізму (див. табл. 1)
1	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0}{K_s + [S]_0}$	$A_1 = k_2 [F]_0$	$B_1 = K_s$	1
2	$v_{0,1} = \frac{k_2 K_e [S]_0 [F]_0}{K_e (K_s + [S]_0) + K_s [E]_0}$	$A_1 = k_2 [F]_0$	$B_1 = \frac{K_s (K_e + [E]_0)}{K_e}$	2, 3
3	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 \alpha K_e}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_1 = \frac{\alpha K_e k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	4, 6
4	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 (\alpha K_e + \beta [E]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_1 = \frac{(\alpha K_e + \beta [E]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	5, 8
5	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 (\alpha K_e + \varepsilon [E]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_1 = \frac{(\alpha K_e + \varepsilon [E]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	7, 10
6	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 \{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\}}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_1 = \frac{\{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\} k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	9, 11
7	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 \alpha K_e}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_1 = \frac{\alpha K_e k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	12, 14, 20, 22, 28, 30, 36, 38, 44, 46, 52, 54, 60, 62, 68, 70
8	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 (\alpha K_e + \beta [E]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_1 = \frac{(\alpha K_e + \beta [E]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	13, 16, 21, 24, 29, 32, 37, 40, 45, 48, 53, 56, 61, 64, 69, 72
9	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 (\alpha K_e + \varepsilon [E]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_1 = \frac{(\alpha K_e + \varepsilon [E]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	15, 18, 23, 26, 31, 34, 39, 42, 47, 50, 55, 58, 63, 66, 71, 74
10	$v_{0,1} = \frac{k_2 [S]_0 [F]_0 \{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\}}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_1 = \frac{\{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\} k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_1 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	17, 19, 25, 27, 33, 35, 41, 43, 49, 51, 57, 59, 65, 67, 73, 75

Примітка: тут $[F]_0$, $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації ензиматичного/транспортного білка, субстрата та ефектора відповідно.

Таблиця 3. Рівняння для початкової швидкості $v_{0,2}$ утворення продукту P_2 , уявної максимальної швидкості A_2 та уявної константи Міхаеліса B_2 для всіх досліджених парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

№ п/п	Початкова швидкість $v_{0,2}$ утворення продукту P_2	Уявна максимальна початкова швидкість A_2 (по $[E]_0$)	Уявна константа Міхаеліса B_2 (по $[E]_0$)	Номер механізму (див. табл. 1)
1	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 \gamma K_s}{K_e (K_s + [S]_0) + K_s [E]_0}$	$A_2 = \gamma k_2 [F]_0$	$B_2 = \frac{K_e (K_s + [S]_0)}{K_s}$	3
2	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \omega}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = \omega k_2 [F]_0$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{[S]_0}$	6, 8
3	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \varepsilon}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = \varepsilon k_2 [F]_0$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{[S]_0}$	7, 9
4	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 (\omega + \varepsilon)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = (\omega + \varepsilon) k_2 [F]_0$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{[S]_0}$	10, 11
5	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \omega}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\omega [S]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	14, 16, 30, 32, 46, 48, 62, 64
6	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \varepsilon}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\varepsilon [S]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	15, 17, 31, 33, 47, 49, 63, 65
7	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 (\omega + \varepsilon)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{(\omega + \varepsilon) [S]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	18, 19, 34, 35, 50, 51, 66, 67
8	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 \alpha \gamma K_s}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\alpha \gamma K_s k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	20, 21, 36, 37, 52, 53, 68, 69
9	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 (\alpha \gamma K_s + \omega [S]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{(\alpha \gamma K_s + \omega [S]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	22, 24, 38, 40, 54, 56, 70, 72
10	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 (\alpha \gamma K_s + \varepsilon [S]_0)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{(\alpha \gamma K_s + \varepsilon [S]_0) k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	23, 25, 39, 41, 55, 57, 71, 73
11	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 \{ \alpha \gamma K_s + (\omega + \varepsilon) [S]_0 \}}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\{ \alpha \gamma K_s + (\omega + \varepsilon) [S]_0 \} k_2 [F]_0}{\alpha K_s + [S]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_e (K_s + [S]_0)}{\alpha K_s + [S]_0}$	26, 27, 42, 43, 58, 59, 74, 75

Примітка: тут $[F]_0$, $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації ензиматичного/транспортного білка, субстрата та ефектора відповідно.

Порівнюючи дані з табл. 2 та 3 з даними табл. 1, можна помітити, що починаючи з IV періоду (тобто в періодах IV–VII) початкові швидкості $v_{0,1}$ утворення продукту P_1 однакові в межах кожної групи (наприклад, початкові швидкості для всіх механізмів, розташованих у основній і побічній підгрупах групи 1 – а це механізми під номерами 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60 та 68 – однакові).

Більше того, однакові початкові швидкості $v_{0,1}$ виявляються не тільки в межах однієї групи, але й у двох різних групах. Такі пари груп з однаковими початковими швидкостями $v_{0,1}$ утворення продукту P_1 складають групи 1 і 3, 2 і 5, 4 і 7 та 6 і 8. Така ж закономірність спостерігається також і в межах періоду III.

Початкові швидкості утворення продукту P_2 відрізняються в межах групи, залишаючись однаковими в межах основної та побічної підгруп (також тільки для періодів IV–VII). Пари груп з однаковими швидкостями утворення продукту P_2 відрізняються від вище розглянутого випадку – тут вони утворюють такі пари: 3 і 5, 4 і 6, 7 і 8 та 1 і 2.

Чим обумовлено те, що в межах однієї групи рівняння для швидкості реакції мають однаковий вигляд для періодів IV, V, VI і VII?

Щоб дати відповідь на це питання повернемося до розгляду системи рівнянь (11–14). Ми бачимо, що система складається з чотирьох рівнянь з трьома невідомими, так що для знаходження концентрацій трьох ензим-субстратних комплексів достатньо лише трьох рівнянь. Будь-яке одне з чотирьох рівнянь, таким чином, є зайвим.

В свою чергу кожне рівняння є відображенням певної стадії ензиматичної реакції. Тому маємо, що яку б конфігурацію оборотних стадій (три варіанти з трьох стадій (періоди IV–VI) та один – з чотирьох (період VII)) реакції ми не розглядали, рівняння для концентрацій ензим-субстратних комплексів у всіх цих випадках виходять однаковими.

Ще два аспекти заслуговують на увагу.

По-перше, деякі рівняння для початкової швидкості $v_{0,2}$ утворення продукту P_2 з метою знаходження рівнянь для максимальної початкової швидкості та константи

Міхаеліса можна привести до вигляду, аналогічного рівнянню (17), тобто відносно концентрації субстрату S (рівняння (19)), а не відносно концентрації ефектора E :

$$v_{0,2} = \frac{A_2 [S]_0}{B_2 + [S]_0} \quad (19)$$

Ті механізми, які дозволяють такі перетворення, приведені в табл. 4.

По-друге, під час аналізу механізмів, представлених у табл. 1, виявились певні проблеми при застосуванні рівноважного підходу при виводі рівнянь для початкової швидкості реакції v_0 . Зокрема, при прискіпливому розгляді механізмів 5, 8, 9 і 11 виявляється, що ензим-субстратний (по-суті – ензим-ефекторний) комплекс FE утворюється в результаті необоротної реакції і не має можливостей для подальшого перетворення.

Таким чином, цей комплекс протягом реакції буде тільки накопичуватись, тому для нього не може бути жодного проміжку часу, коли б він перебував у рівновазі з іншими ензим-субстратними комплексами.

В результаті ми не можемо розрахувати концентрації ензим-субстратних комплексів, що в математичному плані виражається в тому, що ми можемо скласти лише два рівняння для оборотних стадій, а в них входить три невідомі концентрації ензим-субстратних комплексів. Як відомо з математики, система двох рівнянь з трьома невідомими не має розв'язку.

Отже в табл. 2 та 3 для механізмів 5, 8, 9 і 11 приведені рівняння для початкових швидкостей $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$, уявних максимальних швидкостей A_1 та A_2 , уявних констант Міхаеліса B_1 та B_2 , які були виведені в припущенні, що концентрація ензим-субстратного комплексу FE в початковий період реакції ($t \rightarrow 0$) є незначною і при визначенні концентрації вільного ензиму нею можна знехтувати.

Таблиця 4. Рівняння для початкової швидкості $v_{0,2}$ утворення продукту P_2 , уявної максимальної швидкості A_2 та уявної константи Міхаеліса B_2 для досліджених парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»), що дозволяють виразити залежність початкової швидкості від загальної концентрації субстрату $[S]_0$ у вигляді рівняння (19)

№	Початкова швидкість $v_{0,2}$ утворення продукту P_2	Уявна максимальна швидкість A_2 (по $[S]_0$)	Уявна константа Міхаеліса B_2 (по $[S]_0$)	Номер механізму
2	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \omega}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = \frac{\omega [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	6, 8
3	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \varepsilon}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = \frac{\varepsilon [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	7, 9
4	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 (\omega + \varepsilon)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [S]_0 [E]_0}$	$A_2 = \frac{(\omega + \varepsilon) [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s K_e}{\alpha K_e + [E]_0}$	10, 11
5	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \omega}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\omega [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	14, 16, 30, 32, 46, 48, 62, 64
6	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 \varepsilon}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{\varepsilon [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	15, 17, 31, 33, 47, 49, 63, 65
7	$v_{0,2} = \frac{k_2 [E]_0 [F]_0 [S]_0 (\omega + \varepsilon)}{\alpha K_e (K_s + [S]_0) + [E]_0 (\alpha K_s + [S]_0)}$	$A_2 = \frac{(\omega + \varepsilon) [E]_0 k_2 [F]_0}{\alpha K_e + [E]_0}$	$B_2 = \frac{\alpha K_s (K_e + [E]_0)}{\alpha K_e + [E]_0}$	18, 19, 34, 35, 50, 51, 66, 67

Примітка: тут $[F]_0$, $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації ензиматичного/транспортного білка, субстрата та ефектора відповідно.

6.4. Співвідношення початкових швидкостей («ratio» $R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}$) утворення

продуктів реакції P_1 та P_2 в ензиматичному/транспортному процесі (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

Тепер, коли ми змогли знайти вирази для початкових швидкостей утворення продуктів P_1 та P_2 , можна розрахувати також і їх співвідношення («ratio»):

$$R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}} \quad (20)$$

Параметр R для узагальненого механізму, що відповідає схемі 1 (згідно співвідношень (2)–(18) та (20)) виражається наступним рівнянням (21):

$$R = \frac{\{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon)[E]_0\}[S]_0}{\{\alpha \gamma K_s + (\omega + \varepsilon)[S]_0\}[E]_0} \quad (21)$$

В результаті проведеного аналізу виявилось, що всі досліджені механізми описуються чотирнадцятьма рівняннями, що виражають співвідношення швидкостей реакції R по різним продуктам – P_1 та P_2 (табл. 5).

З табл. 5 видно, що співвідношення початкових швидкостей R також підпорядковане певній системі: в межах кожної основної та побічної підгрупи ці відношення виражаються однаковими рівняннями. Зрозуміло, що для механізмів під номерами 1, 2, 4, 12, 28, 44, 60 та 5, 13, 29, 45, 61 співвідношення швидкостей R не може бути отримане, бо в реакціях, що проходять по цих механізмах, не утворюється продукт P_2 .

Порівнюючи табл. 2, 3 і 5, можна помітити, що, приймаючи до уваги набір з трьох експериментальних параметрів (початкова швидкість $v_{0,1}$ утворення продукту P_1 , початкова швидкість $v_{0,2}$ утворення продукту P_2 та співвідношення цих швидкостей R), є можливість розрізнити 27 парціальних механізмів (або певної сукупності механізмів). Таким чином з 75 можливих парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор») за допомогою лише кінетичних даних, що одержані в режимі визначення початкової швидкості, можна розрізнити лише 27 окремих механізмів чи груп механізмів (табл. 6); ті парціальні механізми, графи яких розміщені в основній чи побічній підгрупах періодів IV, V, VI та VII, неможливо розрізнити, бо вони є ідентичними з кінетичної точки зору. При цьому ще раз необхідно підкреслити, що такі висновки зроблено на основі розгляду кінетики реакції у рівноважному наближенні.

Таблиця 5. Співвідношення $R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}$ початкових швидкостей утворення продуктів P_1

та P_2 для всіх досліджених парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»)

№ п/п	Співвідношення R початкових швидкостей утворення продуктів P_1 та P_2	Номер механізму	№ п/п	Співвідношення R початкових швидкостей утворення продуктів P_1 та P_2	Номер механізму
1	$R = \frac{K_e [S]_0}{\gamma K_s [E]_0}$	3, 20, 36, 52, 68	8	$R = \frac{(\alpha K_e + \beta [E]_0) [S]_0}{\alpha \gamma K_s [E]_0}$	21, 37, 53, 69
2	$R = \frac{\alpha K_e}{\omega [E]_0}$	6, 14, 30, 46, 62	9	$R = \frac{\alpha K_e [S]_0}{(\alpha \gamma K_s + \omega [S]_0) [E]_0}$	22, 38, 54, 70
3	$R = \frac{\alpha K_e + \varepsilon [E]_0}{\varepsilon [E]_0}$	7, 15, 31, 47, 63	10	$R = \frac{(\alpha K_e + \varepsilon [E]_0) [S]_0}{(\alpha \gamma K_s + \varepsilon [S]_0) [E]_0}$	23, 39, 55, 71
4	$R = \frac{\alpha K_e + \beta [E]_0}{\omega [E]_0}$	8, 16, 32, 48, 64	11	$R = \frac{(\alpha K_e + \beta [E]_0) [S]_0}{(\alpha \gamma K_s + \omega [S]_0) [E]_0}$	24, 40, 56, 72
5	$R = \frac{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0}{\varepsilon [E]_0}$	9, 17, 33, 49, 65	12	$R = \frac{\{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\} [S]_0}{(\alpha \gamma K_s + \varepsilon [S]_0) [E]_0}$	25, 41, 57, 73
6	$R = \frac{\alpha K_e + \varepsilon [E]_0}{(\omega + \varepsilon) [E]_0}$	10, 18, 34, 50, 66	13	$R = \frac{(\alpha K_e + \varepsilon [E]_0) [S]_0}{\{\alpha \gamma K_s + (\omega + \varepsilon) [S]_0\} [E]_0}$	26, 42, 58, 74
7	$R = \frac{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0}{(\omega + \varepsilon) [E]_0}$	11, 19, 35, 51, 67	14	$R = \frac{\{\alpha K_e + (\beta + \varepsilon) [E]_0\} [S]_0}{\{\alpha \gamma K_s + (\omega + \varepsilon) [S]_0\} [E]_0}$	27, 43, 59, 75

Примітка: тут $[F]_0$, $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації ензиматичного/транспортного білка, субстрата та ефектора відповідно.

Проте треба відзначити, що для того, щоб реально розрізнити парціальні механізми, недостатньо того, щоб вони описувались різними кінетичними рівняннями. Необхідно ще, щоб ці рівняння відрізнялись своєю «структурою».

Таблиця 6. Парціальні механізми ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»), які принципово можна було б розрізнити, використовуючи кінетичні параметри $\nu_{0,1}$, $\nu_{0,2}$ та R .

№ п/п	Номер механізму в табл. 1	Місце механізму в табл. 1	$\nu_{0,1}$	$\nu_{0,2}$	R	№ п/п	Номер механізму в табл. 1	Місце механізму в табл. 1	$\nu_{0,1}$	$\nu_{0,2}$	R
1	1	I-1o	1	–	–	12	12, 28, 44, 60	IV-VII-1o	7	–	–
2	2	II-1o	2	–	–	13	13, 29, 45, 61	IV-VII-2o	8	–	–
3	3	II-1п	2	1	1	14	14, 30, 46, 62	IV-VII-3o	7	5	2
4	4	III-1o	3	–	–	15	15, 31, 47, 63	IV-VII-4o	9	6	3
5	5	III-2o	4	–	–	16	16, 32, 48, 64	IV-VII-5o	8	5	4
6	6	III-3o	3	2	2	17	17, 33, 49, 65	IV-VII-6o	10	6	5
7	7	III-4o	5	3	3	18	18, 34, 50, 66	IV-VII-7o	9	7	6
8	8	III-5o	4	2	4	19	19, 35, 51, 67	IV-VII-8o	10	7	7
9	9	III-6o	6	3	5	20	20, 36, 52, 68	IV-VII-1п	7	8	1
10	10	III-7o	5	4	6	21	21, 37, 53, 69	IV-VII-2п	8	8	8
11	11	III-8o	6	4	7	22	22, 38, 54, 70	IV-VII-3п	7	9	9
						23	23, 39, 55, 71	IV-VII-4п	9	10	10
						24	24, 40, 56, 72	IV-VII-5п	8	9	11
						25	25, 41, 57, 73	IV-VII-6п	10	10	12
						26	26, 42, 58, 74	IV-VII-7п	9	11	13
						27	27, 43, 59, 75	IV-VII-8п	10	11	14

Примітка: тут “o” та “п” – позначки для основної та побічної підгруп з табл. 1.

6.5. Використання методу лінеаризації для ідентифікації механізму

Звичайно, залежності початкових швидкостей ензиматичних реакцій від концентрацій субстратів виражаються гіперболами або більш складними кривими (наприклад, кривими з максимумами), які важко піддаються аналізу. Тому для визначення того, чи описується досліджувана кінетична залежність певним кінетичним рівнянням, найчастіше застосовують метод лінеаризації. Він полягає в тому, що кінетичне рівняння виражають у такому вигляді, щоб воно відповідало рівнянню прямої лінії, тобто

$$Y = aX + b \quad (22)$$

При цьому Y і X повинні бути виражені лише через величини, які можна безпосередньо вимірювати та/чи задавати. Тоді експериментальні дані виражають у вигляді графіка залежності Y від X і, якщо отримують лінійний графік, який характеризується високим значенням коефіцієнта кореляції r , роблять висновок, що експериментальні дані можуть бути описані даним кінетичним рівнянням. В такому випадку із використанням лінеаризованого графіка часто можна визначити також значення параметрів, які входять в кінетичне рівняння (за тангенсом кута нахилу та/або відрізками, що відсікаються на осях абсцис і ординат) [1, 3–9].

Для того, щоб легше було зрозуміти, наскільки експериментальні дані відповідають певному кінетичному рівнянню, ми також використали метод лінеаризації і записали всі рівняння, які описують кожний парціальний механізм, у лінеаризованому вигляді.

В результаті ми визначили, в яких координатах необхідно побудувати графіки, щоб експериментальні дані для досліджуваного механізму вкладались на пряму лінію. Зібравши такі дані в таблиці (табл. 7 та 8) ми змогли проаналізувати, як реально можна розрізнити досліджувані механізми.

Таблиця 7. Ідентифікація парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор») за допомогою лінеаризованих графіків залежності $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ від концентрацій реагентів $[S]_0$ і $[E]_0$

Номер механізму (з табл. 1)	Залежності початкової швидкості $v_{0,1}$ (по продукту P_1) від:							Залежності початкової швидкості $v_{0,2}$ (по продукту P_2) від:							Тип	
	$[S]_0$ (при $[E]_0 = \text{Const}$)			$[E]_0$ (при $[S]_0 = \text{Const}$)				$[S]_0$ (при $[E]_0 = \text{Const}$)				$[E]_0$ (при $[S]_0 = \text{Const}$)				
	$\frac{1}{v_{0,1}} - \frac{1}{[S]_0}$	$\frac{[S]_0}{v_{0,1}} - [S]_0$	$\frac{v_{0,1}}{[S]_0} - v_{0,1}$	$\frac{1}{v_{0,1}} - [E]_0$	$\frac{1}{v_{0,1}} - \frac{1}{[E]_0}$	$v_{0,1}[E]_0 - v_{0,1}$	$\frac{v_{0,1}}{[E]_0} - v_{0,1}$	$\frac{1}{v_{0,2}} - \frac{1}{[S]_0}$	$\frac{1}{v_{0,2}} - [S]_0$	$\frac{[S]_0}{v_{0,2}} - [S]_0$	$v_{0,2}[S]_0 - v_{0,2}$	$\frac{v_{0,2}}{[S]_0} - v_{0,2}$	$\frac{1}{v_{0,2}} - \frac{1}{[E]_0}$	$\frac{[E]_0}{v_{0,2}} - [E]_0$		$\frac{v_{0,2}}{[E]_0} - v_{0,2}$
1	+	+	+	CX	CX	-	-									1
2	+	+	+	+	-	+	-									2
3	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	4
4	+	+	+	+	-	+	-									2
5	+	+	+	-	-	-	-									3
6	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	6
7	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
10	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
11	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
12, 28, 44, 60	+	+	+	+	-	+	-									2
13, 29, 45, 61	+	+	+	-	-	-	-									3
14, 30, 46, 62	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	6
15, 31, 47, 63	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
16, 32, 48, 64	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
17, 33, 49, 65	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
18, 34, 50, 66	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
19, 35, 51, 67	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	8
20, 36, 52, 68	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	4
21, 37, 53, 69	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	5
22, 38, 54, 70	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	7
23, 39, 55, 71	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	9
24, 40, 56, 72	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	9
25, 41, 57, 73	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	9
26, 42, 58, 74	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	9
27, 43, 59, 75	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	9

Примітка: тут $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації субстрату та ефектору відповідно,

“+” та “-” віддзеркалюють наявність та відсутність лінеаризації відповідно; CX – графік прямої, паралельної осі X.

Таблиця 8. Ідентифікація парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор») за допомогою лінеаризованих графіків залежності R від концентрацій $[S]_0$ і $[E]_0$.

Номер механізму (з табл. 1)	Залежність відношення швидкостей реакції R від:																							
	$[S]_0$ та $[E]_0$											$[S]_0$ (при $[E]_0 = \text{Const}$)					$[E]_0$ (при $[S]_0 = \text{Const}$)							
	$\frac{1/R}{1/S_0}$	$\frac{S_0/R}{S_0}$	$\frac{R/E_0}{R/S_0}$	$\frac{R/S_0}{1/E_0}$	$\frac{R}{S_0/E_0}$	$\frac{1/R}{E_0/S_0}$	$\frac{R/E_0}{S_0}$	$\frac{S_0/R}{E_0}$	$\frac{R/E_0/S_0}{E_0}$	$\frac{R/E_0}{E_0 S_0}$	$\frac{R/E_0/S_0}{(R-1)E_0}$	$\frac{1/R}{1/S_0}$	$\frac{S_0/R}{S_0}$	$\frac{R/S_0}{R}$	$\frac{R/S_0}{(R-1)}$	$\frac{R}{S_0}$	$\frac{R}{1/E_0}$	$\frac{1/R}{E_0}$	$\frac{E_0 R}{E_0}$	$\frac{E_0(R-1)}{E_0}$	$\frac{(R-1)}{1/E_0}$	$\frac{E_0 R}{(R-1)E_0}$	$\frac{1/(R-1)}{E_0}$	
1																								
2																								
3	+	CX	CY	+	+	+	+	+	CX	-	CX	+	CX	CX	CX	+	+	+	CX	-	-	CX	-	
4																								
5																								
6	CX	+	CX	-	-	-	CX	-	-	CX	-	CX	+	CY	CY	CX	+	+	CX	-	-	CX	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	CX	+	CY	+	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	+	+	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	+	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	-	-	
12, 28, 44, 60																								
13, 29, 45, 61																								
14, 30, 46, 62	CX	+	CX	-	-	-	CX	-	-	CX	-	CX	+	CY	CY	CX	+	+	CX	-	-	CX	-	
15, 31, 47, 63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	CX	+	CY	+	
16, 32, 48, 64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	-	-	
17, 33, 49, 65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	+	+	-	-	
18, 34, 50, 66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	+	-	
19, 35, 51, 67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CX	+	CY	CY	CX	+	-	+	-	-	-	-	
20, 36, 52, 68	+	CX	CY	+	+	+	+	+	CX	-	CX	+	CX	CX	CX	+	+	+	CX	-	-	CX	-	
21, 37, 53, 69	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	CX	CX	CX	+	+	-	+	-	-	-	-	
22, 38, 54, 70	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	CX	-	-	CX	-	
23, 39, 55, 71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	
24, 40, 56, 72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
25, 41, 57, 73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	
26, 42, 58, 74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	
27, 43, 59, 75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	

Примітка: тут $[S]_0$ та $[E]_0$ – загальні (початкові) концентрації субстрату та ефектора відповідно,

“+” та “-” віддзеркалюють наявність та відсутність лінеаризації відповідно; CX – графік, паралельний осі X; CY – графік, паралельний осі Y.

Проаналізувавши дані, наведені в табл. 7, можна зробити висновок, що ряд залежностей є малоінформативними – так, всі механізми дають лінійні залежності в класичних координатах $\frac{1}{v_{0,1}} - \frac{1}{[S]_0}$; $\frac{[S]_0}{v_{0,1}} - [S]_0$; $\frac{v_{0,1}}{[S]_0} - v_{0,1}$ (при постійній концентрації ефектора $[E]_0$) та в координатах $\frac{1}{v_{0,2}} - \frac{1}{[E]_0}$; $\frac{[E]_0}{v_{0,2}} - [E]_0$; $\frac{v_{0,2}}{[E]_0} - v_{0,2}$ (при постійній концентрації субстрата $[S]_0$). Також малою інформативністю характеризуються графіки в координатах $\frac{1}{v_{0,1}} - \frac{1}{[E]_0}$; $\frac{v_{0,1}}{[E]_0} - v_{0,1}$ (при постійній концентрації субстрата $[S]_0$), які не дають лінійних залежностей для жодного механізму (крім першого).

В той же час побудова графіків у координатах $\frac{1}{v_{0,1}} - [E]_0$ та $\frac{[E]_0}{v_{0,1}} - v_{0,1}$ (при постійній концентрації субстрата $[S]_0$) дозволяє розподілити всі досліджені механізми на три групи, в одну з яких входить механізм під номером 1 (див. табл. 1), в другу – механізми, які дають лінійну залежність в цих координатах, а в третю – ті, що не дають лінійності.

Якщо проаналізувати рівняння для початкової швидкості $v_{0,2}$ по продукту P_2 (при постійній концентрації ефектора $[E]_0$), то можна побачити, що всі парціальні механізми також поділяються на три групи: в одну групу входять механізми, які дають лінійність в координатах $\frac{1}{v_{0,2}} - [S]_0$ та $\frac{[S]_0}{v_{0,2}} - v_{0,2}$, в другу – механізми, які дають лінійність в координатах $\frac{1}{v_{0,2}} - \frac{1}{[S]_0}$; $\frac{[S]_0}{v_{0,2}} - [S]_0$ та $\frac{v_{0,2}}{[S]_0} - v_{0,2}$, а в третю – механізми, які не дають лінійних залежностей в жодних з цих координат.

Отже, незважаючи на те, що нам вдалося виділити 27 типів механізмів (див. табл. 6), які відрізняються набором рівнянь для початкових швидкостей $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$, всі ці рівняння можна розділити на декілька груп, які мають однакову «структуру» (вона головним чином залежить від розміщення у рівнянні змінних, що виражають

концентрації субстрата та субстрата-ефектора); іншими словами, кінетичні залежності для механізмів, які входять в певну групу, дають лінійні графіки строго в одних і тих же координатах. В результаті, по рівнянням для швидкостей $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ з 27 типів можливих механізмів можна розрізнити тільки 9.

Тепер розглянемо, наскільки інформативним виявиться співвідношення швидкостей R (табл. 8). Відразу помітно, що рівняння, які виражають відношення швидкостей, підлягають лінеаризації більш різноманітними способами. Лінійність може проявлятися не тільки при постійній концентрації субстрата чи ефектора, але й при будь-яких співвідношеннях їх загальних концентрацій.

Як впливає з табл. 8, взявши до уваги співвідношення швидкостей R можна розрізнити вже 15 типів парціальних механізмів з 27.

6.6. Послідовність дій для ідентифікації конкретного парціального механізму

З поданих в табл. 8 результатів дослідження видно, що побудувавши лінеаризовані графіки залежностей початкових швидкостей v_0 та їх співвідношення R від концентрацій реагентів (S і E), та проаналізувавши, в яких координатах графіки лінійні, а в яких лінійності не спостерігається, можна зробити певні висновки про механізм досліджуваної реакції. Це обумовлено тим, що часто, навіть при невеликих розбіжностях в механізмах, реагенти розподіляються по проміжних комплексах таким чином, що реагуюча система набуває нових кінетичних властивостей, які в багатьох випадках допомагають розрізнити ці механізми.

Проте, як видно з табл. 7 та 8, в рівноважному наближенні ми не можемо відрізнити всі 75 можливих парціальних механізмів один від одного, оскільки однаковий набір властивостей часто є характерним для кількох можливих механізмів. Однак, визначивши експериментально залежності початкових швидкостей v_0 та їх співвідношення R від концентрацій реагентів (S і E), ми можемо відкинути більшу кількість тих варіантів, які не дають співпадіння з експериментом. В результаті залишиться тільки деяка кількість можливих механізмів, але ми можемо бути впевнені в тому, що ми дійсно маємо їх повний набір, а тому можемо

будувати стратегію подальших досліджень, маючи повну інформацію про те, на що ми повинні звернути увагу.

При порівнянні експериментальних результатів з поданими у табл. 7 та 8, можуть виникнути певні додаткові труднощі, пов'язані з тим, що рівняння для швидкостей реакції $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ і їх співвідношення R є досить складними (див. табл. 2, 3 та 5), тому при певних співвідношеннях кінетичних констант можна отримати лінійний графік навіть в тих випадках, коли в таблиці показано, що лінійності не повинно бути. У будь-якому випадку при аналізі експериментальних результатів треба керуватись такими критеріями:

- якщо в таблиці зазначено, що в даних координатах лінійних графіків не повинно бути і при представленні експериментальних даних в таких координатах графіки не утворюють прямих ліній, то це означає, що експеримент співпадає з теорією;

- якщо в таблиці показано, що лінійність повинна бути, а в експерименті вона не спостерігається, то можна зробити висновок, що експеримент не співпадає з теорією;

- якщо в таблиці зазначено, що лінійності не повинно бути, а в експерименті лінійність спостерігається, то необхідно додатково проаналізувати ситуацію, бо, можливо, лінійність проявляється в результаті того, що при певних значеннях кінетичних констант в кінетичному рівнянні деякі члени стають значно меншими, ніж інші, і фактично рівняння набуває дещо іншого вигляду, в результаті чого його вже можна виразити в лінійному вигляді;

- якщо в таблиці показано, що лінійність повинна бути, і в експерименті ми її виявили, то також необхідно додатково проаналізувати ситуацію, бо лінійність може проявлятися внаслідок специфічного співвідношення кінетичних констант.

В будь-якому випадку необхідно завжди пам'ятати, що реальний механізм досліджуваної ензиматичної реакції може виявитись значно складнішим, ніж ті, що розглянуті в даній роботі, а тому треба спробувати побудувати як можна більше графіків у різних координатах (див. табл. 7 та 8) для того, щоб впевнитись, що розходжень експериментальних і табличних результатів немає.

Стратегія визначення конкретного парціального механізму може бути наступною (табл. 9):

Встановити, чи утворюється продукт P_2 – якщо не утворюється, то можливий механізм реакції відноситься до 1, 2 або 3 типу, якщо ж він знайдений – то механізм може бути 4–15 типу.

Розрізнити механізми 1, 2 та 3 типу можна, побудувавши графік залежності початкової швидкості $v_{0,1}$ у координатах $\frac{1}{v_{0,1}} - [E]_0$ при постійній концентрації субстрату $[S]_0$. Якщо графік не має лінійної форми, то механізм досліджуваної реакції відноситься до типу 3, якщо графік лінійний – до типу 2, а у випадку, коли лінія паралельна осі абсцис – до типу 1.

Побудувавши графік у координатах $\frac{R}{[S]_0} - R$ (при постійній концентрації ефектора $[E]_0$) можна розподілити механізми на три групи: механізмам 11–15 типів у координатах $\frac{R}{[S]_0} - R$ відповідають лінійні графіки з певним кутом нахилу; механізмам 4–8 типів – відповідає пряма лінія, яка є паралельною осі ординат; механізмам 9–10 типів – відповідає пряма лінія, що є паралельною осі абсцис.

Графіки у координатах $R - [S]_0$ (при постійній концентрації ефектора $[E]_0$) та $\frac{1}{R} - [E]_0$ (при постійній концентрації субстрату $[S]_0$) дозволяють ідентифікувати механізми типу 8, 9, 10 і 11.

Графіки у координатах $\frac{R}{[S]_0} - (R-I)$ (при постійній концентрації ефектора $[E]_0$) та $\frac{[E]_0}{R} - (R-I)[E]_0$ (при постійній концентрації субстрату $[S]_0$) дозволяють ідентифікувати механізми типу 12, 13, 14, 15 і 7.

Графіки у координатах $(R-1) - \frac{1}{[E]_0}$ (при постійній концентрації субстрату $[S]_0$) та $\frac{1}{(R-1)} - [E]_0$ (при постійній концентрації субстрату $[S]_0$) дозволяють ідентифікувати механізми типу 4, 5 і 6.

Запропонована вище стратегія є тільки найкоротшим шляхом ідентифікації конкретного механізму ензиматичного/транспортного процесу, проте, особливо у випадках, коли виникають труднощі при співставленні експериментальних результатів з даними табл. 9, необхідно також використовувати і дані табл. 8.

В найбільш несприятливому випадку, коли ідентифікований механізм буде відноситись до 4 типу, при подальшому аналізі доведеться розрізнити 10 індивідуальних механізмів, що входять до цього типу. Також не дуже сприятливий варіант – 15 тип (8 індивідуальних механізмів) та 2 тип (6 індивідуальних механізмів). В більшості випадків досліднику доведеться в подальшому аналізі мати справу з 4–5 індивідуальними механізмами.

Таким чином, у рівноважному наближенні нами був проведений кінетичний аналіз ензиматичного/транспортного процесу, в якому ензим може одночасно взаємодіяти з субстратом S і ефектором E і, в результаті каталітичного перетворення чи транспортування через біологічну мембрану, субстрат утворює продукт P_1 , а ефектор – відповідно продукт P_2 . Для ідентифікації конкретного парціального механізму ензиматичного/транспортного процесу запропоновано використовувати метод «ratio» (співвідношення початкових швидкостей утворення продуктів реакцій

$$R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}).$$

Розроблений алгоритм такої ідентифікації і показано, що за допомогою параметра «ratio», представленого як залежність від концентрації субстрата $[S]_0$ чи ефектора $[E]_0$ в лінеаризованому вигляді, можна ідентифікувати 15 типів парціальних механізмів.

Таблиця 9. Алгоритм ідентифікації парціальних механізмів ензиматичного/транспортного процесу

Номер механізму (з табл. 1)	P_2	$v_{0,1}$	R							Тип механізму
		[S] ₀ - Const	[E] ₀ - Const	[E] ₀ - Const	[S] ₀ - Const	[E] ₀ - Const	[S] ₀ - Const	[S] ₀ - Const	[S] ₀ - Const	
		$\frac{1}{v_{0,1}} - [E]_0$	$\frac{R}{[S]_0} - R$	$R - [S]_0$	$\frac{1}{R} - [E]_0$	$\frac{R}{[S]_0} - (R-1)$	$R[E]_0 - (R-1)[E]_0$	$(R-1) - \frac{1}{[E]_0}$	$\frac{1}{(R-1)} - [E]_0$	
1	-	CX								1
2	-	+								2
4	-	+								2
12, 28, 44, 60	-	+								2
5	-	-								3
13, 29, 45, 61	-	-								3
8	+	-	CY	CX	-	CY	-	-	-	4
16, 32, 48, 64	+	-	CY	CX	-	CY	-	-	-	4
11	+	-	CY	CX	-	CY	-	-	-	4
19, 35, 51, 67	+	-	CY	CX	-	CY	-	-	-	4
9	+	-	CY	CX	-	CY	-	+	-	5
17, 33, 49, 65	+	-	CY	CX	-	CY	-	+	-	5
7	+	-	CY	CX	-	CY	CY	+	+	6
15, 31, 47, 63	+	-	CY	CX	-	CY	CY	+	+	6
10	+	-	CY	CX	-	CY	+	-	-	7
18, 34, 50, 66	+	-	CY	CX	-	CY	+	-	-	7
6	+	+	CY	CX	+	CY	CX	-	-	8
14, 30, 46, 62	+	+	CY	CX	+	CY	CX	-	-	8
3	+	+	CX	+	+	CX	CX	-	-	9
20, 36, 52, 68	+	+	CX	+	+	CX	CX	-	-	9
21, 37, 53, 69	+	-	CX	+	-	CX	-	-	-	10
22, 38, 54, 70	+	+	+	-	+	-	CX	-	-	11
23, 39, 55, 71	+	-	+	-	-	+	+	-	-	12
25, 41, 57, 73	+	-	+	-	-	+	-	-	-	13
26, 42, 58, 74	+	-	+	-	-	-	+	-	-	14
24, 40, 56, 72	+	-	+	-	-	-	-	-	-	15
27, 43, 59, 75	+	-	+	-	-	-	-	-	-	15
Послідовність кроків	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Примітка: тут [S]₀ та [E]₀ – загальні (початкові) концентрації субстрату та ефектора відповідно,

“+” та “-” віддзеркалюють наявність та відсутність лінеаризації відповідно; CX – графік, паралельний осі X; CY – графік, паралельний осі Y.

РОЗДІЛ 7

МОДЕЛЮВАННЯ КІНЕТИКИ ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ, ЩО ВІДБУВАЮТЬСЯ З УЧАСТЮ АКТИВАТОРІВ (НА ПРИКЛАДІ ГІДРОЛІЗУ АТФ «БАЗАЛЬНОЮ» Mg^{2+} -АТФазою) *

Найважливішою фундаментальною проблемою ензимології є з'ясування механізму дії ензимів. А оскільки ензиматичні реакції, як правило, є багатокomпонентними й багатостадійними процесами, то встановлення їх механізму є доволі складним завданням. З цієї причини механізм дії переважної більшості ензимів залишається невідомим.

Для визначення механізмів ензиматичних реакцій використовують різні експериментальні й теоретичні методи. Одним з таких методів є математичне моделювання. Його застосовують при дослідженні складних процесів, коли необхідно враховувати велику кількість різноманітних взаємодій і зворотних зв'язків. Моделювання дозволяє теоретично досліджувати певний процес для того, щоб пояснити залежності, що спостерігаються в експериментах, та виявити невідомі особливості процесу, що протікає.

Нижче нами буде докладно досліджена модель ензиматичної реакції гідролізу АТФ так званою «базальною» Mg^{2+} -АТФазою, локалізованою на плазматичній мембрані клітин. Ця реакція може бути пов'язана з активним транспортом протонів, необхідним для підтримки протонного градієнту на мембрані [1].

Дослідження цієї реакції обумовлено двома причинами, що викликають зацікавленість.

* Частина результатів з представлених в розділі 7 була опублікована в статті:

Карахим С.А, Горчев В.Ф. Моделирование кинетики ферментативных реакций, протекающих с участием активаторов, на примере гидролиза АТФ Mg^{2+} -АТФ-азой // Укр. біохім. журн.– 2006.– Т. 78, № 1.– С. 149–162.

З одного боку дані експериментальних досліджень поки що не дозволяють надійно встановити механізм реакції, в чому можуть надати певну допомогу методи моделювання ензиматичних реакцій. З іншого боку теоретичний аналіз кінетичної схеми даної реакції є важливим сам по собі, оскільки подібна схема ще не була проаналізована в повному об'ємі. Крім того, запропонована кінетична схема (а отже і результати, отримані при її аналізі) може бути використана також для описання великої кількості інших ензиматичних реакцій, що протікають в присутності активаторів (зокрема, іонів металів).

У літературі прийнято вважати, що ензиматичні реакції, як правило, мають підпорядковуватись рівнянню Міхаеліса-Ментен, а якщо кінетика досліджуваної реакції не підпорядковується цьому рівнянню, то шукають ті чинники, які обумовлюють відмінність кінетичної кривої від рівнобічної гіперболи. Для цього розробляють і вивчають різні схеми можливих механізмів протікання реакції і використовують для пояснення одержаних результатів ті моделі, результати вивчення яких якісно (рідше – кількісно) збігаються з експериментальними. При цьому, як правило, в моделях враховують мінімальне число реактантів, тобто речовин, які можуть взаємодіяти один з одним. Зазвичай це ензим і субстрат, а також іноді ті речовини, які, як встановлено експериментально, впливають на хід реакції, наприклад: іони водню або металу (активатори), кофактори, інгібітори.

Проте часто такі моделі виявляються занадто складними для того, щоб знайти залежність швидкості реакції від концентрацій реагуючих речовин в аналітичному вигляді (особливо у випадках, коли концентрації виражені через загальні концентрації, що дозволяє проводити реальні розрахунки). Тому в таких випадках розглядають тільки окремі фрагменти загальної схеми, для яких можна знайти рішення і провести кінетичний аналіз.

Такий підхід виправданий, але він має певний недолік: повна модель враховує всі можливі взаємодії в системі, а розгляд лише окремих фрагментів моделі не дозволяє виявити, які механізми можуть призводити до схожих кінетичних залежностей. Тому, отримавши експериментальні дані, ми не можемо визначити, які

можливі механізми можуть призводити до таких результатів, а можемо тільки спиратися в своїх міркуваннях на один-два досліджених фрагмента загальної схеми.

З літератури відомо, що ензими можуть утворювати комплекси не тільки з субстратом, але і з активатором та інгібітором [2–5]. Відомо також, що субстрат може утворювати комплекси з активатором [2–6]. Тому кінетична схема ензиматичної реакції, в якій беруть участь ензим, активатор і субстрат, має обов'язково враховувати всі ці взаємодії, оскільки кожне з них змінює концентрацію вільних форм реагентів, що в кінцевому підсумку позначається на швидкості реакції і, відповідно, на вигляді кінетичних залежностей.

У загальному випадку, для кількісного опису реакції необхідно враховувати також і інші можливі взаємодії в системі, які можуть призводити до зміни вільних концентрацій реагуючих речовин, наприклад: взаємодія іонів водню з субстратом, ензимом (якщо можлива їх протонізація), вплив продукту реакції, вплив іонів, що входять до складу буферних розчинів, вплив іонів натрію і калію (якщо вони присутні в системі), вплив інших речовин, які додаються в реакційну систему і можуть взаємодіяти з іншими присутніми в системі речовинами.

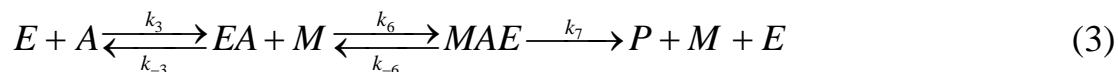
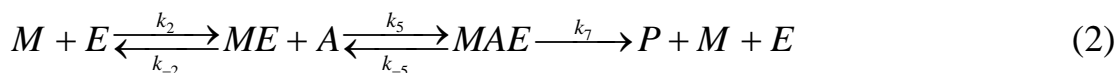
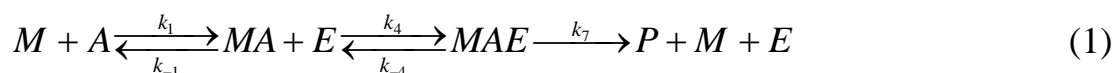
Для реакції гідролізу АТР «базальною» Mg^{2+} -АТРазою встановлено, що для її протікання необхідна присутність в розчині трьох компонентів – Mg^{2+} -АТРази, АТР та Mg^{2+} [7]. Таким чином, можна дійти висновку, що реакція гідролізу АТР протікає через утворення потрійного комплексу (ензим- Mg^{2+} -АТР). Проте, деталі механізму даної реакції до цього часу залишаються невідомими, зокрема, не до кінця зрозуміла роль Mg^{2+} в реакції, яка послідовність утворення потрійного комплексу, кількість та послідовність стадій, невідомо також більшість значень констант швидкості. З літератури відома константа рівноваги утворення комплексу Mg^{2+} -АТР. Вона складає приблизно $2 \cdot 10^4 M^{-1}$ [6, 8].

7.1. Узагальнений механізм гідролізу АТР

Для проведення теоретичного дослідження процесу гідролізу АТР нами була розроблена нелінійна динамічна модель кінетики ензиматичної реакції, всі стадії якої, крім останньої, є оборотними.

Оскільки, як було зазначено вище, механізм гідролізу АТР, що каталізується «базальною» Mg^{2+} -АТРазою до цього часу мало досліджений, ми припустили, що кожна з трьох речовин (Mg^{2+} , АТР та ензим) в початковий момент часу може утворювати комплекси попарно з іншими двома учасниками процесу. Стійкість цих комплексів визначається величинами їх констант рівноваги. Далі до утворених подвійних комплексів може приєднуватись третій компонент з утворенням потрійного комплексу (ензим– Mg^{2+} –АТР), який, у свою чергу, розпадається на продукт, ензим і Mg^{2+} . Такий підхід дозволяє врахувати всі можливі взаємодії у досліджуваній системі і, таким чином, уникнувши спрощень, отримати повну картину процесу.

Були розглянуті окремо та в цілому три можливі шляхи протікання реакції гідролізу АТР:



В схемі використані наступні позначення: M – магній; A – АТР; E – ензим Mg^{2+} -АТРаза; MA – комплекс Mg^{2+} -АТР; ME – комплекс Mg^{2+} -АТРаза; EA – комплекс АТР– Mg^{2+} -АТРаза; MAE – потрійний комплекс Mg^{2+} -АТР– Mg^{2+} -АТРаза; P – продукт. Розмірності констант швидкості: для прямих реакцій (крім k_7) – $M^{-1} \cdot xB^{-1}$; для всіх оборотних реакцій та прямої k_7 – xB^{-1} . У відповідності з розмірностями констант швидкості, розрахунок часу проводили в хвилинах.

Таким чином, узагальнений механізм враховує можливість протікання реакції одночасно по трьом шляхам, і, відповідно до схеми (1–3), включає 7 стадій. Математичною моделлю, що описує наведену вище схему реакції, є система з 8 диференціальних рівнянь, що описують зміну в часі концентрацій кожної з 8 сполук, що приймають участь в реакції:

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_1[M][A] + k_{-1}[MA] - k_2[M][E] + k_{-2}[ME] - k_3[M][EA] + k_{-3}[EA] + k_4[MAE] - k_{-4}[MAE] + k_5[MAE] - k_{-5}[MAE] + k_6[MAE] - k_{-6}[MAE] + k_7[MAE] \quad (4)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[M][A] + k_{-1}[MA] - k_3[A][E] + k_{-3}[EA] - k_5[A][ME] + k_{-5}[MAE] \quad (5)$$

$$\frac{d[MA]}{dt} = k_1[M][A] - k_{-1}[MA] - k_4[E][MA] + k_{-4}[MAE] \quad (6)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_2[M][E] + k_{-2}[ME] - k_3[E][A] + k_{-3}[EA] - k_4[E][MA] + k_{-4}[MAE] + k_7[MAE] \quad (7)$$

$$\frac{d[ME]}{dt} = k_2[M][E] - k_{-2}[ME] - k_5[ME][A] + k_{-5}[MAE] \quad (8)$$

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_3[A][E] - k_{-3}[EA] - k_6[M][EA] + k_{-6}[MAE] \quad (9)$$

$$\frac{d[MAE]}{dt} = k_4[E][MA] - k_{-4}[MAE] + k_5[A][ME] - k_{-5}[MAE] + k_6[M][EA] - k_{-6}[MAE] - k_7[MAE] \quad (10)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = -k_7[MAE] \quad (11)$$

Наведену систему рівнянь розв'язували чисельним методом, в результаті чого отримували залежності концентрацій всіх учасників реакції від часу. Залежності змін концентрації продукту реакції від часу використовували для розрахунку швидкості реакції.

Дослідження залежності швидкості реакції як від концентрації Mg^{2+} , так і від концентрації АТР, було проведене в межах, більш широких, ніж експериментальні умови, щоб можна було більш повно вивчити властивості моделі, що представлена схемою (1–3): концентрація ензиму – 10^{-9} – 10^{-7} М, концентрацію АТР і Mg^{2+} варіювали в основному в межах від 10^{-5} до 1 М (а в деяких випадках, коли було необхідно, верхню межу підвищували до 10^2 – 10^5 М). Інтервал концентрацій ензиму при дослідженнях залежностей початкової швидкості від його концентрації складав 10^{-7} – 10^3 М.

Ми вважали також, що на початку реакції концентрації подвійних комплексів, потрібного комплексу й продукту дорівнюють нулю. Константу швидкості прямої реакції k_1 в розрахунках в більшості випадків приймали рівною $2 \cdot 10^4$ М⁻¹·хв⁻¹, проте, враховуючи, що схема (1–3) може бути застосована також і для дослідження інших реакцій, окрім гідролізу АТР, для вивчення характерних особливостей моделі константа варіювалась в межах $1 - 10^7$ М⁻¹·хв⁻¹. Константи швидкості $k_2 - k_6$

змінювали в основному в межах від 1 до $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, а константу швидкості k_7 варіювали в межах від 1 до $1 \cdot 10^5 \text{ хв}^{-1}$. При цьому ми вважали, що відповідні константи швидкості зворотних реакцій дорівнюють 1 хв^{-1} (хоча іноді їх величини також змінювали).

Таким чином, застосований нами підхід дозволяє в певному наближенні, але в повному обсязі, проаналізувати кінетику реакції гідролізу АТР Mg^{2+} -АТРазою, що представлена схемою (1–3), в межах величин концентрацій реагуючих речовин та величин констант швидкості, що наведені в попередньому абзаці, уникнувши будь-яких додаткових спрощень.

Сама ж кінетична схема містить кілька загальноприйнятих спрощень: в результаті протікання реакції по кожному з трьох можливих шляхів утворюються потрібні комплекси, які розпадаються на продукти з однаковою швидкістю і розпад яких представлений як необоротна реакція, а також не врахована можливість утворення комплексів продукту з іншими учасниками реакції. Проте, оскільки нами досліджувалась в основному тільки початкова швидкість реакції (крім випадків, коли вивчали залежності початкової швидкості від концентрації ензиму), коли концентрація продукту була незначною, вказані спрощення не мали вносити значних похибок у розрахунки. Зазначимо також, що нас цікавила передусім форма отримуваних залежностей, а не точне значення початкових швидкостей.

Представлена кінетична схема може бути використана при дослідженні різних ензиматичних реакцій, де поряд з субстратом приймають участь іони металів або інші речовини, здатні утворювати комплекси з іншими учасниками ензиматичної реакції. Тому отримані в нашому дослідженні результати можуть бути в повній мірі віднесені й до таких реакцій.

Коротко розглянемо, наскільки досліджений механізм реакції, що представлений схемою (1–3).

1. Схема процесу, коли реакція має три можливих шляхи для протікання, розглядалась раніше в літературі, наприклад в книгах М. Діксона й Е. Вебба [4] та Л. Вебба [3]. Проте, як відмічають автори [4], в стаціонарному наближенні не вдається отримати рівняння для швидкості такої реакції у вигляді, придатному для аналізу

експериментальних даних. В рівноважному наближенні отримане рівняння для швидкості реакції, але тільки для вільних концентрацій металу й субстрату, що не дозволяє практично використовувати це рівняння [4]. Тому дослідники обмежуються розглядом деяких окремих випадків досліджуваного процесу.

2. Реакція протікає двома шляхами – 2 і 3. Таке суттєве спрощення схеми реакції все одно не дозволяє отримати в стаціонарному наближенні рівняння для швидкості реакції у вигляді, придатному для практичного використання [3, 9]. В літературі наводиться тільки рівняння, отримане в рівноважному наближенні, виражене для вільних концентрацій металу й субстрату [3]. При постійній концентрації одного з них залежність швидкості від концентрації іншого виражається кривою, що належить до того ж типу, що й крива Міхаеліса-Ментен.

3. Реакція протікає лише по одному шляху 1. В цьому варіанті вважається, що істинним субстратом реакції є комплекс активатор-субстрат. При дослідженні цієї схеми в рівноважному наближенні отримане рівняння для швидкості реакції, виражене через загальні концентрації субстрату і металу. При цьому це рівняння отримане з використанням додаткових спрощень – в загальних концентраціях активатора і субстрату не враховується їх вміст в складі потрібного комплексу. Навіть при цьому рівняння виходить складним, воно містить квадратні корені, тому його не вдається перетворити таким чином, щоб знайти з експериментальних даних константи Міхаеліса [4]. В цілому ж рівняння для швидкості реакції описує гіперболічну залежність початкової швидкості від концентрації субстрату (при постійній концентрації металу) та від концентрації металу (при незмінній концентрації субстрату).

4. Реакція протікає лише по одному шляху 2. Для цієї схеми в рівноважному наближенні отримане рівняння для швидкості реакції, виражене через концентрації вільних субстрату й активатора [2].

5. Реакція протікає по шляху 1 з одночасним утворенням неактивного (який не може в подальшому перетворюватись) комплексу *ME*. В рівноважному наближенні для цього випадку отримане рівняння для швидкості реакції, виражене через загальні концентрації субстрату й активатора [4]. В сумарних концентраціях

активатора і субстрату не враховували їх вміст у складі потрійного комплексу, а також не враховували вміст активатора в комплексі з ензимом. Рівняння виходить більш складним, ніж у попередньому випадку, і на відміну від рівняння, що описує протікання реакції тільки по шляху 1, вказує на існування конкурентного інгібування, де інгібітором виступає активатор. Інгібування проявляється в тому, що при зростанні концентрації металу початкова швидкість реакції спочатку зростає, досягаючи максимуму, а потім починає знижуватись [4].

6. Реакція протікає по шляху 1 з одночасним утворенням неактивного комплексу EA . Для цього випадку в рівноважному наближенні також отримане рівняння для швидкості реакції, виражене через загальні концентрації субстрату і активатора [4]. Тут також в сумарних концентраціях активатора й субстрату не враховували їх вміст в складі потрійного комплексу, а також не враховували вміст субстрату, зв'язаного у комплексі з ензимом. По виду рівняння виходить аналогічним попередньому, і також вказує на існування конкурентного інгібування – в цьому випадку інгібітором виступає субстрат (гальмування субстратом типу Γ за класифікацією Л. Вебба [3]). Тут також залежність початкової швидкості проходить через максимум, але при збільшенні концентрації субстрату [4, 9]. Таким чином, в останніх двох випадках поведінка системи не підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен.

7. Реакція протікає по шляху 2 з одночасним утворенням неактивного комплексу MA . В рівноважному наближенні отримане рівняння для швидкості реакції, виражене через загальні концентрації ензиму, субстрату й активатора [3]. При цьому в загальній концентрації субстрату враховували тільки вільний і зв'язаний з активатором субстрат, а в загальній концентрації активатора – вільний та зв'язаний з субстратом метал. Отримане наближене рівняння для швидкості реакції містить квадратичні члени, але його аналіз показує, що при певних умовах швидкість може зменшуватись при високих концентраціях субстрату [2-3] (інгібування субстратом типу B за класифікацією Л. Вебба [3]).

8. Реакція проходить по шляхам 2 і 3 з додатковим утворенням комплексу MA . В рівноважному наближенні отримане рівняння для швидкості реакції, виражене

через загальну концентрацію активатора (в ній враховували тільки вільні та зв'язані з субстратом іони металу) і вільну концентрацію субстрату [3]. Аналіз такого рівняння показав, що при певних умовах спостерігається зменшення швидкості при високих концентраціях субстрату [3].

Додатково підкреслимо, що рівняння, отримані в рівноважному наближенні та виражені через концентрації вільних активатора й субстрату, у всіх перерахованих випадках відносяться до типу рівняння Міхаеліса-Ментен. Також характерною рисою всіх восьми розглянутих вище моделей є те, що швидкість реакції прямо пропорційна концентрації ензима.

Як видно з викладеного вище, в літературі проаналізовано всього 8 з 19 можливих механізмів протікання реакції гідролізу, які узагальнюються схемою (1–3). В табл. 1 наведені всі 19 парціальних механізмів. В цій же таблиці також показано, які залежності початкової швидкості від загальної концентрації субстрату, активатора й ензиму можуть спостерігатись при реалізації конкретного парціального механізму.

7.2. Умови дослідження моделі ензиматичного гідролізу АТР

Встановлення виду кінетичних залежностей, що наведені в табл. 1, вимагає проведення досліджень в широкому діапазоні концентрацій реагентів. При цьому досить часто важко розрахувати початкову швидкість реакції з залежностей концентрації продукту від часу, внаслідок того, що вони або не є лінійними, або не проходять через початок системи координат. Наприклад, якщо досліджувана реакція відбувається у відповідності до механізму 12 (табл. 1) з константами швидкості $k_3 = k_6 = 1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 100 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$; $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_7 = 30 \text{ хв}^{-1}$, то одержані залежності концентрації продукту від часу для різних концентрацій активатора та при незмінних концентраціях ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ та субстрату $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, можуть бути такими, як показано на рис. 1. По цим даним вкрай важко розрахувати початкові швидкості майже для всіх кінетичних кривих, незважаючи на те, що концентрація ензиму як мінімум у 100 разів менша за концентрацію активатора і в 300 тисяч разів менша за концентрацію субстрату.

Таблиця 1. Вид залежності початкової швидкості v_0 від загальної концентрації субстрату – $[A]_0$, активатора – $[M]_0$ та ензиму – $[E]_0$ для різних можливих (парціальних) механізмів реакції гідролізу АТФ у відповідності зі схемою (1–3)

№	Схема можливого механізму реакції	Вид залежності: *		
		$v_0 - [A]_0$	$v_0 - [M]_0$	$v_0 - [E]_0$
1	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	ММ	ММ	ММ
2	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	ММ	ММ	ММ
3	$E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	ММ	ММ	ММ
4	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME$	ММ	∩	∩
5	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA$	∩	ММ	∩
6	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME; E + A \leftrightarrow EA$	∩	∩	∩
7	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + A \leftrightarrow MA$	∩	∩	ММ
8	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA$	∩	ММ	∩
9	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + A \leftrightarrow MA; E + A \leftrightarrow EA$	∩	∩	∩
10	$E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + A \leftrightarrow MA$	∩	∩	ММ
11	$E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME$	ММ	∩	∩
12	$E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + A \leftrightarrow MA; M + E \leftrightarrow ME$	∩	∩	∩
13	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	ММ / М∩	∩	ММ / М∩
14	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA$	∩	∩	∩
15	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	∩	ММ / М∩	ММ / М∩
16	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME$	∩	∩	∩
17	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	ММ / М∩	ММ / М∩	∩
18	$M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + A \leftrightarrow MA$	∩	∩	∩
19	$M + A \leftrightarrow MA + E \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $M + E \leftrightarrow ME + A \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$ $E + A \leftrightarrow EA + M \leftrightarrow MAE \rightarrow P + E + M$	∩	∩	∩

Примітка: ММ – означає, що зі зростанням концентрації реагента швидкість зростає, досягаючи граничного значення, як в моделі Міхаеліса-Ментен;

∩ – зі збільшенням концентрації реактанту швидкість спочатку зростає, проходить через максимум та знижується практично необмежено;

М∩ – зі збільшенням концентрації реактанту швидкість спочатку зростає, досягаючи максимуму, після чого знижується до певного платового рівня.

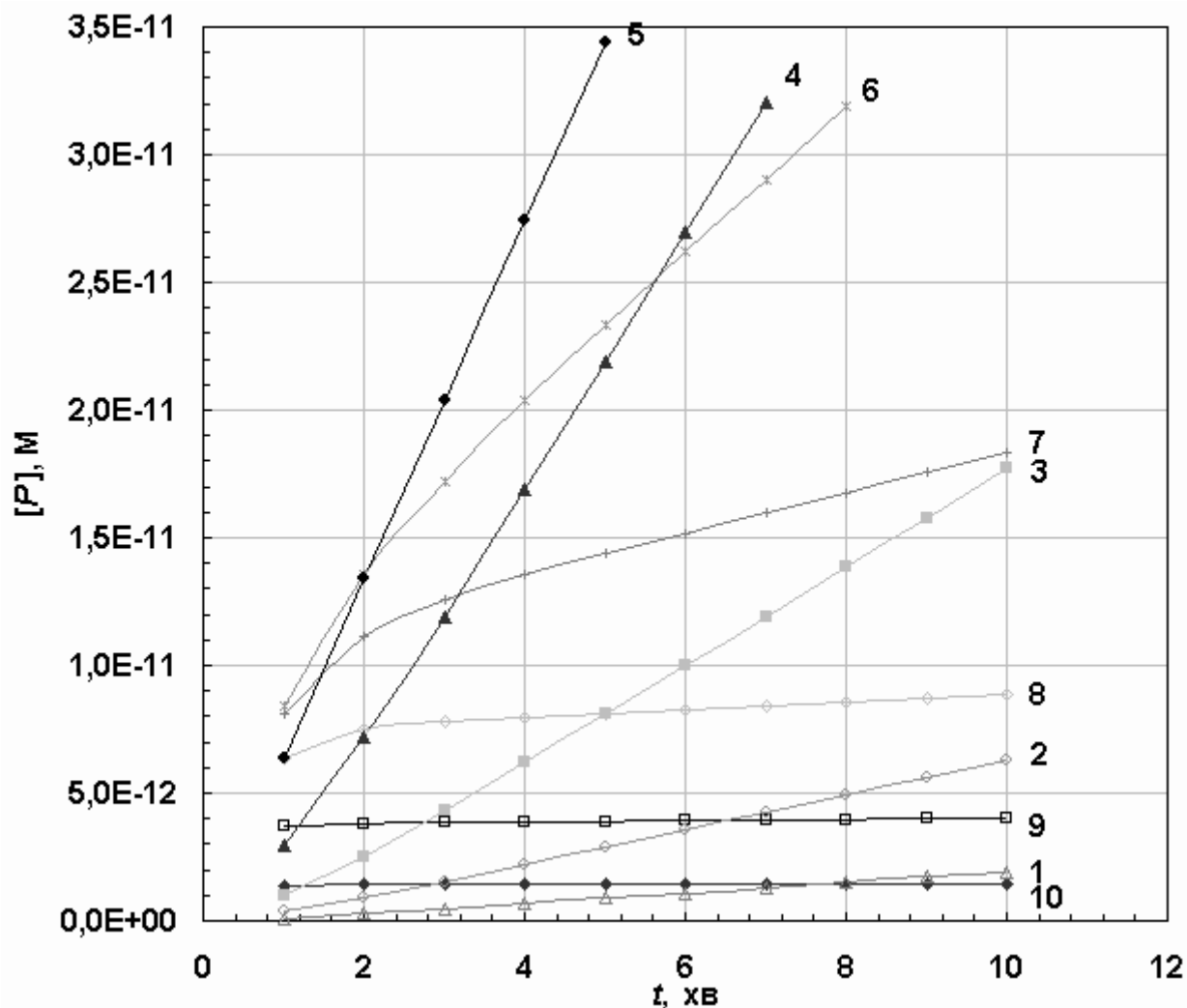


Рис. 1. Залежності концентрації продукту $[P]$ від часу t для реакції з константами швидкості $k_1 = k_2 = 100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_3 = k_6 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_7 = 30 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, що відбувається у відповідності з механізмом 12 (табл. 1) при постійних концентраціях ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ і субстрату $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, та при різних концентраціях активатора $[M]_0$ (M): 1 – 0,0003; 2 – 0,001; 3 – 0,003; 4 – 0,01; 5 – 0,03; 6 – 0,1; 7 – 0,3; 8 – 1; 9 – 3; 10 – 10.

Крім того, при дослідженнях реакцій в умовах варіювання концентрації ензиму у широкому діапазоні також доводиться виходити за ту межу, до якої спостерігається лінійність концентрації продукту реакції від часу.

Проте, нам важливо визначити, як виглядають залежності початкової швидкості від концентрацій субстрату, активатора та ензиму, а в такому випадку точне значення початкової швидкості не має суттєвого значення. В якості початкової швидкості може бути використана концентрація продукту, що утворився

за 1 хв. часу. Можна обрати інший час інкубації, але він має бути однаковим для всіх вимірювань і охоплювати початковий етап реакції (бажано, щоб ступінь перетворення субстрату складала не більше 10–15 %). На рис. 2 показано, що час інкубації не впливає на вигляд залежності початкової швидкості від концентрації активатора (швидкість проходить через максимум при зростанні концентрації активатора), хоча форма залежності, її амплітуда та концентрація активатора, при якій досягається максимальне значення швидкості, дещо відрізняються.

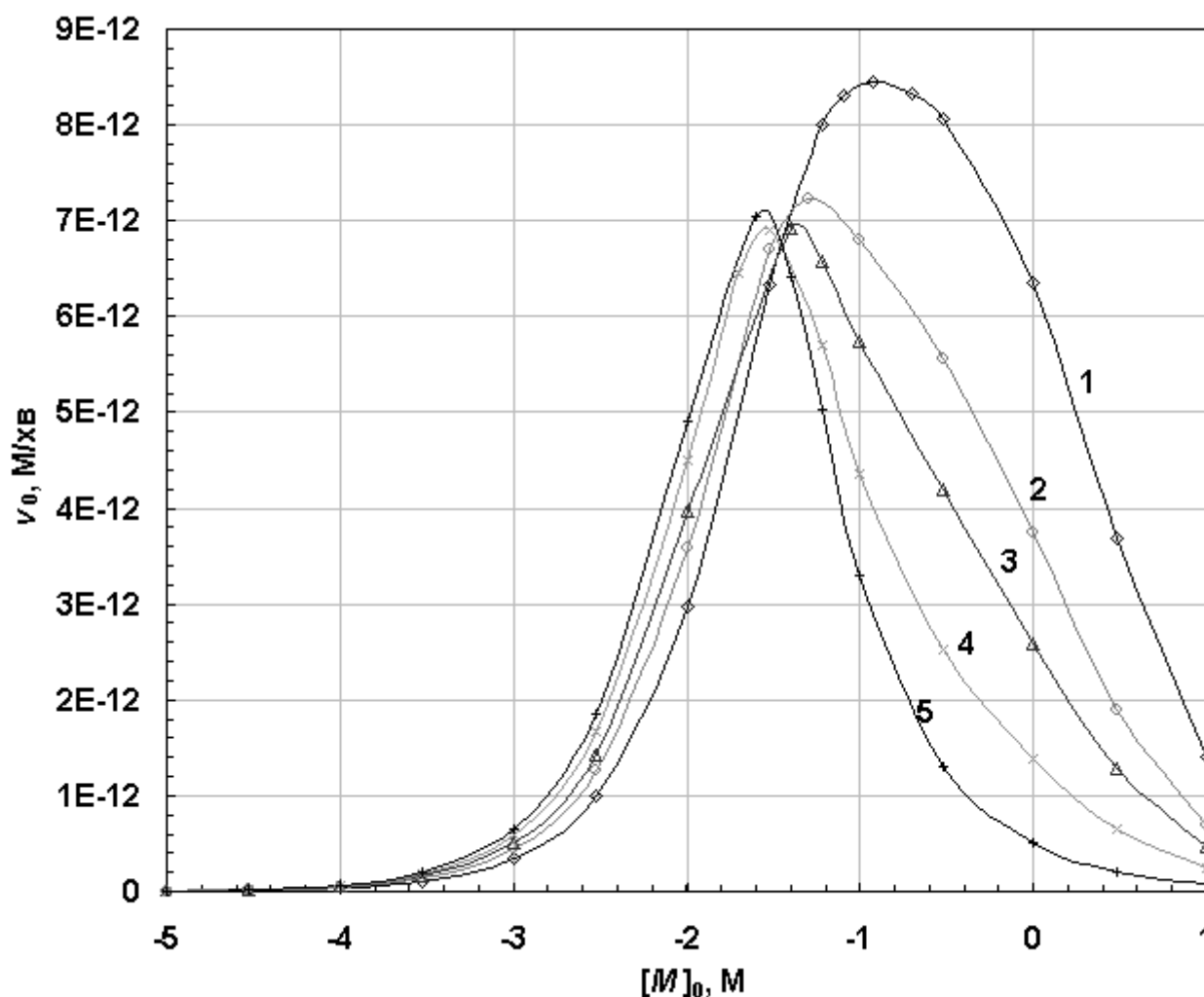


Рис. 2. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (в напівлогарифмічних координатах) для реакції з константами швидкості $k_3 = k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_7 = 30 \text{ хв}^{-1}$, що відбувається у відповідності з механізмом 12 (табл. 1) при постійних концентраціях ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ і субстрату $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, та при різній тривалості інкубації t : 1 – 1; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 6; 5 – 20 хв.

В нашому дослідженні час інкубації становить 3 хв., а початкова швидкість розраховується, як концентрація продукту, що утворився за 3 хв., та розділена на 3 (тобто, на час інкубації) у відповідності з рівнянням $v_0 = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$.

7.3. Утворення максимумів

Теорія ензиматичних реакцій базується на положенні про те, що швидкість реакції пропорційна концентрації ензиму [10]. Проте, при експериментальних дослідженнях іноді спостерігають відхилення від лінійності, причому в деяких складних ензимних системах виявлені максимуми на графіках залежності швидкості реакції від концентрації ензиму [9]. Тому, хоча експериментаторам і не рекомендується проводити ензиматичні реакції при високих концентраціях ензиму, ми проаналізували, як буде змінюватись початкова швидкість реакції зі збільшенням концентрації ензиму для всіх можливих механізмів (табл. 1).

Як видно з табл. 1, якщо реакція гідролізу протікає тільки по одному з шляхів (1, 2 або 3), кінетика процесу підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен, чого й слід було чекати, оскільки збільшення кількості послідовних стадій в моделі Міхаеліса-Ментен не приводить до зміни вигляду кінетичних залежностей [10].

Проте поява додаткових стадій, пов'язаних з протіканням паралельних реакцій, приводить до суттєвого ускладнення кінетики процесу. В таких випадках, як правило, спостерігаються різноманітні ефекти гальмування, коли початкова швидкість реакції починає різко зменшуватись при високих концентраціях реагентів. Причому, зниження швидкості спостерігається не тільки при зростанні концентрації активатора або субстрату, але навіть ензиму. Тепер вже реалізація кінетики Міхаеліса-Ментен стає швидше виключенням, ніж правилом.

Таким чином, залучення додаткових стадій або додаткових шляхів для протікання реакції (паралельних реакцій), приводить до того, що кінетика процесу якісно змінюється – з'являються максимуми на залежностях швидкості від концентрації реагентів, що не було властивим ні для «основного», ні для

«додаткового» шляху взятими окремо. Така кінетика не підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен.

Максимуми утворюються внаслідок зменшення швидкості реакції після досягнення максимального рівня, що відбувається, коли концентрація одного з компонентів реакції (концентрацію якого змінюють в процесі досліджень, на противагу двом іншим компонентам, концентрації яких підтримують незмінними) починає перевищувати концентрації інших двох учасників, в результаті чого вони виявляються практично повністю зв'язаними в подвійні комплекси з першим компонентом. При цьому концентрація незв'язаних форм останніх двох учасників реакції виявляється настільки незначною, що не може забезпечити високої швидкості протікання реакції, незважаючи на високу концентрацію незв'язаної форми першого компонента, що призводить до того, що швидкість реакції починає зменшуватись.

В залежності від співвідношення констант швидкості та значень концентрацій речовин, що приймають участь у реакції, максимуми можуть бути як симетричними, так і не симетричними, можуть бути широкими, але можуть бути й досить вузькими. Ці визначення відносяться до графіків, представлених в напівлогарифмічних координатах, де по осі ординат відкладені значення початкової швидкості, а по осі абсцис – загальної концентрації певного реагенту (субстрату, ензиму, активатора) в логарифмічному масштабі. Побудова графіка в таких координатах дозволяє в повній мірі уявити собі форму кривої, оскільки досліджувана залежність охоплює досить широкий інтервал концентрацій реагенту.

Приклади широких й симетричних (дзвоноподібних) максимумів наведені на рис. 3. Вершини можуть бути пласкими у більшій (крива 4) чи меншій мірі (криві 1–3), і при цьому максимальне значення початкової швидкості може бути близьким до величини $k_7[E]_0$ (криві 3–4), а може бути значно нижчим (криві 1–2). З рис. 3 також видно, що пласка ділянка на вершині максимуму може бути такою невеликою, що при цьому він виглядає майже гострим піком (крива 5). Симетричність максимумів також часто порушується (крива 5), хоча інколи це важко помітити (наприклад, крива 3).

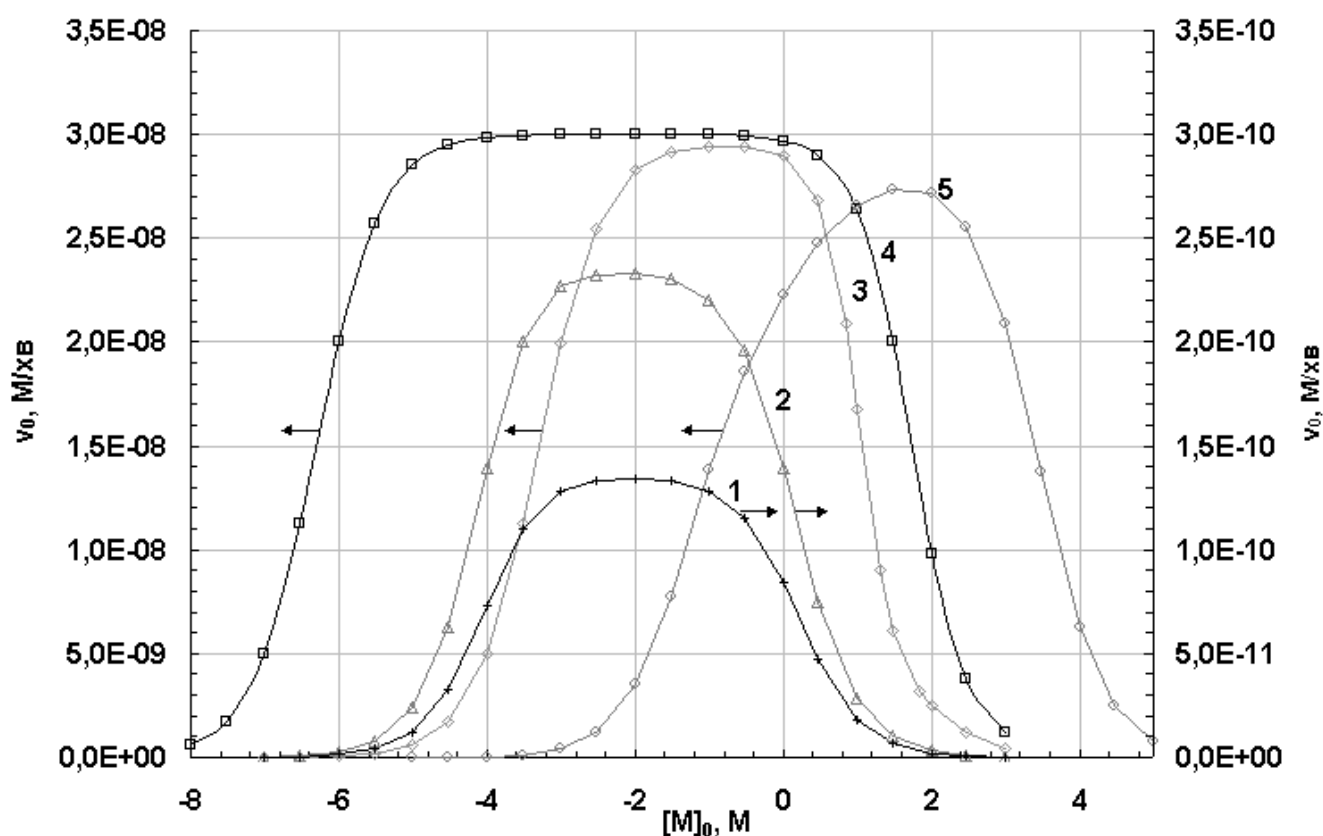


Рис. 3. Дзвоноподібні залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (у логарифмічному масштабі) для реакцій, що протікають по різним механізмам:

1 – механізм 4 ($k_2 = k_4 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

2 – механізм 18 ($k_2 = k_6 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_3 = k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

3 – механізм 12 ($k_3 = k_6 = 9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

4 – механізм 13 ($k_1 = k_2 = 3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = k_5 = 9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = k_{-5} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

5 – механізм 6 ($k_3 = 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

Проте можуть зустрічатись максимуми з яскраво вираженими порушеннями симетрії (рис. 4). При цьому можливі випадки, коли при збільшенні концентрації реактанту початкова швидкість зростає повільніше, ніж спадає (криві 4–6), і навпаки – вона може зростати набагато швидше, ніж спадати (криві 1–3). Необхідно пам'ятати, що в даному випадку мова йде лише про ту частину графіка, що характеризується найвищими початковими швидкостями.

Зазвичай на графіках, що зображують залежність з максимумом, видно лише точки, що мають числове значення, яке в 20–30 разів менше за максимальне. Всі інші точки, що мають ще менші значення, розташовуються практично на осі абсцис, що не дозволяє побачити хід кривої на цих ділянках. Наприклад, для кривої 6 (рис. 4) на пологому схилі при збільшенні концентрації активатора в 3 рази (з 0,1 до 0,3 мМ) швидкість зростає в 1,55 разів, на крутому схилі при збільшенні концентрації активатора в 3 рази (з 10 до 30 мМ) швидкість зменшується в 8,88 рази, в той час як при віддаленні від максимуму ця диспропорція зникає. Так, при збільшенні концентрації активатора в 3 рази в діапазоні від 10 до 30 нМ швидкість зростає в 3 рази, а в діапазоні від 10 до 30 М – зменшується в 3 рази (в цих умовах швидкість має величину порядку 10^{-12} , що на 4 порядки менше, ніж у максимумі). Тому в умовах, коли швидкість має величину меншу, ніж 10^{-12} , швидкість її наростання та спадання однакова, що свідчить про те, що в цих умовах спостерігається симетрія, тобто, основа піка симетрична, проте цього не видно на графіку внаслідок суттєво менших значень швидкості по відношенню до її максимальної величини.

Можна також побачити, що швидкість може зростати досить стрімко (крива 2 по відношенню до кривої 1), а може й доволі повільно (крива 3 по відношенню до кривої 1). Так само й падіння швидкості може відбуватись достатньо швидко (криві 4 і 5), а може проходити й відносно повільно (крива 6). Можна також побачити, що праве плече кривої 5 складається практично з двох прямолінійних ділянок.

Графік, показаний на рис 4 (крива 6), вельми схожий на залежність активності моноамінооксидази від рН [9] або на залежність швидкості гідролізу монофенілфосфату лужною фосфатазою [10].

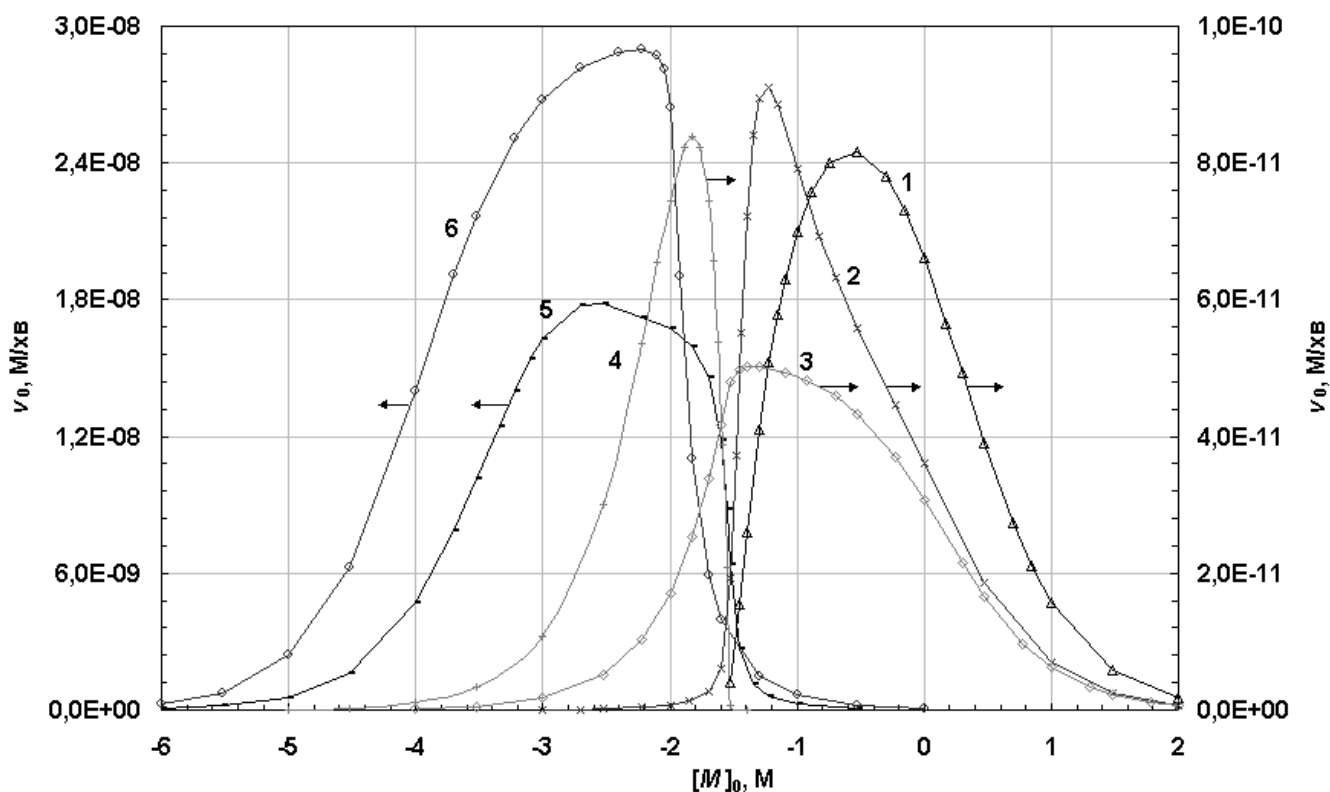


Рис. 4. Несимметричні залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (в логарифмічному масштабі) для різних реакцій, що відбуваються у відповідності з наступними механізмами:

1 – механізм 10 ($k_1 = k_3 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$);

2 – механізм 16 ($k_1 = k_3 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_2 = 96 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

3 – механізм 4 ($k_2 = k_4 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 2,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$);

4 – механізм 13 ($k_1 = k_2 = 9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = k_{-5} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

5 – механізм 6 ($k_2 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_4 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

6 – механізм 13 ($k_2 = k_4 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_5 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 10 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = k_{-5} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$).

При проведенні розрахунків для реакцій, що відбуваються за механізмами, які включають одночасно два шляхи протікання реакції (механізми 13–18 в табл. 1), дотримувались умов, за яких величини констант швидкості стадій 1–3 пов’язані з величинами констант швидкості стадій 4–6 через коефіцієнт α (α – коефіцієнт, з допомогою якого враховують вплив активатора на зв’язування субстрату або вплив субстрату на зв’язування активатора [3, 11, 12]). Наприклад, для механізму 13 (табл. 1) це співвідношення має вигляд: $\alpha = \frac{k_5 k_{-1}}{k_{-5} k_1} = \frac{k_4 k_{-2}}{k_{-4} k_2}$.

В деяких випадках піки можуть бути досить вузькими й гострими. Приклад такого симетричного й вузького піку наведено на рис. 5 (крива 3). Пік такого вигляду був отриманий нами для випадку, коли реакція протікає по шляху 2 з одночасним утворенням неактивного комплексу *MA* (механізм 7 в табл. 1). Гострі піки також можуть бути набагато ширшими, як, наприклад, крива 4.

Проте бувають такі умови, коли утворюються неймовірно вузькі піки, як у випадку реакції, що відбувається у відповідності з механізмом 6 (крива 2). При зростанні концентрації субстрату всього в 2 рази (приблизно з 0,02 до 0,04 М) швидкість реакції встигає зрости в 80 разів і зменшитись практично до попереднього рівня. Для порівняння, у випадку реакції 14 (крива 1), швидкість також стрімко наростає при збільшенні концентрації субстрату в районі 0,1 М, проте щоб вона досягла попереднього рівня концентрація субстрату має зрости більш ніж в 1000 разів.

З табл. 1 видно, що для більшості можливих (парціальних) механізмів ензиматичної реакції, що може відбуватись за схемою (1–3), спостерігаються максимуми швидкості не тільки в залежності від концентрацій субстрату й активатора, але також і ензиму.

Зазвичай рівняння початкової швидкості, що виводять в умовах, коли концентрації субстрату й ефектора (активатора) значно перевищують концентрацію ензиму, демонструють лінійну залежність початкової швидкості від концентрації ензиму. Наприклад, для реакцій, що відбуваються у відповідності з механізмом 2, рівняння початкової швидкості має наступний вигляд:

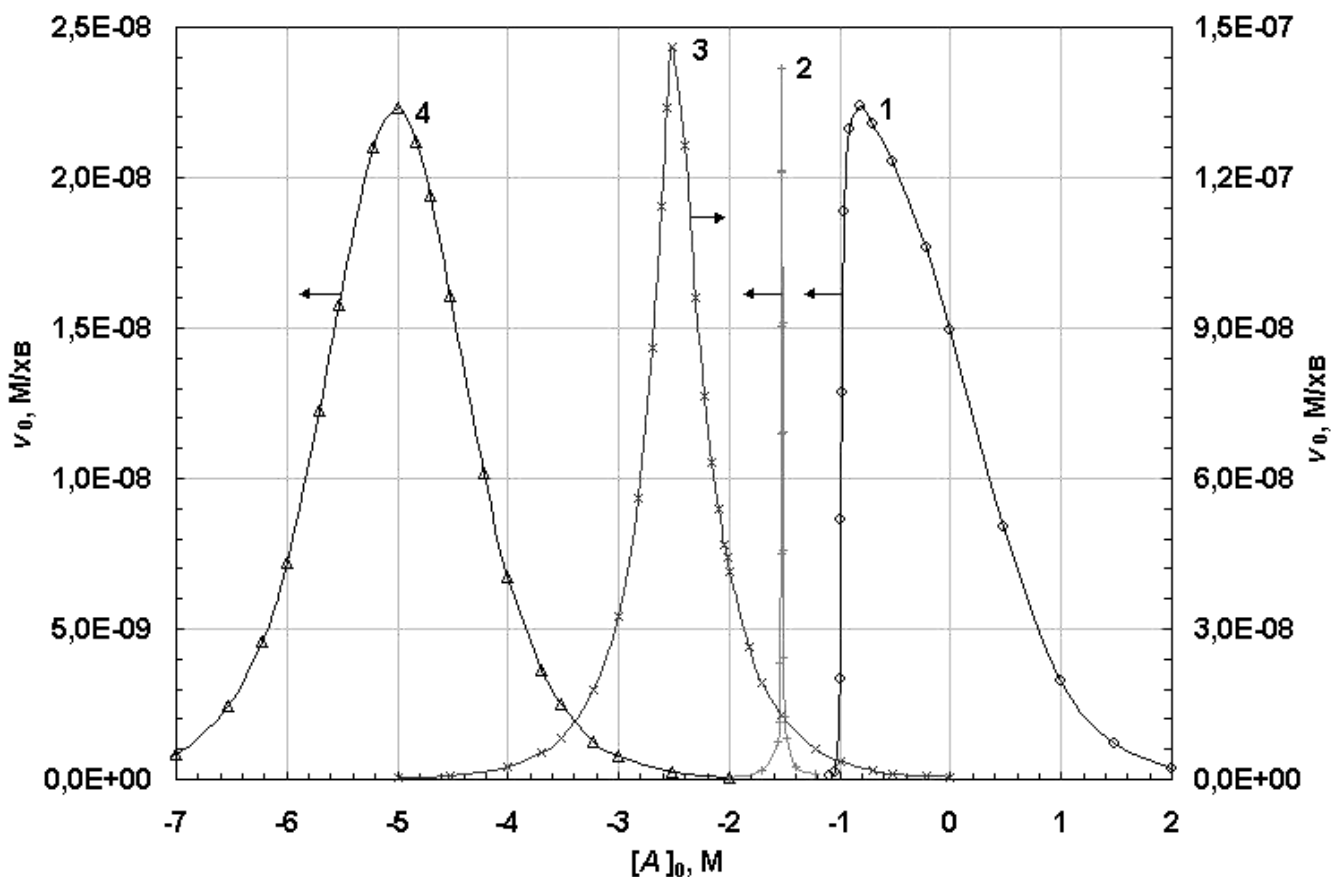


Рис. 5. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації субстрату $[A]_0$ (в логарифмічному масштабі), які мають вигляд гострих піків, для чотирьох реакцій, що протікають по різним механізмам:

1 – механізм 14 ($k_1 = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_2 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-5} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = 10 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, $[E]_0 = 4 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

2 – механізм 6 ($k_1 = k_2 = k_3 = 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$);

3 – механізм 7 ($k_1 = k_2 = k_5 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-5} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$);

4 – механізм 9 ($k_3 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 8 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$).

$$v_0 = \frac{k_7[E]_0[A]_0}{[A]_0 \left(1 + \frac{k_7}{k_2[M]_0}\right) + \left(\frac{k_{-5} + k_7}{k_5}\right) \left(1 + \frac{k_{-2}}{k_2[M]_0}\right)} = \frac{\frac{k_7 k_2 [E]_0 [M]_0}{k_2 [M]_0 + k_7} [A]_0}{[A]_0 + \left(\frac{k_2 [M]_0 + k_{-2}}{k_2 [M]_0 + k_7}\right) \left(\frac{k_{-5} + k_7}{k_5}\right)} \quad (12)$$

Проте, це рівняння не можна використовувати для аналізу результатів, отриманих при високих концентраціях ензиму, оскільки в такому випадку доводиться виходити за межі умов, які були прийняті при виведенні рівняння. Для реакцій, що протікають за механізмом 2, можна вивести рівняння початкової швидкості в умовах, коли $[A]_0 \gg [E]_0$ і $[M]_0 \ll [E]_0$ (позначивши $K_m = \frac{k_{-5} + k_7}{k_5}$):

$$v_0 = \frac{k_7[E]_0[A]_0}{[A]_0 \left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{k_7}{k_2[M]_0}\right) + K_m \left(\frac{[E]_0}{[M]_0} + \frac{k_{-2}}{k_2[M]_0}\right)} = \frac{\frac{k_7[A]_0[M]_0}{[A]_0 + K_m} [E]_0}{[E]_0 + \frac{k_7[A]_0 + k_{-2}K_m}{k_2([A]_0 + K_m)}} \quad (13)$$

З даного рівняння видно, що залежність початкової швидкості від концентрації ензиму є гіперболічною – при низьких концентраціях швидкість зростає пропорційно концентрації ензиму, а при високих – досягає граничного максимального значення. Графік в напівлогарифмічних координатах має S-подібний вигляд, характерний для моделі Міхаеліса-Ментен. Залежності, що мають такий вигляд спостерігаються в тих випадках, коли реакція протікає у відповідності з механізмами 1–3 (табл. 1).

В більш складних механізмах залежності типу Міхаеліса-Ментен також зустрічаються (див. табл. 1). Для прикладу наведемо залежності початкової швидкості від концентрації ензиму для механізмів 7 (рис. 6, крива 4) та 10 (рис. 6, крива 1). Відмітимо, що форма останньої кривої відрізняється від S-подібної тим, що зростання швидкості до граничного значення проходить ступінчато, проте видно, що значення граничної швидкості наближається до величини, що визначається рівнянням $k_7[M]_0$, як це і має бути у відповідності до рівняння (13) у випадку коли $[A]_0 \gg K_m$.

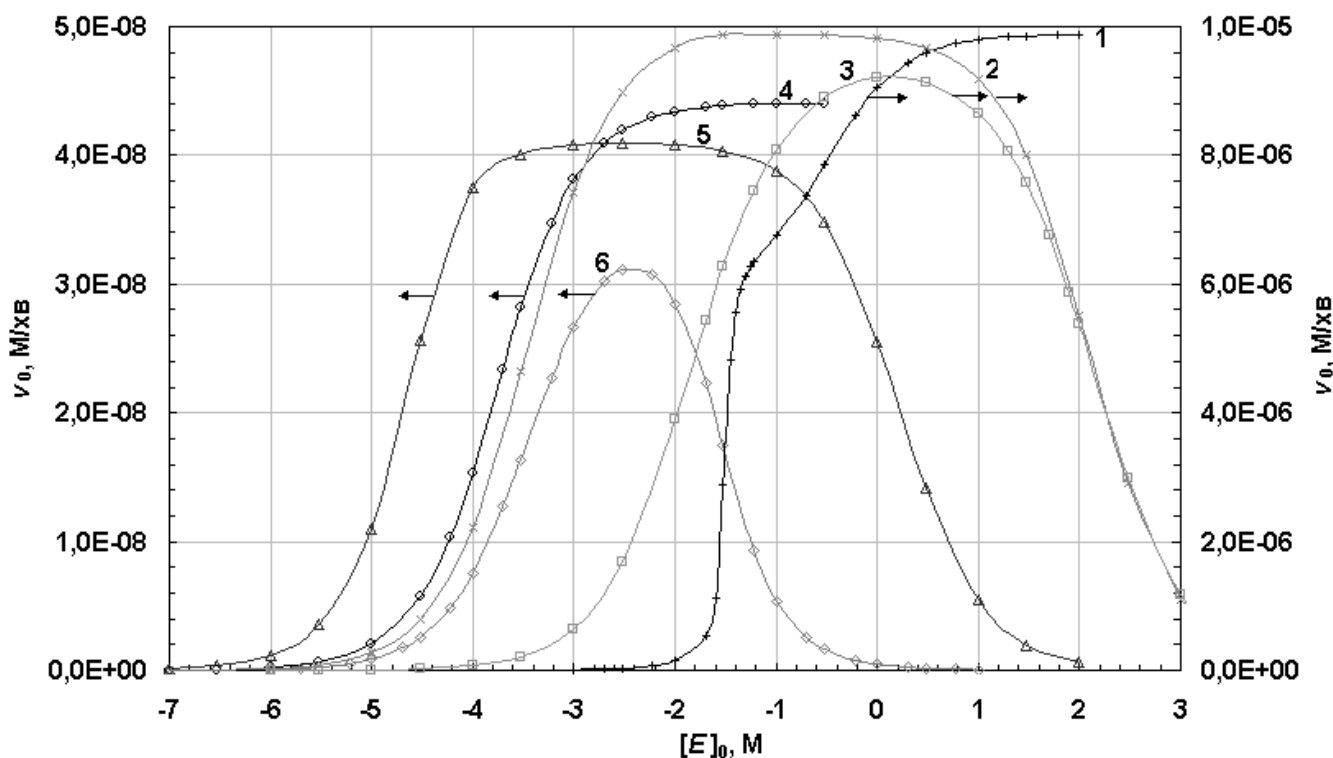


Рис. 6. S-подібна та дзвоноподібна форми залежностей початкової швидкості v_0 від концентрації ензиму $[E]_0$ (в логарифмічному масштабі) при незмінних концентраціях субстрату й активатора, для різних реакцій, що відбуваються у відповідності з наступними механізмами:

1 – механізм 10 ($k_3 = k_6 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 2 \text{ хв}^{-1}$,
 $k_{-1} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$);

2 – механізм 12 ($k_3 = k_6 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 2 \text{ хв}^{-1}$,
 $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$);

3 – механізм 11 ($k_6 = 9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_2 = k_3 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$,
 $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$);

4 – механізм 7 ($k_2 = 9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 10 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-5} = 1 \text{ хв}^{-1}$,
 $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[M]_0 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$);

5 – механізм 12 ($k_2 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_3 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$,
 $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$);

6 – механізм 17 ($k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_3 = k_6 = 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ хв}^{-1}$,
 $k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$).

На рис. 6 наведені також залежності початкової швидкості від концентрації ензиму, які утворюють широкі майже симетричні максимуми. Вершини можуть бути пласкими (криві 2, 5) або округлими (криві 3, 6). При цьому значення початкової швидкості у максимумі може бути близьким до величини $k_7[M]_0$ (криві 2, 3), а може бути значно нижчим (криві 5, 6). Максимуми можуть бути також широкими й несиметричними (рис. 7, криві 3–6).

Часто зустрічаються гострі піки (рис. 7, криві 1, 2, 4, 5, 7), які також можуть бути широкими (криві 1, 2), вузькими (криві 4, 5, 7), симетричними (криві 1, 7) та несиметричними (криві 4, 5). Зустрічаються залежності зі стрімким зростанням (крива 4) або падінням (крива 5) швидкості при збільшенні концентрації ензиму.

Таких залежностей швидкості від концентрації ензиму не передбачає жодне з рівнянь початкової швидкості, що розглядаються в літературі.

Як показують наші розрахунки, при високих концентраціях ензиму справді відбувається зниження швидкості реакції – це не уявний ефект. Він не пов'язаний з тим, що залежності концентрації продукту від часу часто не виходять лінійними й доводиться початкову швидкість визначати за рівнянням $v_0 = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$, а не за тангенсом кута нахилу відповідних прямих.

Наприклад, крива 2 на рис. 7 побудована за початковою швидкістю, розрахованою за тангенсом кута нахилу залежностей концентрації продукту реакції від часу, оскільки нами були підібрані такі константи швидкості, при яких концентрація продукту змінювалась лінійно з часом у всьому інтервалі концентрацій ензиму, в якому проводились розрахунки (див. рис. 8).

Зниження швидкості, яке спостерігається при високих концентраціях ензиму, відбувається тому, що, як було сказано раніше, ензим при високих концентраціях зв'язує практично весь субстрат та/або активатор, які необхідні для реалізації каталітичного шляху, тому навіть велика кількість вільного ензиму не може забезпечити високої швидкості протікання реакції.

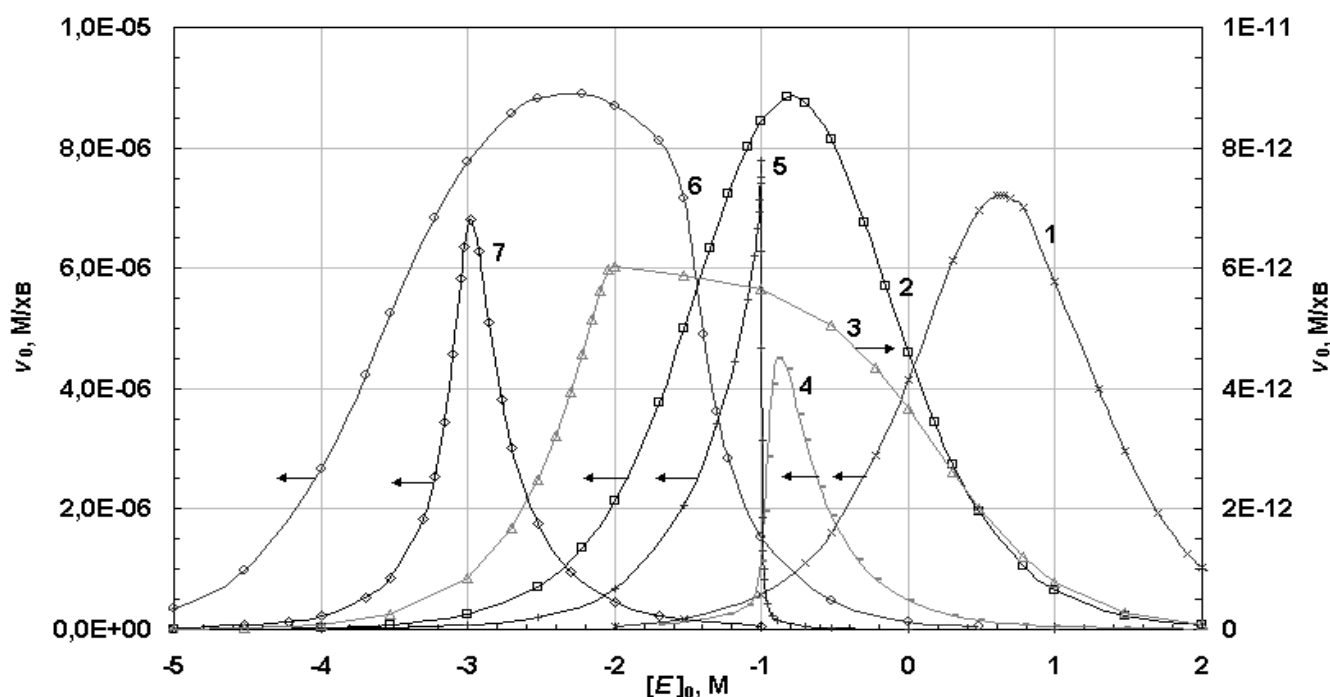


Рис. 7. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації ензиму $[E]_0$ (в логарифмічному масштабі) при незмінних концентраціях субстрату й активатора, які мають форму симетричних та несиметричних піків, для реакцій, що протікають по різним механізмам:

1 – механізм 4 ($k_2 = k_4 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_1 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$);

2 – механізм 12 ($k_1 = 20 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_2 = 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_3 = 1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_6 = 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_7 = 6 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-2} = 400 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-3} = 60 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-6} = 100 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$);

3 – механізм 9 ($k_3 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_1 = k_2 = k_5 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $k_7 = 10 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$);

4 – механізм 18 ($k_1 = k_3 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_2 = 96 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_7 = 30 \text{ XB}^{-1}$, $k_5 = 90 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, $[M]_0 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$);

5 – механізм 17 ($k_3 = 9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_2 = k_5 = 3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$);

6 – механізм 11 ($k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_3 = k_6 = 9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_7 = 1 \text{ XB}^{-1}$, $k_{-2} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$);

7 – механізм 5 ($k_1 = k_4 = 8,64 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_3 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ XB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ XB}^{-1}$, $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[M]_0 = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$).

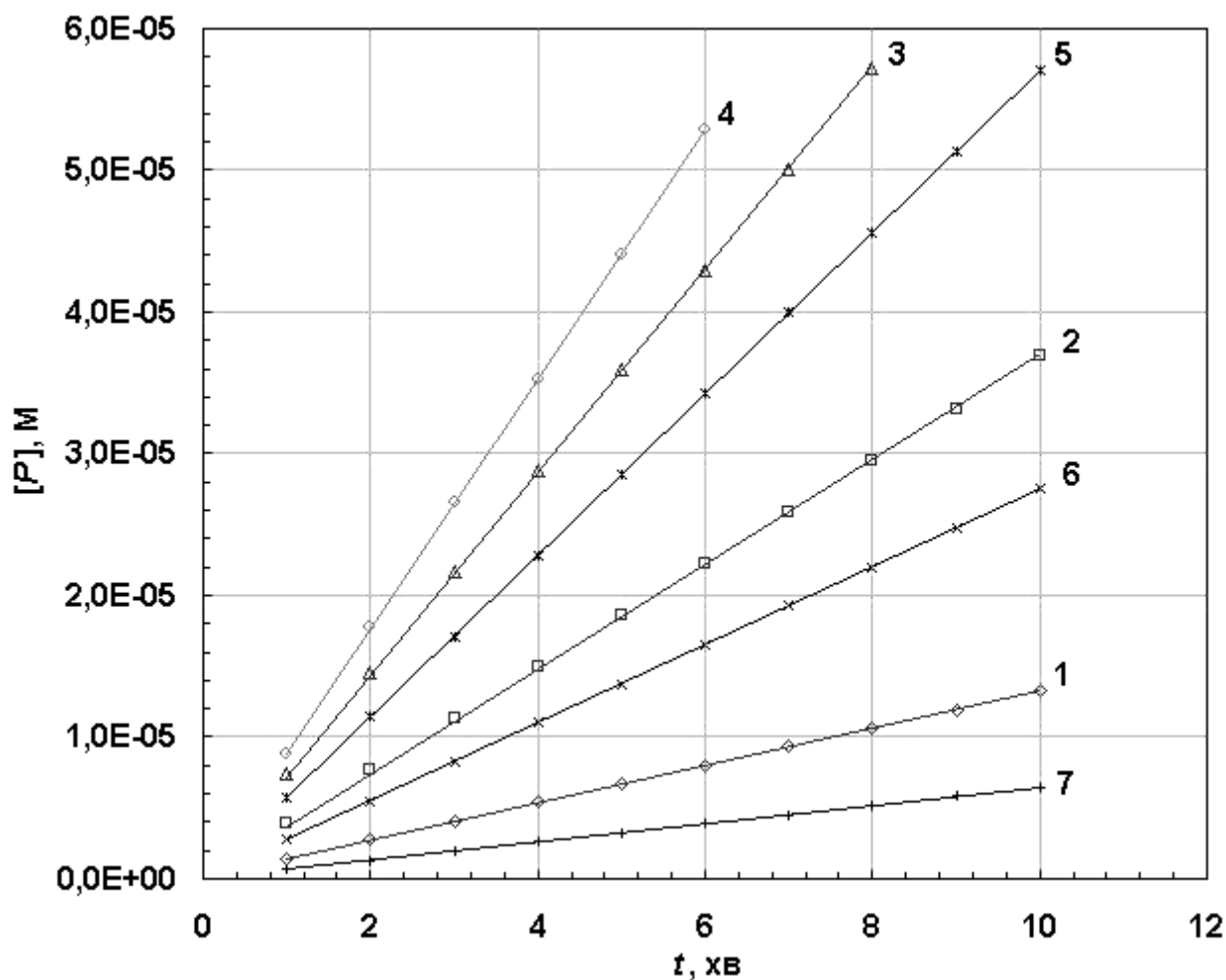


Рис. 8. Лінійність залежностей зміни концентрацій продукту $[P]$ від часу t для реакції, що відбувається у відповідності з механізмом 12 (параметри наведені у підписі до рис. 7, при різних концентраціях ензиму (М): 1 – 0,006; 2 – 0,02; 3 – 0,06; 4 – 0,15; 5 – 0,7; 6 – 2; 7 – 10. Всі проведені прямі проходять через початок координат.

Наприклад, в максимумі кривої 2 (зображеній на рис. 7) при концентрації ензиму 0,15 М концентрація продукту, що утворився за 3 хв. протікання реакції складає $2,65 \cdot 10^{-5}$ М (тобто ступінь перетворення субстрату складає 0,265 %), а при концентрації ензиму 100 М – вона складає $2,02 \cdot 10^{-7}$ М (0,002 %).

Підкреслимо, що подібна залежність швидкості від концентрації ензиму притаманна досліджуваній моделі, яка представлена схемою (1–3). При співставленні

результатів теоретичного розрахунку з реальними експериментальними даними необхідно пам'ятати про обмеження моделі, оскільки іноді можна вийти за межі, встановлені при розробці моделі і в таких умовах необхідно вже враховувати оборотність останньої стадії реакції та взаємодію продукту з учасниками процесу. Тому загалом можливо, що форма експериментальних залежностей швидкості реакції від концентрації ензиму буде відрізнятися від представлених нами, проте те, що максимумами швидкості мають експериментально спостерігатись при підвищенні концентрації ензиму (якщо реакція протікає по механізму, для якого є характерним утворення максимуму) не викликає сумнівів, враховуючи вищенаведені уявлення про механізм їх утворення. До речі, в літературі наводяться аналогічні залежності, проте пояснюють їх по іншому [9].

Таким чином, з факту існування максимумів на залежностях швидкості від концентрації реагентів можна зробити висновок, що при заданих константах швидкості існують оптимальні співвідношення концентрацій учасників реакції, при яких швидкість досягає свого максимального значення. Причому, на відміну від моделі Міхаеліса-Ментен, максимальне значення швидкості спостерігається в більш вузьких концентраційних інтервалах.

Це важливо пам'ятати під час проведення досліджень з визначення специфічності ензиматичної реакції, оскільки, замінивши один з компонентів реакції іншою речовиною тієї ж концентрації, ми змінюємо співвідношення констант швидкостей в системі і тому максимум швидкості в системі з новою речовиною може зміститись в більшій чи меншій мірі в бік з більшою або меншою концентрацією даної речовини.

Це зміщення може виявитись настільки великим, що при даній концентрації нової речовини швидкість стане досить низькою, з чого ми можемо зробити некоректний висновок про специфічність реакції. В той же час при оптимальній концентрації нової речовини реакція може відбуватись з достатньою швидкістю, можливо, навіть з більшою, ніж з початковим компонентом.

На рис. 9 наведений такий приклад.

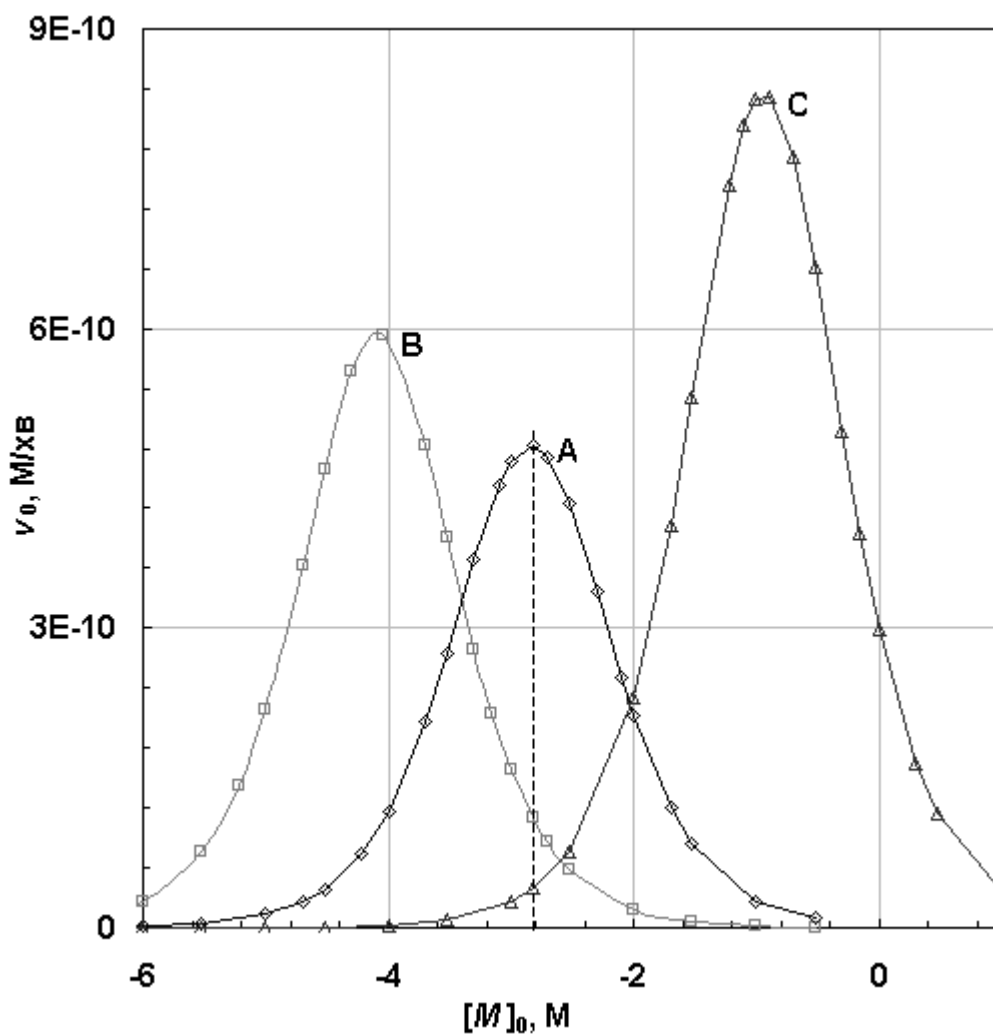


Рис. 9. Вплив різних активаторів на швидкість ензиматичної реакції, що протікає по механізму 11, в умовах, коли початкова концентрація субстрату не змінюється ($[A] = 0,03 \text{ M}$). В такому випадку константи швидкості, що характеризують взаємодію ензиму з субстратом, залишаються незмінними ($k_3 = 1 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ xv}^{-1}$), як і константа розпаду потрійного комплексу ($k_7 = 3 \text{ xv}^{-1}$), а константи швидкості, що характеризують взаємодію ензиму та ензим-субстратного комплексу з активатором – змінюються:

A – $k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_6 = 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_2 = 10 \text{ xv}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ xv}^{-1}$;

B – $k_2 = k_6 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_2 = k_6 = 1 \text{ xv}^{-1}$;

C – $k_2 = 10 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_6 = 20 \text{ M}^{-1}\text{xv}^{-1}$, $k_2 = k_6 = 1 \text{ xv}^{-1}$.

Залежність початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ показана у напівлогарифмічних координатах. Пунктирною лінією позначена концентрація активатора, при якій проводиться визначення швидкості ензиматичної реакції.

Якщо вибрати оптимальні концентраційні умови по активатору **A** ($[A] = 0,03 \text{ M}$, $[M] = 0,0015 \text{ M}$), і в цих умовах визначити швидкість ензиматичної реакції з двома іншими активаторами, то отримаємо наступні результати: для активатора **A** – $v_0 = 4,84 \cdot 10^{-10} \text{ Mxv}^{-1}$; для активатора **B** – $v_0 = 1,11 \cdot 10^{-10} \text{ Mxv}^{-1}$ (23 % від **A**); для активатора **C** – $v_0 = 3,93 \cdot 10^{-11} \text{ Mxv}^{-1}$ (8 % від **A**). В той же час в оптимальних умовах, як видно з рис. 9, найбільш ефективним є активатор **C**, а найменш ефективним – активатор **A**.

З наведених результатів видно, що положення максимуму швидкості відносно осі абсцис, як правило, приблизно відповідає концентрації одного з двох компонентів, концентрацію яких підтримують постійною, а саме того компоненту, концентрація якого більша.

Проте положення максимуму може зсуватись в одну чи іншу сторону на 1–2 порядки (а іноді й більше) в залежності від співвідношення констант швидкості всіх стадій (див. рис. 9), обраного часу інкубації (див. рис. 2), і, навіть, від концентрації компоненту, концентрація якого підтримується постійною: при одних концентраціях положення максимуму може досить точно співпадати з даною концентрацією, а при інших – суттєво відрізнятись (рис. 10).

Оскільки максимальна швидкість v_{max} (швидкість у максимумі) зростає більше, ніж на чотири порядки при збільшенні концентрації активатора з 0,01 до 300 мМ, на рис. 10 результати представлені у вигляді, де вона приведена до одиниці. З рис. 10 видно, що максимум швидкості спостерігається при $[M]_0 = 0,5 \text{ мМ}$, коли $[A] = 0,01 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 0,7 \text{ мМ}$, коли $[A] = 0,3 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 3 \text{ мМ}$, коли $[A] = 3 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 9,5 \text{ мМ}$, коли $[A] = 10 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 27 \text{ мМ}$, коли $[A] = 30 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 90 \text{ мМ}$, коли $[A] = 100 \text{ мМ}$; при $[M]_0 = 280 \text{ мМ}$, коли $[A] = 300 \text{ мМ}$.

Таким чином, в той час, як при концентраціях субстрату, вищих ніж 3 мМ, положення максимуму відносно осі абсцис практично співпадає з концентрацією субстрату, при нижчих його концентраціях цього не спостерігається. Так, при концентрації субстрату 0,01 мМ концентрація активатора, при якій спостерігається максимум, виявляється в 50 разів більшою.

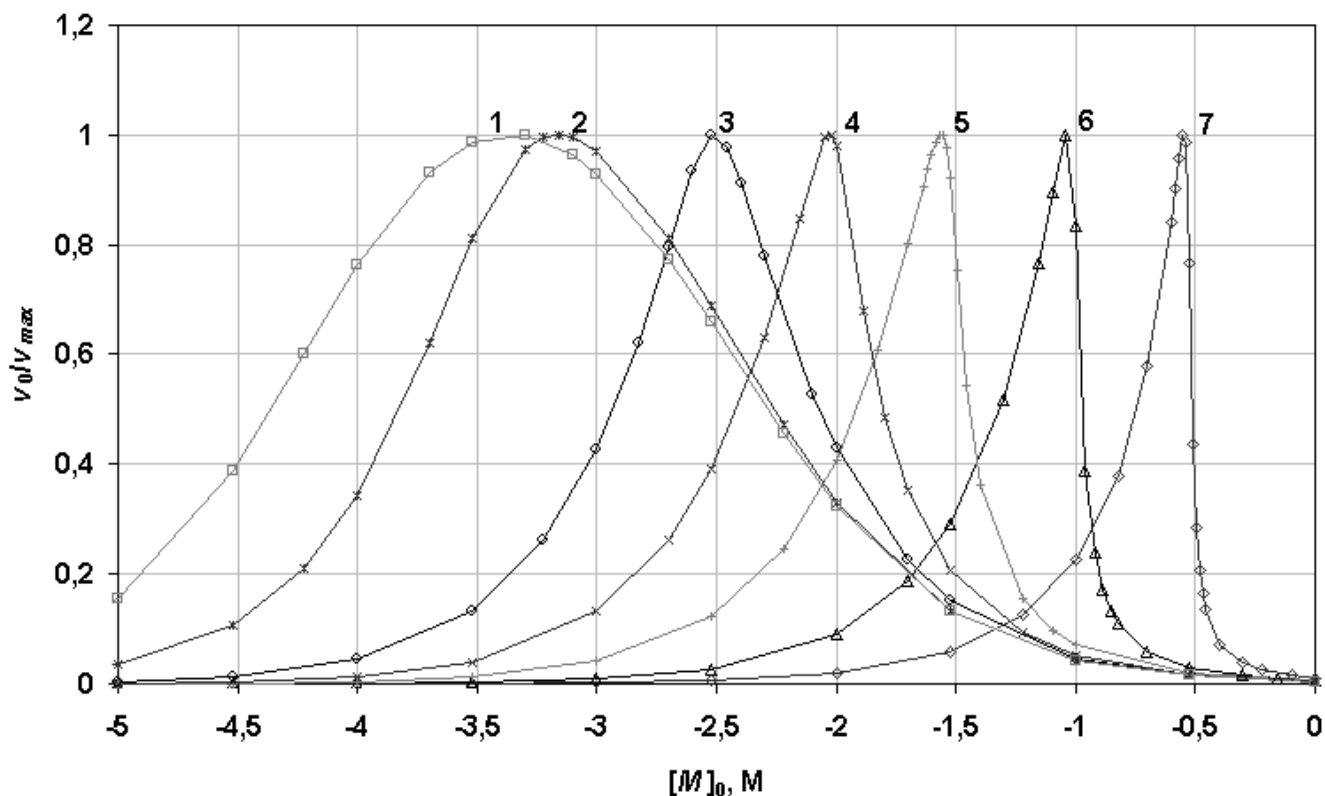


Рис. 10. Залежності нормалізованої швидкості v_0/v_{max} від концентрації активатора $[M]_0$ (в логарифмічному масштабі) для реакції, що відбувається у відповідності з механізмом 7 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1,6 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 4 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-2} = 40 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-5} = 150 \text{ хв}^{-1}$) при незмінних концентраціях ензиму ($[E]_0 = 1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$) та субстрату ($[A]_0$):

1 – 0,01 мМ ($v_{max} = 5,18 \cdot 10^{-12} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$); 2 – 0,3 мМ ($v_{max} = 1,55 \cdot 10^{-10} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$);
 3 – 3 мМ ($v_{max} = 1,46 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$); 4 – 10 мМ ($v_{max} = 4,12 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$);
 5 – 30 мМ ($v_{max} = 1,27 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$); 6 – 100 мМ ($v_{max} = 3,65 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$);
 7 – 300 мМ ($v_{max} = 8,50 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$).

Знання цих особливостей може значно полегшити пошуки максимумів в експериментальних дослідженнях.

З наведених на рис. 2–7 та 9–10 результатів видно, що положення максимуму:

– точно відповідало концентрації того компоненту, концентрація якого не змінювалась, для залежностей, представлених кривою 4 на рис. 2, кривими 2 та 3 на

рис. 5, кривими 3, 5 та 7 на рис. 7, кривою 3 на рис 10 (для 7 залежностей, або у 18 % випадків);

– відрізнялось, але не більше, ніж в 5 разів, для залежностей, представлених кривими 1–3 та 5 на рис. 2, кривими 1–3 на рис. 3, кривими 2–4 та 6 на рис. 4, кривою 1 на рис. 5, кривою 2 на рис. 6, кривими 4 та 6 на рис. 7, кривими А та С на рис. 9, кривими 4–7 та 2 на рис. 10 (для 20 залежностей, або у 51 % випадків);

– відрізнялось в 10–50 разів для залежностей, представлених кривою 4 на рис 3, кривою 1 та 5 на рис. 4, кривими 3, 5 та 6 на рис. 6, кривою 2 на рис. 7, кривою 1 на рис. 10 (для 8 залежностей, або у 21 % випадків);

– відрізнялось в 300–350 разів для залежностей, представлених кривою 5 на рис. 1 та кривою В на рис. 9 (для 2 залежностей, або у 5 % випадків);

– відрізнялось в 3000-4500 разів для залежностей, представлених кривою 4 на рис. 5 та кривою 1 на рис. 7 (для 2 залежностей, або у 5 % випадків).

7.4. Залежності типу Міхаеліса-Ментен

Розглянемо детальніше залежності, що нами позначені в табл. 1, як залежності типу Міхаеліса-Ментен. В зв'язку з цим підкреслимо, що для механізмів, які мають більш ніж дві стадії, кінетикою типу Міхаеліса-Ментен ми вважаємо насамперед кінетику «з насиченням», тобто коли швидкість реакції досягає свого граничного значення при високих концентраціях реагенту (субстрату, ензиму, активатора). Справа в тому, що на відміну від кінетики типу Міхаеліса-Ментен, що виражається гіперболічною залежністю, де зростання швидкості ніколи не перевищує зростання концентрації реактанту, в більш складних випадках зростання швидкості може перевищувати зростання концентрації реактанту.

Тому в загальному випадку для реакцій, що протікають по механізмам, наведеним у табл. 1, ділянка кривої, де швидкість зростає до досягнення нею граничного (для залежностей з «насиченням») або максимального (для залежностей з максимумами) значення, може мати як форму, характерну для моделі Міхаеліса-Ментен (зі збільшенням концентрації реактанту спочатку швидкість зростає

пропорційно концентрації, а потім її зростання починає все більше уповільнюватись у порівнянні зі зростанням концентрації, поки зовсім не припиниться при досягненні граничного або максимального значення), так і схожу на S-подібну (коли зі зростанням концентрації реактанту швидкість спочатку зростає практично пропорційно концентрації, потім її зростання випереджає зростання концентрації, після чого воно починає уповільнюватись, поки зовсім не припиниться при досягненні граничного або максимального значення).

Залежність початкової швидкості від концентрації активатора для механізму 5 (рис. 11) є прикладом реакції, в якій зростання швидкості перевищує зростання концентрації активатора. В даному випадку константи швидкості були підібрані таким чином, щоб залежності концентрації продукту від часу були строго лінійними в інтервалі від 1 до 10 хвилин.

Незважаючи на те, що залежність, показана на рис. 11, суттєво відрізняється від гіперболи, ділянка кривої в інтервалі низьких концентрацій активатора 0,00001–0,02 М чудово лінеаризується у координатах Лайнуївера-Берка (параметри лінеаризації: $a = 4,04 \cdot 10^8$; $b = -1 \cdot 10^{10}$; $R^2 = 1,00000$), хоча розраховувати з цих даних V_m та K_m не можна.

Близька до лінійності також ділянка кривої, що відноситься до високих концентрацій активатора від 1 до 30 М (параметри лінеаризації: $a = 9,05 \cdot 10^5$; $b = 3,37 \cdot 10^9$; $R^2 = 0,99999$).

В цілому, на відміну від гіперболічної залежності, яка у координатах Лайнуївера-Берка є лінійною у всьому інтервалі концентрацій реактанту, в даному випадку такого не спостерігається: як правило кути нахилу тих частин кривої, що відносяться до низьких і до високих концентрацій реактанту, суттєво відрізняються (рис. 12).

Залежність, зображена на рис. 11, не лінеаризується також і в координатах Хілла (рис. 13), незважаючи на те, що вона має S-подібну форму.

З рис. 11 видно, що перевищення зростання швидкості реакції над зростанням концентрації активатора є незначним. Як можна побачити з табл. 2, при низьких концентраціях активатора (від 0,01 до 10 мМ) воно складає 3–30%.

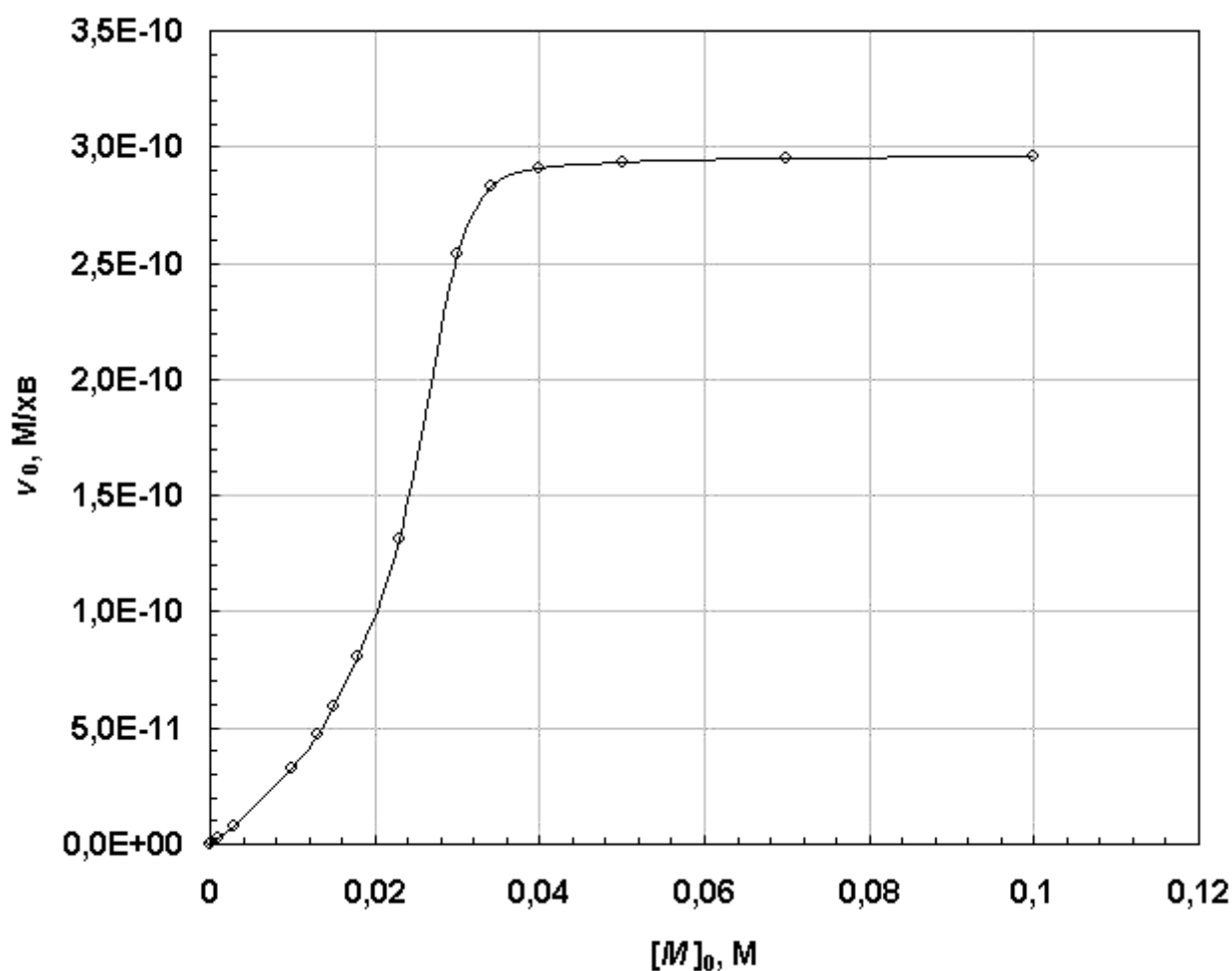


Рис. 11. Залежність початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ для реакції, що відбувається у відповідності до механізму 5, при незмінних концентраціях ензиму ($[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} M$) та субстрату ($[A] = 0,03 M$). Константи швидкості реакції: $k_1 = 2 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot xv^{-1}$, $k_3 = 1 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot xv^{-1}$, $k_4 = 100 M^{-1} \cdot xv^{-1}$, $k_7 = 100 xv^{-1}$, $k_{-1} = 1 xv^{-1}$, $k_{-3} = 100 xv^{-1}$, $k_{-4} = 1 \cdot 10^4 xv^{-1}$.

Проте можливі випадки, коли в певному інтервалі концентрацій реагенту швидкість зростає на порядки швидше, ніж концентрація. Таке явище спостерігалось, наприклад, для механізмів 4, 5 та 10 в деякому діапазоні констант швидкості. Завдання пошуку такого ефекту ми перед собою не ставили, тому можемо лише припустити, що він може бути характерним і для інших механізмів, в яких швидкість може досягати граничного значення при високих концентраціях реактанту, хоча в схожих умовах для механізмів 7, 8 і 11 такого ефекту не спостерігалось.

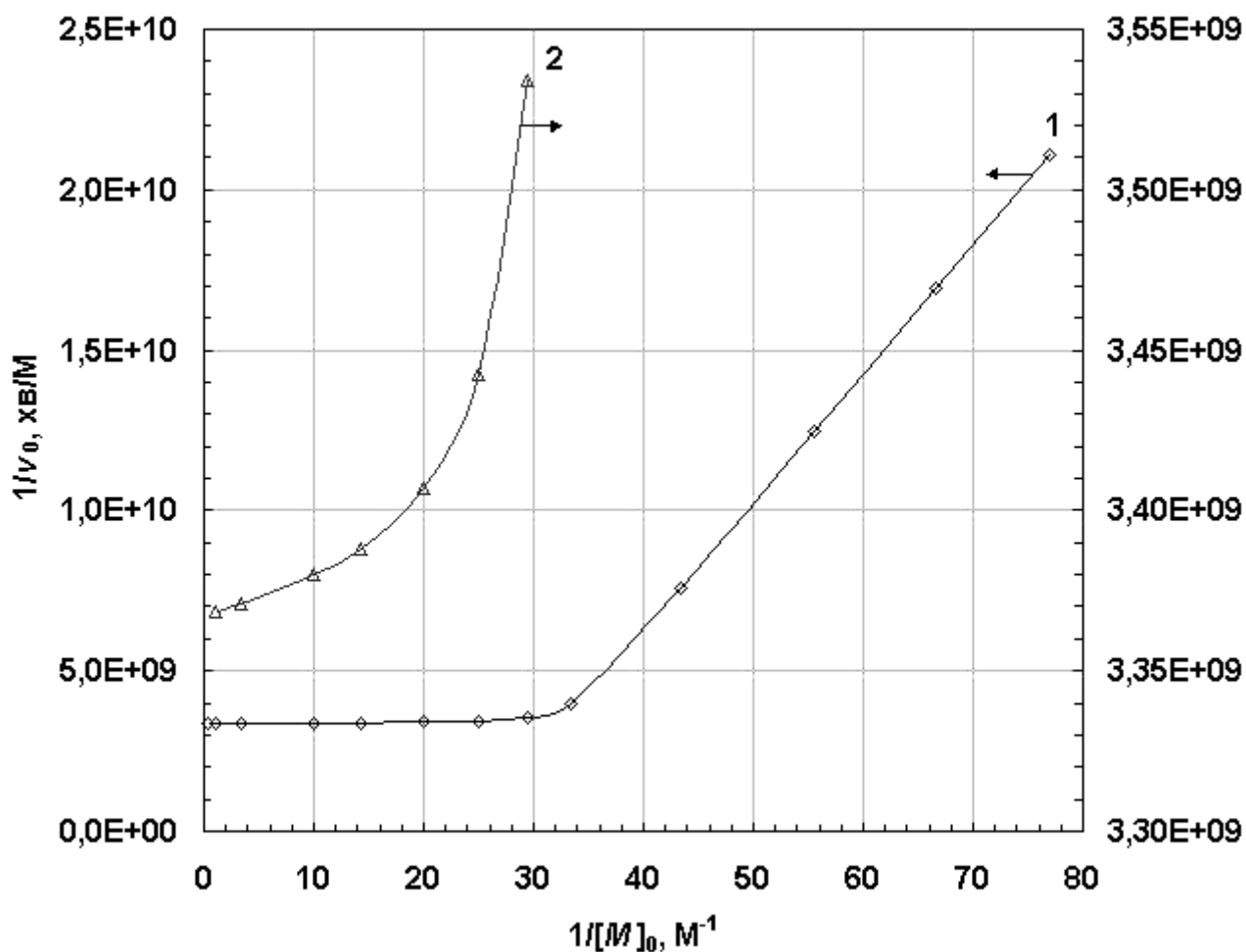


Рис. 12. Лінеаризація залежності, наведеної на рис. 11, в координатах Лайнуївера-Берка ($\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[M]_0}$). Крива 1 – повний графік, крива 2 – горизонтальний відрізок у збільшеному масштабі (додаткова вісь).

З табл. 2 видно, що, на відміну від даних, поданих на рис. 11, для механізмів 4, 10, а також і для механізму 5 (але в іншому діапазоні констант швидкості, ніж наведений у підпису до рис. 11) властивою є така особливість, що в інтервалі концентрацій реагенту (ензиму – у випадку механізму 10; активатора – у випадку механізму 5; субстрату – у випадку механізму 4) 10–100 мМ, де концентрація зростає в 10 разів, швидкість реакції зростає майже в 1000 разів. Причому, можна помітити, що чим більша константа швидкості утворення неактивного комплексу, тим стрімкіше зростає швидкість: у випадку механізму 10, коли $k_1 = 2 \cdot 10^4$, швидкість зростає в 726 разів, у випадку механізму 4, коли $k_2 = 2 \cdot 10^5$, швидкість зростає в 2095 разів, а для механізму 5, коли $k_3 = 9 \cdot 10^5$, швидкість зростає в 2612 разів.

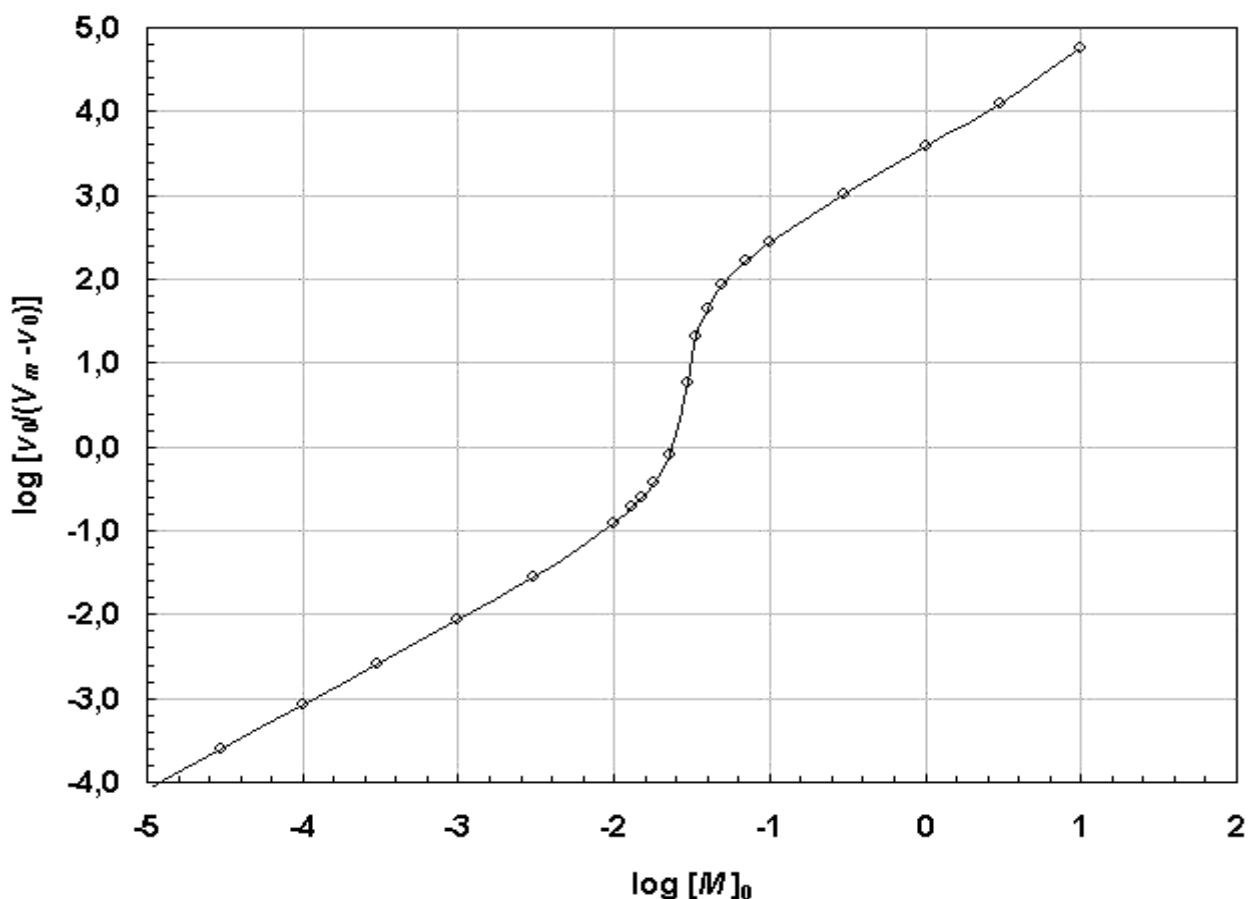


Рис. 13. Лінеаризація залежності, наведеної на рис. 11, в координатах Хілла $\log\left(\frac{v_0}{V_m - v_0}\right) - \log[M]_0$.

Зростання швидкості реакції відбувається настільки стрімко, що його неможливо відобразити у вигляді графіка в звичайних координатах, тому для цього ми не тільки концентрацію активатора, але також і початкову швидкість подамо у логарифмічних координатах (рис. 14, крива 3).

З рис. 14 наочно видно, що крива 3 показує стрімке зростання швидкості зі збільшенням концентрації активатора в інтервалі 0,01–0,1 М, і це зростання значно стрімкіше, ніж у випадку кривої 2, яка є залежністю, що показана на рис. 11. Для порівняння наведена крива 1, яка є залежністю типу Міхаеліса-Ментен і описується рівнянням (12). Для неї характерно те, як було нами зазначено раніше, що при низьких концентраціях активатора швидкість зростає пропорційно концентрації, зростання швидкості ніколи не перевищує зростання концентрації, а тому і стрімке зростання швидкості на кривій 1 відсутнє.

Таблиця 2. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації субстрату $[A]_0$ для механізму 4 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_2 = 2 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ М}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$); від концентрації ензиму $[E]_0$ для механізму 10 ($k_1 = k_3 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-6} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$); від концентрації активатора $[M]_0$ для механізму 5 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_3 = 9 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ М}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ М}$); а також залежність початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ для механізму 5, що була представлена на рис. 11 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_3 = 1 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 100 \text{ хв}^{-1}$, $k_7 = 100 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-3} = 100 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-4} = 1 \cdot 10^4 \text{ хв}^{-1}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ М}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ М}$).

Механізм 5 (рис.11)		Механізм 4		Механізм 5		Механізм 10	
$[M]_0, \text{ М}$	$v_0, \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$	$[A]_0, \text{ М}$	$v_0, \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$	$[M]_0, \text{ М}$	$v_0, \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$	$[E]_0, \text{ М}$	$v_0, \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1}$
0,00001	$2,474 \cdot 10^{-14}$	0,00001	$1,177 \cdot 10^{-17}$	0,00001	$2,558 \cdot 10^{-18}$	0,00001	$1,349 \cdot 10^{-13}$
0,0001	$2,480 \cdot 10^{-13}$	0,0001	$1,180 \cdot 10^{-16}$	0,0001	$2,566 \cdot 10^{-17}$	0,0001	$1,353 \cdot 10^{-12}$
0,001	$2,536 \cdot 10^{-12}$	0,001	$1,216 \cdot 10^{-15}$	0,001	$2,645 \cdot 10^{-16}$	0,001	$1,393 \cdot 10^{-11}$
0,01	$3,290 \cdot 10^{-11}$	0,01	$1,745 \cdot 10^{-14}$	0,01	$3,819 \cdot 10^{-15}$	0,01	$1,975 \cdot 10^{-10}$
0,1	$2,959 \cdot 10^{-10}$	0,1	$3,657 \cdot 10^{-11}$	0,1	$9,975 \cdot 10^{-12}$	0,1	$1,435 \cdot 10^{-07}$
1	$2,969 \cdot 10^{-10}$	1	$1,546 \cdot 10^{-10}$	1	$7,966 \cdot 10^{-11}$	1	$1,987 \cdot 10^{-07}$
10	$2,969 \cdot 10^{-10}$	10	$1,989 \cdot 10^{-10}$	10	$1,800 \cdot 10^{-10}$	10	$2,042 \cdot 10^{-07}$

Зазначимо, що подібне непропорційно швидке зростання швидкості реакції при збільшенні концентрації реагента можна спостерігати також при формуванні максимумів. Наприклад, воно було помічене при збільшенні концентрації активатора в реакціях, що протікають за механізмами 6, 9 та 10 (рис. 14, криві 4–6), при зростанні концентрації субстрату в реакціях, що протікають за механізмами 6, 7 та 12, при зростанні концентрації ензиму в реакції, що відбувається у відповідності з механізмом 12.

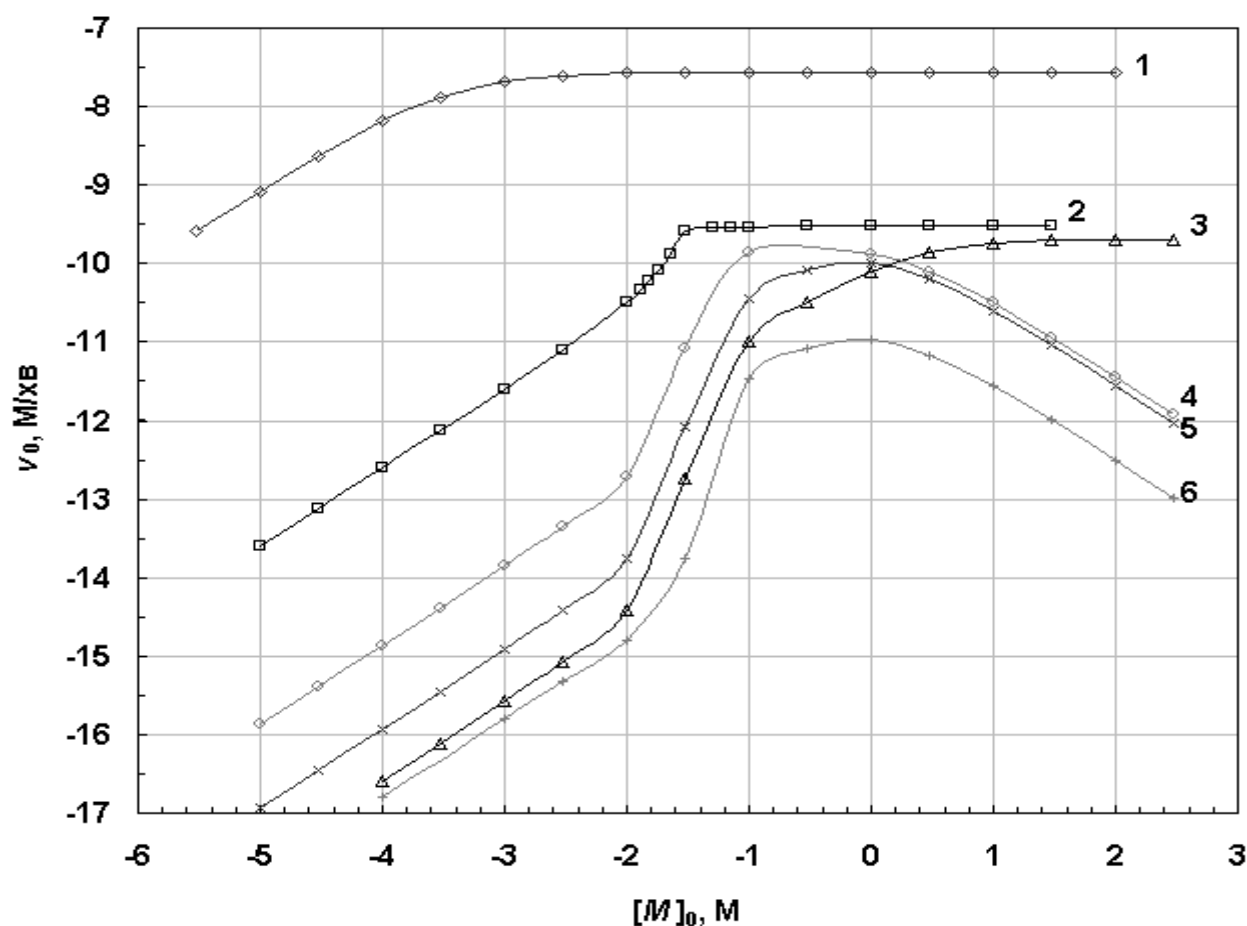


Рис. 14. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (як v_0 , так і $[M]_0$ виражені в логарифмічних координатах) для різних реакцій, що відбуваються у відповідності з наступними механізмами:

1 – механізм 2 ($k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_5 = 1,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ xB}^{-1}$, $k_2 = k_5 = 1 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

2 – механізм 5 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_3 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 100 \text{ xB}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \text{ xB}^{-1}$, $k_3 = 100 \text{ xB}^{-1}$, $k_4 = 1 \cdot 10^4 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

3 – механізм 5 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_3 = 9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_3 = k_4 = 1 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

4 – механізм 10 ($k_1 = k_3 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_3 = k_6 = 1 \text{ xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

5 – механізм 6 ($k_1 = k_3 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_2 = k_4 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_2 = k_3 = k_4 = 1 \text{ xB}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

6 – механізм 9 ($k_1 = k_3 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_5 = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_2 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{xB}^{-1}$, $k_7 = 10 \text{ xB}^{-1}$, $k_{-1} = k_2 = k_3 = k_5 = 1 \text{ xB}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$).

З рис. 14 видно, що стрімке зростання швидкості реакції відбувається в той час, коли концентрація активатора стає рівною концентрації субстрату. Таким чином, якщо проводити вимірювання при іншій фіксованій концентрації субстрату, то концентрація активатора, при якій буде відбуватись стрімке зростання швидкості реакції, також відповідно зміниться (рис. 15).

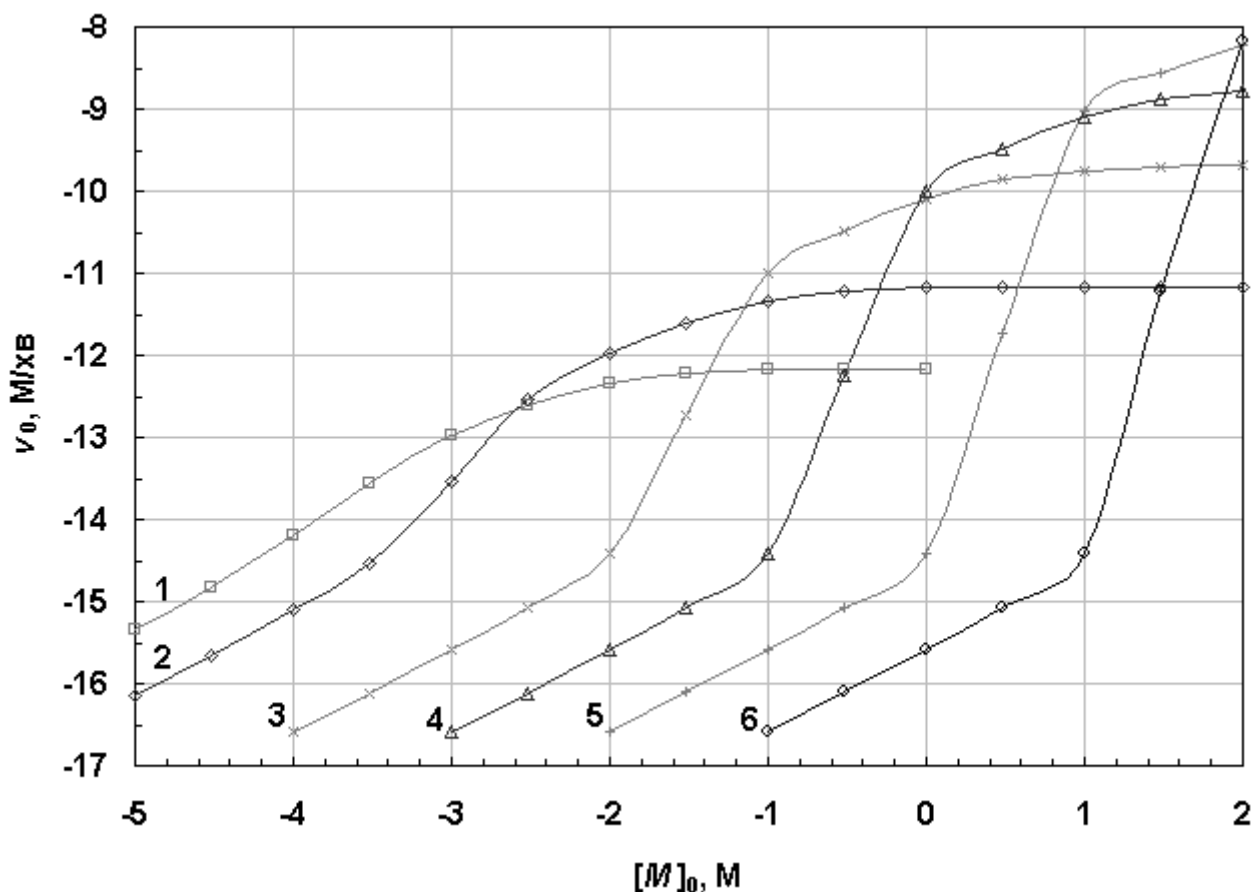


Рис. 15. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (як v_0 , так і $[M]_0$ виражені в логарифмічному масштабі) для реакції, що відбувається у відповідності з механізмом 5 ($k_1 = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_3 = 9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_4 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) при різних концентраціях субстрату $[A]_0$: 1 – 0,1 мМ; 2 – 1 мМ; 3 – 30 мМ; 4 – 0,3 М; 5 – 3 М; 6 – 30 М. По мірі збільшення концентрації субстрату зростання швидкості стає більш стрімким і відбувається при більш високих концентраціях активатора.

З рис. 15 також видно, що при зменшенні фіксованої концентрації субстрату амплітуда стрімкого зростання швидкості реакції також зменшується, так що в деяких випадках при низьких концентраціях субстрату стрімке зростання швидкості майже непомітне (тобто в даних умовах швидкість змінюється приблизно пропорційно концентрації активатора).

З іншого боку, при підвищенні фіксованої концентрації субстрату амплітуда стрімкого зростання швидкості реакції різко збільшується, і проведені розрахунки показують, що при фіксованій концентрації субстрату 30 М в інтервалі концентрацій активатора 10–100 М (якби можна було б досягти таких дуже високих концентрацій), тобто при збільшенні концентрації в 10 разів, швидкість могла б зрости в $1,8 \cdot 10^6$ разів.

Зростання швидкості з підвищенням концентрації реагента в деяких випадках може мати ступінчатий характер (рис. 16), причому як у випадку досягнення швидкістю реакції своїх граничних значень (криві 1–2), так і у випадку формування максимумів (крива 3). До цього типу залежностей можна віднести також залежність швидкості від концентрації ензиму, наведену на рис. 6 (крива 1).

7.5. Кінетичні особливості механізмів з двома шляхами протікання реакції

Найбільш складною кінетичною поведінкою характеризуються механізми 13, 15 та 17, у випадку яких реакції протікають по двом шляхам. Крім залежностей початкової швидкості від концентрації ензиму для механізму 17 (див. рис. 6, крива 6; рис. 7, крива 5), від концентрації субстрату для механізму 15, та від концентрації активатора для механізму 13 (див. рис.3, крива 4; рис. 4, криві 4 та 6), які завжди проходять через максимум, коли після досягнення максимального значення швидкість знижується практично необмежено, у всіх інших випадках залежності швидкості від концентрацій реагентів можуть бути двох типів.

В залежності від величин констант швидкості вони можуть нагадувати залежності Міхаеліса-Ментен, коли швидкість поступово зростає, досягаючи своїх максимальних граничних значень (в тому числі й ступінчато, як на рис. 16, криві 1

та 2), або мати форму, що має ознаки максимуму та «насичення»: при підвищенні концентрації реактанта швидкість поступово зростає, досягаючи максимуму, після чого починає знижуватись, але лише до певного рівня (утворюючи плато), при досягненні якого вона більше не змінюється.

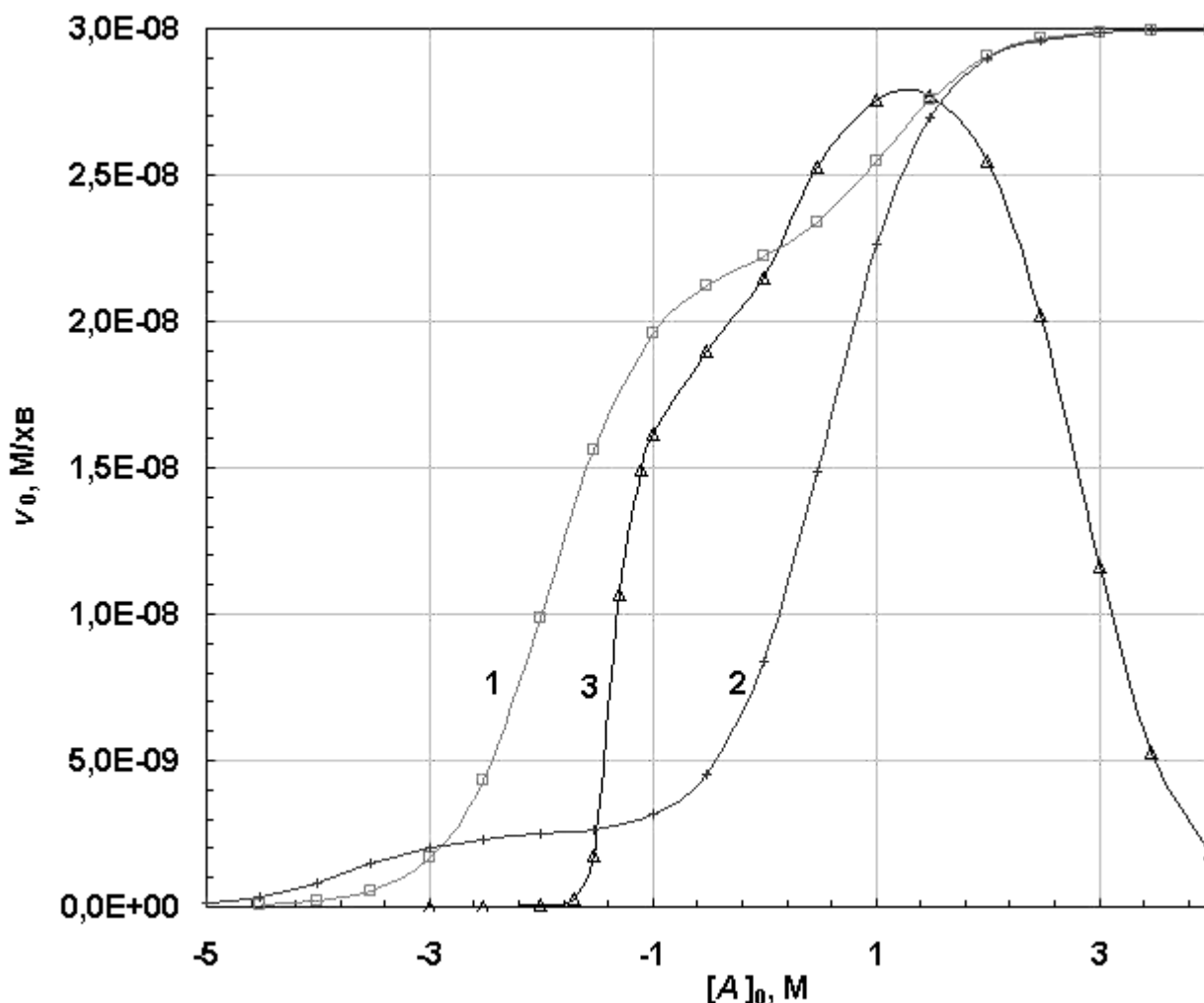


Рис. 16. Ступінчатий характер залежностей початкової швидкості v_0 від концентрації субстрату $[A]_0$ (в логарифмічному масштабі) для різних реакцій, що відбуваються у відповідності з наступними механізмами:

1 – механізм 17 ($k_2 = k_5 = 300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_6 = 9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

2 – механізм 17 ($k_2 = 10 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$);

3 – механізм 6 ($k_1 = k_4 = 9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_2 = 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_3 = 1 \text{ M}^{-1}\cdot\text{хв}^{-1}$, $k_7 = 3 \text{ хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = k_4 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $k_3 = 10 \text{ хв}^{-1}$, $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

З табл. 1 видно, що, наприклад, механізм 17 можна сконструювати двома способами: з механізму 2, додаючи спочатку стадію 3 (при цьому утворюється механізм 8), а потім стадію 6; а також з механізму 3, додаючи спочатку стадію 2 (при цьому утворюється механізм 11), а потім стадію 5. Видно також, що при переході від механізму 2 до механізму 8 тип залежності початкової швидкості від концентрації активатора не змінюється, залишаючись залежністю типу Міхаеліса-Ментен. Швидкість залишається пов'язаною з концентрацією субстрату залежністю типу Міхаеліса-Ментен також при переході від механізму 3 до механізму 11.

Рівень швидкості на плато, що встановлюється при високих концентраціях активатора в реакціях, що протікають по механізму 17 (рис. 17, криві 1–4), є граничною швидкістю залежності типу Міхаеліса-Ментен для механізмів 2 і 8 (рис. 17, криві 5 та 6 відповідно). Тобто додавання до механізму 8 стадії 6, в залежності від її констант швидкості, може викликати або зсув по горизонталі (в область менших концентрацій активатора) залежності типу Міхаеліса-Ментен (рис. 17, крива 1), або утворення на ній максимуму (рис. 17, криві 2–4).

Якщо з реакції, залежність швидкості якої від концентрації активатора представлена на рис. 17 кривою 4, вилучити стадію 6, то максимум, що був на кривій 4 зникає, швидкість досягає граничного значення (крива 6), що співпадає з рівнем, якого досягала швидкість у попередній реакції (крива 4) при високих концентраціях активатора. Якщо ж додатково вилучити ще й стадію 3, то залежність швидкості від концентрації активатора (крива 5) виходить на той же граничний рівень, на який виходила й крива 6, проте сама крива виявляється зсунутою в бік менших концентрацій активатора. Тому такі залежності, що представлені кривими 2–4 на рис. 17, можна розглядати як певний симбіоз кривих з максимумом (при більш низьких концентраціях реактанта) та з насиченням (при високих концентраціях).

Відзначимо також, що додавання до механізму 17 стадії 1 (при цьому маємо механізм 18) навіть з відносно малими константами швидкості ($k_1 = 1 \text{ M}^{-1}\text{хв}^{-1}$, $k_{-1} = 1 \text{ хв}^{-1}$), приводить до негайного зникнення плато при високих концентраціях реактанта (рис. 17, крива 7).

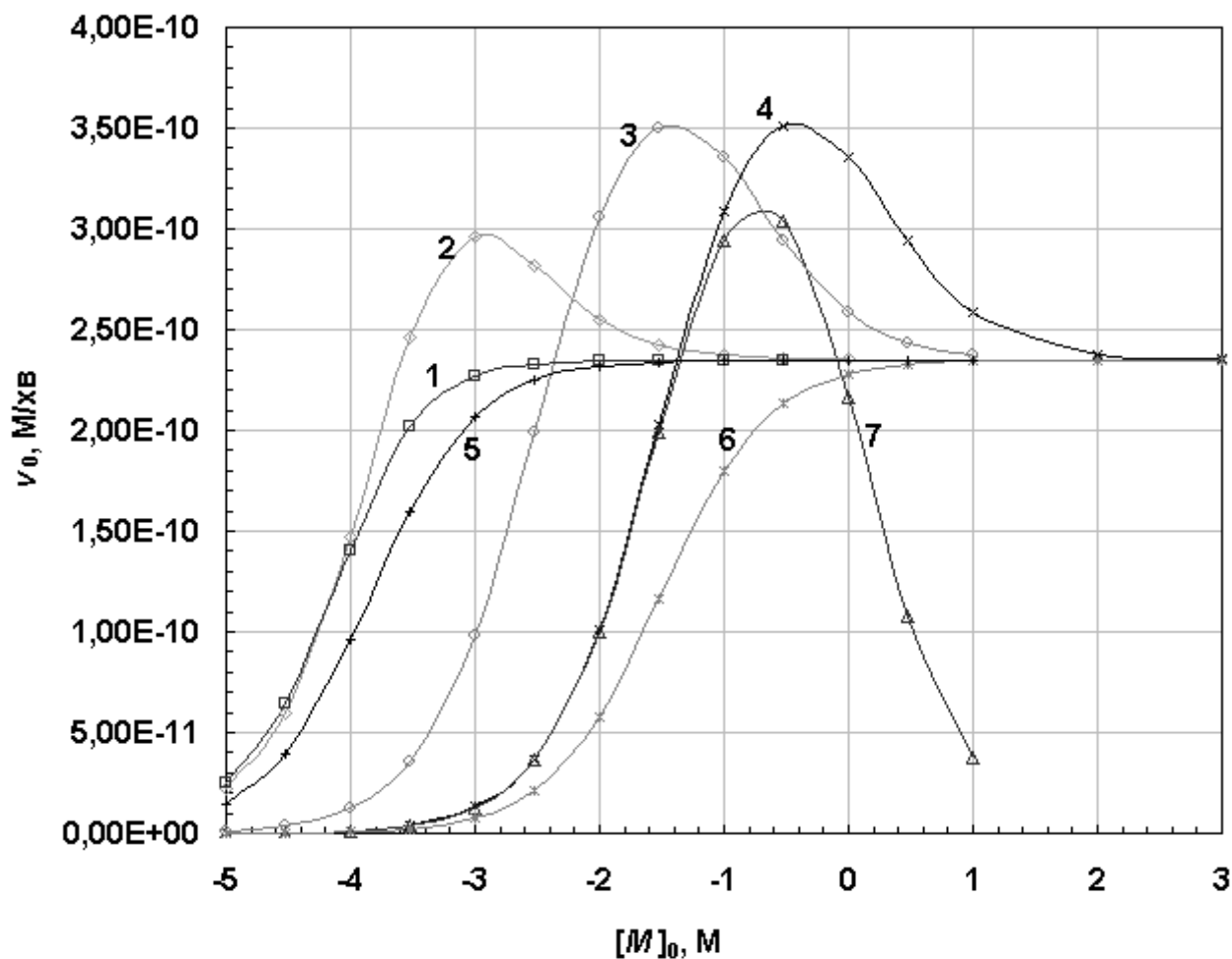


Рис. 17. Залежності початкової швидкості v_0 від концентрації активатора $[M]_0$ (в логарифмічному масштабі) для реакції, що протікає по механізму 17 ($k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ хв}^{-1}$, $k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) при різних константах швидкості k_3 та k_6 : 1 – $k_3 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$; 2 – $k_3 = 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$; 3 – $k_3 = 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$; 4 – $k_3 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$.

Для порівняння: 5 – реакція, що протікає по механізму 2 (яку можна уявити, як механізм 17 без стадій 3 та 6: $k_2 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ хв}^{-1}$, $k_2 = k_5 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$); 6 – реакція, що протікає по механізму 8 (яку можна уявити, як механізм 17 без стадії 6: $k_2 = k_3 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_5 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ хв}^{-1}$, $k_2 = k_3 = k_5 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$); 7 – реакція, що протікає по механізму 18 (яку можна уявити, як механізм 17 з додатковою стадією 1: $k_2 = k_3 = 1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_1 = k_5 = k_6 = 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, $k_7 = 5 \text{ хв}^{-1}$, $k_1 = k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = 1 \text{ хв}^{-1}$, $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

По аналогії з вищевикладеним можна констатувати, що рівень швидкості, який встановлюється при високих концентраціях субстрату в реакціях з механізмом 17, є граничною швидкістю залежності типу Міхаеліса-Ментен для механізмів 3 і 11.

Додавання до механізму 11 стадії 5 може викликати або зсув по горизонталі залежності типу Міхаеліса-Ментен, або утворення на ній максимуму (залежності швидкості від концентрації субстрату аналогічні представленим на рис. 17). При цьому залежність швидкості від концентрації ензиму утворює максимум вже при переході від механізмів 2 та 3 до механізмів 8 та 11 відповідно, і при додаванні стадій 5 та 6 вже не змінює свою форму.

Все вищесказане справедливе також щодо двох інших механізмів, в яких реакції протікають по двом шляхам – для механізмів 13 та 15.

Відмітимо також, що якщо в реакціях з механізмом 17 залежність швидкості від концентрації субстрату має вигляд кривої типу Міхаеліса-Ментен, то й залежність швидкості від концентрації активатора має такий же вигляд.

І навпаки, якщо залежність швидкості від концентрації субстрату має вигляд кривої з максимумом та плато, то і залежність швидкості від концентрації активатора має такий же вигляд.

Цей ефект спостерігається також і для механізмів 13 та 15.

Проведені дослідження показали, що в реакціях, які протікають по двом шляхам, швидкість також може зростати набагато швидше, ніж концентрація реагенту (табл. 3). Цей ефект спостерігається лише для механізмів 13 та 15, причому як для залежностей типу Міхаеліса-Ментен (механізм 15 (m), табл. 3), так і для залежностей, що мають максимум з плато (механізми 13 та 15 (e), табл. 3).

На залежностях з максимумом для цих механізмів, а також на залежностях будь-якого вигляду для механізму 17, стрімкого зростання швидкості не було помічено, хоча іноді швидкість зростала дещо швидше, ніж концентрація реагенту, проте не більше, ніж на кілька процентів.

Таблиця 3. Стрімке зростання початкової швидкості v_0 при підвищенні концентрації ензиму $[E]_0$ (при незмінних концентраціях активатора $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ М та субстрату $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 15 (е) ($k_1 = k_3 = 4 \cdot 10^5$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_4 = k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹), при підвищенні концентрації активатора $[M]_0$ (при незмінних концентраціях ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8}$ М та субстрату $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 15 (м) ($k_1 = k_4 = 1 \cdot 10^3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_3 = 1 \cdot 10^6$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹), при підвищенні концентрації субстрату $[A]_0$ (при незмінних концентраціях ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8}$ М та активатора $[M]_0 = 3 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 13 ($k_1 = 2 \cdot 10^4$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_2 = 1 \cdot 10^4$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_4 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_5 = 2$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = k_{-5} = 1$ хв⁻¹), при підвищенні концентрації ензиму $[E]_0$ (при незмінних концентраціях активатора $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-5}$ М та субстрату $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 19 ($k_1 = k_3 = k_5 = 2 \cdot 10^4$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_2 = k_4 = k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-5} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹).

Механізм 15(е)		Механізм 15 (м)		Механізм 13		Механізм 19	
$[E]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[M]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[A]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[E]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹
0,00001	$3,300 \cdot 10^{-15}$	0,00001	$4,381 \cdot 10^{-16}$	0,00001	$4,397 \cdot 10^{-17}$	0,00001	$7,120 \cdot 10^{-14}$
0,0001	$3,303 \cdot 10^{-14}$	0,0001	$4,382 \cdot 10^{-15}$	0,0001	$4,399 \cdot 10^{-16}$	0,0001	$7,126 \cdot 10^{-13}$
0,001	$3,331 \cdot 10^{-13}$	0,001	$4,394 \cdot 10^{-14}$	0,001	$4,411 \cdot 10^{-15}$	0,001	$7,184 \cdot 10^{-12}$
0,01	$3,640 \cdot 10^{-12}$	0,01	$4,519 \cdot 10^{-13}$	0,01	$4,543 \cdot 10^{-14}$	0,01	$7,826 \cdot 10^{-11}$
0,03	$1,382 \cdot 10^{-11}$	0,03	$1,448 \cdot 10^{-12}$	0,03	$1,460 \cdot 10^{-13}$	0,03	$2,945 \cdot 10^{-10}$
0,1	$5,649 \cdot 10^{-9}$	0,1	$6,354 \cdot 10^{-12}$	0,1	$6,490 \cdot 10^{-13}$	0,1	$2,491 \cdot 10^{-8}$
0,3	$7,190 \cdot 10^{-7}$	0,3	$1,912 \cdot 10^{-10}$	0,3	$8,674 \cdot 10^{-11}$	0,3	$7,395 \cdot 10^{-7}$
1	$8,735 \cdot 10^{-7}$	1	$6,892 \cdot 10^{-9}$	1	$2,243 \cdot 10^{-9}$	1	$6,922 \cdot 10^{-7}$
3	$8,111 \cdot 10^{-7}$	3	$1,741 \cdot 10^{-8}$	3	$2,154 \cdot 10^{-9}$	3	$3,763 \cdot 10^{-7}$
10	$7,299 \cdot 10^{-7}$	10	$2,554 \cdot 10^{-8}$	10	$2,014 \cdot 10^{-9}$	10	$1,385 \cdot 10^{-7}$
100	$6,789 \cdot 10^{-7}$	100	$2,922 \cdot 10^{-8}$	100	$1,940 \cdot 10^{-9}$	100	$1,506 \cdot 10^{-8}$

З іншого боку, для реакцій, що протікають по трьом шляхам (механізм 19, табл. 1), залежності швидкості від концентрації реактанту завжди утворюють максимум, і, на відміну від реакцій, що протікають по двом шляхам, в рамках механізму 19 стрімке зростання швидкості може відбуватись і при підвищенні концентрації ензиму (механізм 19, табл. 3), і при підвищенні концентрації субстрату, і при підвищенні концентрації активатора.

На відміну від залежностей типу Міхаеліса-Ментен, коли швидкість може тільки зростати при збільшенні концентрації реагенту, залежності, що утворюють максимум, характеризуються тим, що швидкість може не тільки зростати, але також і знижуватись.

В деяких випадках таке зниження може бути досить стрімким. З табл. 4 видно, що у всіх випадках, коли на кривих утворюються максимуми (на залежностях швидкості від концентрації ензиму для механізму 17, концентрації субстрату для механізму 15 та концентрації активатора для механізму 13), може спостерігатись стрімке зниження швидкості при зростанні концентрації реагенту.

Стрімке зниження швидкості може спостерігатись також і в реакціях, що протікають по трьом шляхам (механізм 19, табл. 1), як при збільшенні концентрації ензиму (табл. 4), так і при збільшенні концентрацій субстрату та активатора.

З табл. 3 та 4 видно, що стрімке зростання та стрімке зниження швидкості реакції відбувається в той час, коли концентрація компонента, концентрацію якого змінюють, стає приблизно рівною концентрації того компонента, з тих, концентрації яких підтримують незмінними, у якого вона вища.

В тих випадках, коли параметри реакції дозволяють відбуватись одночасно стрімкому зростанню та стрімкому зниженню швидкості реакції, утворюються вкрай вузькі та гострі піки. Один з таких піків можна побачити на рис. 5 (крива 2). Подібні піки можуть утворюватись також в реакціях, що протікають по трьом шляхам (механізм 19, табл. 1). З табл. 4 (механізм 19) видно, що при зростанні на порядок концентрації ензиму з 0,01 до 0,1 М швидкість зростає в 1340 разів, а при зростанні на порядок з 0,1 до 1 М – швидкість знижується в 1337 разів. В результаті утворюється симетричний вузький та гострий пік.

Таблиця 4. Стрімке зниження початкової швидкості v_0 при підвищенні концентрації ензиму $[E]_0$ (при незмінних концентраціях активатора $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ М та субстрату $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 17 (див. рис. 7, крива 5) з константами швидкості $k_2 = k_5 = 3 \cdot 10^3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_3 = 9 \cdot 10^6$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_{-2} = k_{-3} = k_{-5} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹; при підвищенні концентрації субстрату $[A]_0$ (при незмінних концентраціях активатора $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-1}$ М та ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8}$ М) для механізму 15 з константами швидкості $k_1 = k_3 = 1 \cdot 10^6$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_4 = k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹; при підвищенні концентрації активатора $[M]_0$ (при незмінних концентраціях субстрату $[A]_0 = 3 \cdot 10^{-2}$ М та ензиму $[E]_0 = 1 \cdot 10^{-8}$ М) для механізму 13 (див. рис.4, крива 4) з константами швидкості $k_1 = k_2 = 9 \cdot 10^6$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_4 = k_5 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-4} = k_{-5} = 1$ хв⁻¹; при підвищенні концентрації ензиму $[E]_0$ (при незмінних концентраціях активатора $[M]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ М та субстрату $[A]_0 = 1 \cdot 10^{-1}$ М) для механізму 19 з константами швидкості $k_3 = 9 \cdot 10^6$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_6 = 1$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_1 = k_2 = k_4 = k_5 = 3 \cdot 10^3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_7 = 3$ М⁻¹·хв⁻¹, $k_{-1} = k_{-2} = k_{-3} = k_{-4} = k_{-5} = k_{-6} = 1$ хв⁻¹.

Механізм 17		Механізм 15		Механізм 13		Механізм 19	
$[E]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[A]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[M]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹	$[E]_0$, М	v_0 , М·хв ⁻¹
0,00001	$6,899 \cdot 10^{-10}$	0,00001	$1,097 \cdot 10^{-13}$	0,00001	$1,113 \cdot 10^{-13}$	0,00001	$5,054 \cdot 10^{-12}$
0,0001	$6,899 \cdot 10^{-9}$	0,0001	$1,096 \cdot 10^{-12}$	0,0001	$1,109 \cdot 10^{-12}$	0,0001	$5,058 \cdot 10^{-11}$
0,001	$6,897 \cdot 10^{-8}$	0,001	$1,087 \cdot 10^{-11}$	0,001	$1,076 \cdot 10^{-11}$	0,001	$5,100 \cdot 10^{-10}$
0,01	$6,885 \cdot 10^{-7}$	0,01	$9,898 \cdot 10^{-11}$	0,01	$7,437 \cdot 10^{-11}$	0,003	$1,559 \cdot 10^{-9}$
0,03	$2,058 \cdot 10^{-6}$	0,03	$2,320 \cdot 10^{-10}$	0,03	$6,468 \cdot 10^{-13}$	0,01	$5,568 \cdot 10^{-9}$
0,1	$7,414 \cdot 10^{-6}$	0,1	$3,541 \cdot 10^{-12}$	0,1	$6,154 \cdot 10^{-16}$	0,03	$2,114 \cdot 10^{-8}$
0,3	$2,196 \cdot 10^{-8}$	0,3	$6,432 \cdot 10^{-15}$	0,3	$1,620 \cdot 10^{-16}$	0,1	$7,461 \cdot 10^{-6}$
1	$4,887 \cdot 10^{-9}$	1	$1,457 \cdot 10^{-15}$	1	$4,527 \cdot 10^{-17}$	0,3	$2,466 \cdot 10^{-8}$
3	$1,517 \cdot 10^{-9}$	3	$4,542 \cdot 10^{-16}$	3	$1,481 \cdot 10^{-17}$	1	$5,580 \cdot 10^{-9}$
10	$4,444 \cdot 10^{-10}$	10	$1,332 \cdot 10^{-16}$	10	$4,412 \cdot 10^{-18}$	3	$1,742 \cdot 10^{-9}$
100	$4,444 \cdot 10^{-10}$	100	$1,321 \cdot 10^{-17}$	30	$1,468 \cdot 10^{-18}$	10	$5,114 \cdot 10^{-10}$

Як можна бачити, в обох піках, представлених на рис. 5 та в табл. 4, максимальна швидкість досягається в момент, коли концентрація відповідно субстрату та ензиму стає рівною концентрації активатора та субстрату (тобто того компоненту, концентрація якого вища, серед тих речовин, концентрації яких підтримують незмінними).

7.6. Визначення механізму досліджуваної реакції за формою залежностей початкової швидкості від концентрацій ензиму, субстрату та активатора

З представлених в табл. 1 результатів дослідження можна зробити висновок, що за виглядом графіків залежності початкової швидкості від концентрацій Mg^{2+} , АТР та ензиму, можна зробити певні висновки про шляхи протікання реакції гідролізу АТР. Це обумовлено тим, що включення в реакцію додаткових стадій, одного або кількох додаткових шляхів приводить до появи ряду нових комплексів, в результаті чого відбувається перерозподіл реагуючих речовин по всім цим комплексам таким чином, що реагуюча система набуває унікального набору властивостей, який дозволяє в багатьох випадках ідентифікувати задіяні шляхи протікання реакції.

Як видно з табл. 1, одним з головних факторів, що визначають набір властивостей системи, є кількість подвійних комплексів, що утворюються. Якщо утворюється лише один такий комплекс, то залежність швидкості від концентрацій реагентів виражається залежністю типу Міхаеліса-Ментен (механізми 1–3).

Якщо утворюється три подвійних комплекси – на графіках залежності швидкості від концентрацій ензиму, субстрату й активатора спостерігаються лише максимуми (механізми 6, 9, 12, 14, 16, 18 та 19).

При утворенні двох подвійних комплексів можуть спостерігатись як залежності типу Міхаеліса-Ментен, так і максимуми швидкості. При цьому, якщо реакція протікає по одному шляху, то залежність початкової швидкості від концентрації одного компонента відноситься до типу Міхаеліса-Ментен, а залежності початкової швидкості від концентрацій двох інших компонентів (які зв'язуються в неактивний комплекс) утворюють максимум.

Якщо ж реакція протікає по двом шляхам, то залежність початкової швидкості від концентрації одного з компонентів (як раз того, який є учасником обох подвійних комплексів) утворює максимум, а залежність початкової швидкості від концентрації інших двох компонентів може бути або залежністю типу Міхаеліса-Ментен, або мати максимум, після якого швидкість знижується до певного рівня і виходить на плато.

Підкреслимо, що в експериментальних умовах може бути не так просто визначити форму залежностей швидкості від концентрацій ензиму, субстрату та активатора. Може виявитись, що максимум або граничне значення швидкості досягається при таких концентраціях реагенту, які неможливо досягти (див. наприклад, рис. 3, крива 5; рис. 6, крива 1; рис. 7, крива 1, рис. 16, криві 1–3).

В деяких випадках буває так, що в широкому інтервалі концентрацій реактанта утворюється так мало продукту реакції, що його практично неможливо виміряти.

У випадку дослідження реакцій, що протікають по механізмам з двома шляхами, зниження швидкості після максимуму буває настільки незначним, що отриману залежність можна прийняти за залежність типу Міхаеліса-Ментен. Такі ж труднощі можуть виникнути у випадку досліджень реакцій, в яких утворюються широкі пласкі максимуми (див. наприклад, рис. 3, крива 4; рис. 6, крива 2).

У всіх цих випадках можна спробувати провести дослідження при інших концентраціях компонентів, концентрація яких підтримується незмінною (див. рис. 10).

Можна припустити, що наявність максимумів швидкості може бути загальним принципом дії ензимів, оскільки в клітині вони знаходяться серед великої кількості різноманітних хімічних сполук, що здатні в більшій чи меншій мірі взаємодіяти з ними. Як тут не згадати слова Л. Вебба, що гальмування субстратом є скоріше правилом, ніж винятком [3].

Такий характер кінетики дає можливість за рахунок збільшення концентрації одного з учасників реакції провести процес за короткий інтервал часу, не потребує швидкого зниження концентрації цього компоненту для припинення реакції і при

цьому концентрація субстрату не повинна встигнути знизитись до нуля. Таким чином, підвищення концентрації реагенту викликає швидку появу сигналу продукту, який, в свою чергу, може викликати появу подібного сигналу продукту в іншій ензиматичній реакції.

Як можна бачити з табл. 1, немає абсолютного критерію для визначення механізму реакції, оскільки однаковий набір властивостей характерний для декількох можливих механізмів.

Так всі механізми, в яких утворюються три подвійні комплекси (механізми 6, 9, 12, 14, 16, 18 та 19), важко розрізнити по кінетичним даним, тому що для них характерно те, що швидкість при зростанні концентрацій ензиму, субстрату та активатора проходить через максимум.

Механізми, в яких утворюється один подвійний комплекс (механізми 1–3), також важко розрізнити, оскільки залежності швидкості від концентрації ензиму, субстрату та активатора завжди є залежностями типу Міхаеліса-Ментен.

Проте, як видно з табл. 1, можна точно ідентифікувати те, скільки подвійних комплексів утворюється в досліджуваній реакції: якщо лише один комплекс – всі залежності відносяться до типу Міхаеліса-Ментен, якщо три комплекси – всі залежності утворюють максимум, якщо два комплекси – є залежності як типу Міхаеліса-Ментен, так і залежності з максимумом.

У випадку утворення двох подвійних комплексів однаковий вигляд залежностей швидкості від концентрацій ензиму, субстрату та активатора мають такі пари механізмів: 4 та 11, 5 та 8, 7 та 10. Проте, навіть в такому випадку можна встановити точно один з комплексів, що утворюється. В першій парі утворюється комплекс *ME*, в другій – *EA*, в третій – *MA*.

Таким чином, визначивши експериментально форму залежностей швидкості від концентрацій реагентів, ми можемо відкинути більшу частину тих механізмів, що не відповідають експерименту. В результаті залишиться лише певна кількість можливих механізмів, але ми можемо бути впевнені в тому, що ми маємо їх повний набір, а тому можемо будувати стратегію подальших досліджень, володіючи повною інформацією про те, на що ми маємо звернути увагу.

Наприклад, розглянутий в літературі спрощений варіант моделі 8 [3] (див. в кінці підрозділу 7.1) вказує тільки на гальмування субстратом. Тому, коли дослідники резонно припустивши, що таке гальмування можна перебороти за допомогою надлишку активатора, в результаті знаходять, що надлишок активатора також викликає гальмування, вони приходять до висновку, що при цьому процес ускладнюється [3]. Проте, як видно з табл. 1 (схема 18), швидкість знижується як при підвищенні концентрації активатора, так і при підвищенні концентрації субстрату, і такий результат експерименту як раз повністю підтверджує, що реакція протікає у повній відповідності з даним механізмом і немає потреби шукати ніяких додаткових пояснень.

Те ж саме відноситься й до розглянутої в літературі моделі 7 [3] (див. в кінці підрозділу 7.1). Також зазначимо, що розглянута в літературі спрощена модель 2 [3] (див. в кінці підрозділу 7.1) не передбачає існування залежностей швидкості від концентрацій субстрату та активатора з максимумом та плато. Крім того, як нами було підкреслено раніше, розглянуті в літературі спрощені варіанти моделей 1, 3, 4 і 6 не передбачають наявності максимумів на кривих залежності швидкості реакції від концентрації ензиму.

Відмітимо, що при експериментальних дослідженнях реакції гідролізу АТР Mg^{2+} -АТРазою дослідниками також спостерігаються залежності початкової швидкості від концентрації субстрату з максимумом [1, 13]. З врахуванням цього факту та результатів проведених нами розрахунків можна стверджувати, що механізми 1–4, 11, 13 та 17 (див. табл. 1) не реалізуються в ході реакції гідролізу АТР Mg^{2+} -АТРазою. На залежності швидкості від концентрації Mg^{2+} максимум не спостерігається [1, 13], але для того, щоб впевнитись, що його дійсно немає, необхідно провести дослідження при ще більш високих концентраціях Mg^{2+} .

Схожі графіки експериментатори отримували також і при дослідженні транспорту кальцію Mg^{2+} - Ca^{2+} -АТРазою у фракції сарколеми міомерію в присутності магнію й АТР [14]. Великий несиметричний максимум спостерігали при гальмуванні пірофосфатази субстратом в присутності $MgCl_2$, причому при концентрації субстрату, приблизно рівній концентрації Mg^{2+} [9].

Зміщення максимуму і зміну форми піку спостерігали при гальмуванні активності ацетилхолінестерази субстратом при різних концентраціях NaCl, пояснюючи ці дані впливом іонної сили та гальмуванням активності холінестерази субстратом при різних концентраціях KCl [3]. В обох випадках максимуми зміщувались в бік більших концентрацій субстрату при зростанні концентрацій солей металів.

У переважній більшості ензиматичних реакцій спостерігаються залежності швидкості від концентрації іонів водню (рН) у вигляді максимумів. Як приклад наведемо реакцію розкладу пероксиду водню каталазою [15]. Інтерпретують їх так, що ензим, представлений як двоосновна кислота, при дисоціації відщеплює два протони, утворюючи ще дві дисоційовані форми, з яких взаємодіяти з субстратом та утворювати продукти здатен лише однократно іонізований комплекс [5, 10]. Проте результати нашого дослідження дають підстави вважати, що у цього явища може бути й інше пояснення: іони водню H^+ можуть виступати в якості активатора в ензиматичних реакціях. На те, що вони водню можуть діяти як активатори, вказують Т. Келеті [2] і Корніш-Боуден [5].

7.7. Основні властивості дослідженої ензиматичної реакції

Для теоретичного дослідження кінетики гідролізу АТФ «базальною» Mg^{2+} -АТФазою була розроблена математична модель цієї ензиматичної реакції. Модель заснована на припущенні, що в ході реакції кожний з трьох реактантів може об'єднуватись в комплекси попарно з іншими учасниками процесу. Потім до цих комплексів може приєднуватись третій компонент, утворюючи потрійний комплекс. Такий підхід дозволяє врахувати при розрахунках всі можливі взаємодії в досліджуваній системі та досліджувати увесь процес в цілому, уникаючи спрощень.

Були досліджені 19 можливих парціальних механізмів гідролізу АТФ в рамках вибраної узагальненої схеми і показано, що якщо процес гідролізу АТФ протікає по механізмам, в яких утворюється більш ніж один подвійний комплекс, на графіках залежності початкової швидкості від загальної концентрації як АТФ, так і Mg^{2+} , можуть утворюватись максимуми. Більше того, максимуми швидкості

спостерігаються також і при зростанні концентрації ензиму, що є якісно новим результатом, не описаним в літературі.

Максимуми утворюються тоді, коли компонент, концентрацію якого змінюють, при високих концентраціях (що перевищує концентрації інших двох учасників реакції) практично повністю зв'язує інші два компонента у подвійні комплекси, в результаті чого концентрація незв'язаних форм останніх двох сполук виявляється такою незначною, що не може забезпечити високої швидкості протікання реакції, незважаючи на високу концентрацію незв'язаної форми першого компонента.

Максимуми можуть мати різну форму в залежності від параметрів реакції: вони можуть бути симетричними і несиметричними, з плоскими і гострими вершинами.

Максимум спостерігається, як правило, в умовах, коли концентрації двох учасників реакції практично співпадають: компонента, чия загальна концентрація змінюють, та компонента, що має більшу концентрацію серед тих речовин, загальні концентрації яких підтримують незмінними. При цьому положення максимуму може змінюватись в більший чи менший бік на 1–2 порядки (а іноді й більше) в залежності від співвідношення констант швидкості всіх стадій, від початкових концентрацій учасників реакції та часу інкубації.

По вигляду графіків залежності початкової швидкості реакції від загальних концентрацій Mg^{2+} , АТФ і ензиму можна точно визначити кількість подвійних комплексів, що утворюються в досліджуваній реакції, та можна зробити певні припущення про шляхи протікання гідролізу АТФ.

Для механізмів, де реакція протікає по двом шляхам, залежності початкової швидкості від концентрацій реагентів можуть проходити через максимум з подальшим зниженням і виходом на плато. Рівень швидкості на плато співпадає з граничною швидкістю на залежностях типу Міхаеліса-Ментен для більш простих механізмів (без 1–2 стадій), в рамках яких ці залежності спостерігаються.

В реакціях, в яких утворюється більше, ніж один подвійний комплекс, може проявлятися ефект стрімкого зростання або стрімкого зниження швидкості реакції

при зростанні концентрації певного реагенту, внаслідок якого швидкість змінюється на порядки швидше, ніж концентрація.

Стрімке зростання та стрімке зниження швидкості може в деяких випадках відбуватись в одній реакції, що приводить до утворення вкрай вузьких та гострих піків.

Одним з головних факторів, що визначають набір властивостей системи, є кількість подвійних комплексів, що утворюються в ході реакції. Дослідивши залежності початкової швидкості ензиматичної реакції від концентрацій ензиму, субстрату та активатора, можна точно визначити, скільки подвійних комплексів утворюється в досліджуваній реакції: якщо утворюється лише один комплекс – всі залежності відносяться до типу Міхаеліса-Ментен (механізми 1–3, табл. 1), якщо утворюється три комплекси – всі залежності мають максимум (механізми 6, 9, 12, 14, 16, 18 та 19, табл. 1), якщо утворюється два комплекси – можна спостерігати як залежності типу Міхаеліса-Ментен, так і залежності з максимумом.

При цьому, якщо реакція протікає по одному шляху, то залежність початкової швидкості від концентрації одного компонента відноситься до типу Міхаеліса-Ментен, а залежності початкової швидкості від концентрацій двох інших компонентів (які зв'язуються в неактивний комплекс) утворюють максимум.

Якщо ж реакція протікає по двом шляхам (з утворенням двох подвійних комплексів), то залежність початкової швидкості від концентрації одного з компонентів (як раз того, який є учасником обох подвійних комплексів) утворює максимум, а залежність початкової швидкості від концентрації інших двох компонентів може бути або залежністю типу Міхаеліса-Ментен, або мати максимум, після якого початкова швидкість знижується до певного рівня і виходить на плато.

Наявність максимумів на залежностях початкової швидкості від концентрацій реагентів означає, що при певних константах швидкості існують оптимальні концентраційні умови, в яких швидкість набуває свого максимального значення. Причому, на відміну від моделі Міхаеліса-Ментен, максимальне значення швидкості спостерігається в більш вузьких концентраційних інтервалах. Існування максимумів дозволяє тонко регулювати метаболічні процеси.

Отримані результати дозволяють по новому пояснити деякі експериментальні дані з гідролізу АТФ та активному іонному транспорту.

Представлена кінетична схема цілком може бути застосована також і до інших ензиматичних реакцій, що протікають в присутності активаторів. Тому результати, отримані в нашому дослідженні, можуть бути застосовані при дослідженнях таких реакцій в повній мірі.

РОЗДІЛ 8

КІНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОЦЕСУ СКОРОЧЕННЯ-РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ *

У вищенаведених розділах цієї монографії мова переважно йшла за застосування методів формальної біохімічної кінетики до опису та аналізу ензиматичних перетворювань. Втім, формально кінетичний аналіз може бути цілком слушним та корисним й при вивченні та характеристиці макроскопічних біологічних (зокрема, фізіологічних) явищ, які вивчаються на рівні клітин, органів та систем органів.

У якості ілюстрації цієї тези нижче ми наводимо приклад застосування методів формально кінетичного аналізу до опису процесу скорочення-розслаблення гладенького м'язу та динаміки внутрішньоклітинного кальцієвого транзйенту.

Ізольований препарат гладенького м'язу є доброю моделлю, що широко використовується для дослідження механізмів електро- та фармако-механічного спряження, а також для скринінгу фармакологічної дії ліків на цикл скорочення-розслаблення в гладеньких м'язах [1, 2].

Однією з основних перешкод, що обмежує кількісний аналіз механізмів контролю циклу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів, є відсутність надійного методу кінетичного аналізу процесів скорочення-розслаблення. Вирішальним питанням стає визначення кінетичних параметрів, які коректно описують механічну відповідь різних гладеньких м'язів.

* Викладений в розділі 8 матеріал був опублікований у статтях:

Burdyga Th.V., Kosterin S.A.. Kinetic Analysis of Smooth Muscle Relaxation // *Gen. Physiol. Biophys.*– 1991.– Т. 10.– Р. 589–598.

Костерин С.А., Бурдыга Ф.В. Кинетический анализ процесса сокращения-расслабления гладких мышц // *Биофизика.*– 1990.– Т. 35, № 2.– С. 350–354.

8.1. Методичні аспекти

Основною метою даного дослідження було проаналізувати динаміку скорочень, спричинених різними гладенькими м'язами, і розробити метод кінетичного аналізу фази розслаблення на рівні різних моделей контрактильної активності.

Експериментальні дослідження проводили на гладеньких м'язах сечоводу морської свинки, *vas deferens*, воротної вени, міометрію щура.

Тварини були наркотизовані, гладенькі м'язи видаляли і тримали в модифікованому розчині Кребса наступного складу (мМ): NaCl – 120,3; KCl – 5,9; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,2; глюкоза – 11,5; Tris/HCl буфер (pH 7.4). 16.6 мМ гіперкалієвий розчин був виготовлений шляхом ізотонічної заміни частини NaCl на KCl.

Безнатрієвий розчин готували шляхом ізотонічної заміни всього NaCl на LiCl. В експериментальних дослідженнях, що потребували використання безкальцієвого розчину, в омиваюче середовище не вносили CaCl₂, але додавали хелатор іонів Ca²⁺ EGTA (1 мМ).

Ніфедипін та папаверин використовували відповідно як селективний та неселективний антагоністи Ca²⁺, щоб порівняти їх дію на кінетичні параметри фази розслаблення фазного скорочення гладенького м'язу сечоводу щура.

Методика суперфузії ретельно описана в роботі [3], вона була використана для ізометричних записів напруги смужок гладеньких м'язів за допомогою ізометричного перетворювача сили (механотрон 6MX1S) з доброю лінійністю та високою чутливістю.

Для стимуляції м'язів використовували як одиничні електричні імпульси (20 мс, 4–5 В) через платинові електроди, розташовані з кожної сторони камери, так і шляхом перфузії карбахолом (0,1 мМ). З допомогою комп'ютера обчислювали кінетичні параметри і коефіцієнт кореляції *r*.

8.2. Рівняння для описання кінетики фази розслаблення фазних скорочень

Кінетика фази розслаблення викликаних або спонтанних фазних скорочень різних гладеньких м'язів, як правило, має S-подібну форму з точкою перегину (рис. 1). У найпростішому випадку її можна описати наступним емпіричним рівнянням:

$$f = f_m \frac{\tau^n}{\tau^n + t^n} \quad (1)$$

де f_m – максимальне значення сили скорочення, що досягається в довільний момент часу $t = 0$, який взятий за стартову точку, від якої починається фаза розслаблення; τ – характеристичний час фази розслаблення (час напіврозслаблення); n – довільний емпіричний коефіцієнт.

Ми можемо розглядати емпіричний коефіцієнт n в якості логарифмічного декременту релаксації механічної напруги м'яза:

$$n = \frac{d \left\{ \ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right) \right\}}{dt} \quad (2)$$

Рівняння (1) можна подати у лінеаризованому вигляді:

$$\ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right) = -n \ln \tau + n \ln t \quad (3)$$

Справедливість рівняння (1) підтверджується наступними фактами.

По-перше, відповідно до рівняння (3), для всіх гладеньких м'язів, які були випробувані, кінетичні криві фази релаксації, пов'язані з потенціалами дії (рис. 1, криві *a–d*) або викидом Ca^{2+} із внутрішньоклітинних кальцієвих депо (рис. 1, крива *e*), добре лінеаризуються в координатах $\ln \left(\frac{f_m - f}{f} \right) - \ln t$ ($r = 0,97-0,99$) (рис. 2).

Точка перетину прямої, проведеної через експериментальні точки, з віссю абсцис, дає значення $\ln \tau$, а тангенс кута нахилу прямої дає значення n .

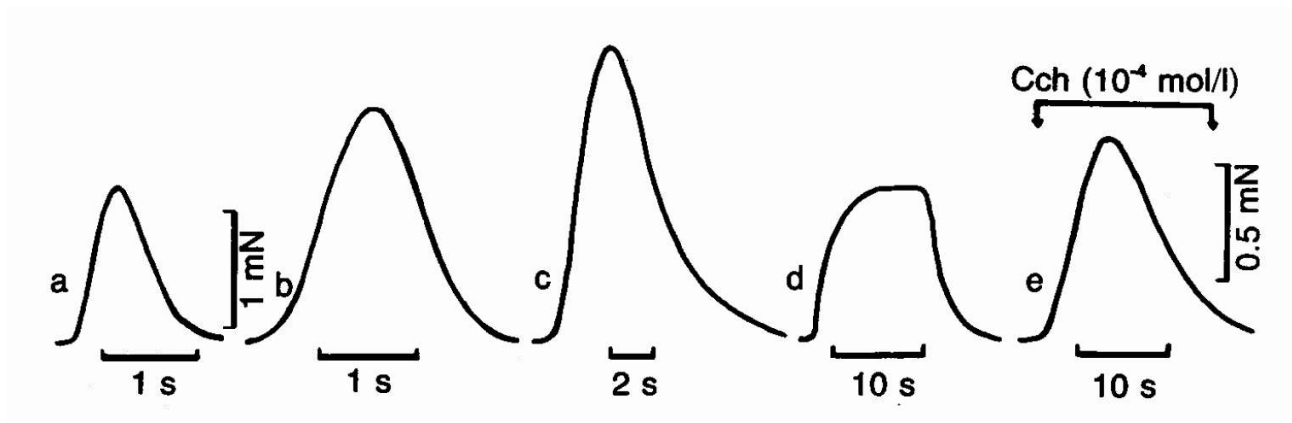


Рис. 1. Типові механокінетичні криві скорочення, що проявляються різними типами гладеньких м'язів спонтанно (криві *b* та *d*) або у відповідь на електричну (криві *a* та *c*) і карбахолову (Cch) (крива *e*) стимуляцію:

a – викликане фазне скорочення сечоводу щура при 36 °С;

b – спонтанне фазне скорочення воротної вени щура при 30 °С;

c – стимульоване фазне скорочення сечоводу щура при 29° С;

d – спонтанне фазне скорочення міометрія щура при 36° С;

e – Cch (0,1 мМ)-індукована контрактура сечоводу щура при 27 °С.

Викликані та спонтанні фазні скорочення були записані при використанні модифікованого розчину Кребса. Карбахол-індукована контрактура була записана у випадку безкальцієвого розчину в присутності 1 мМ EGTA та 126 мМ K⁺. Кожний сигнал був викликаний одним електричним імпульсом (4 В, 20 мс).

Відповідні значення τ і n , отримані в представлених експериментах для фази розслаблення фазних скорочень, становили 0,33 с та 2,4 (36 °С) для сечоводу морської свинки (рис. 2, крива *a*); 0,54 с та 2,6 (30 °С) для воротної вени щура (рис. 2, крива *b*); 1,10 с і 2,3 (26 °С) для сечоводу щура (рис. 2, крива *c*); 2,50 с і 2,5 (36 °С) для міометрія щура (рис. 2, крива *d*); 16.20 с та 2.0 для релаксації напруження у випадку карбахолової контрактури сечоводу щура (27 °С) (рис. 2, крива *e*).

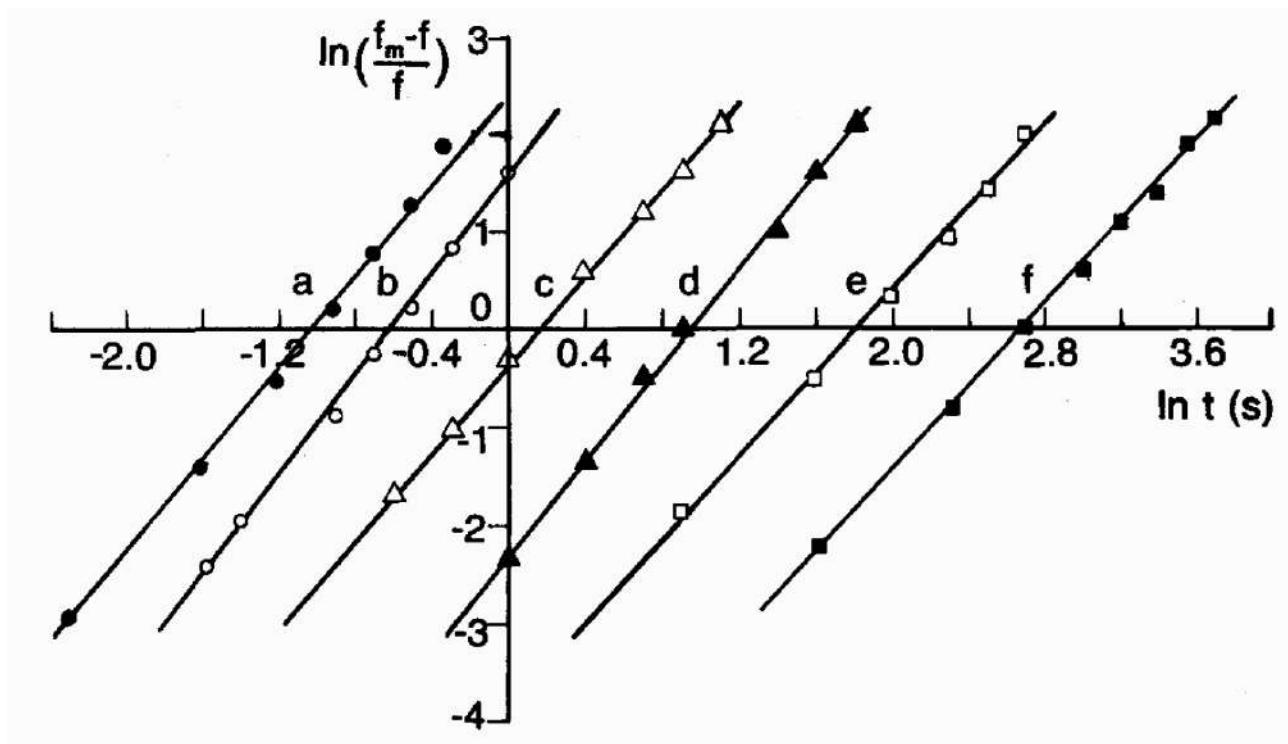


Рис. 2. Лінеаризовані графіки кінетичних кривих фази розслаблення скоротливих відповідей, а також релаксації кальцієвого транзйенту, індукованого іономіцином (1 мкМ) у гладеньком'язових клітинах аорти щура (безкальцієвий розчин, вимірювання з Fuga 2 (крива *f*) [4]). Графіки були побудовані у відповідності до рівняння (3).

По-друге, значення τ і n виявилися практично незалежними від максимальної сили скорочення f_m . На рис. 3 показаний один експеримент, в якому для трьох послідовних фазних скорочень (f_m 0,58 мН, 0,73 мН і 1,20 мН), записаних після повторного введення іонів Ca^{2+} в омиваючий розчин з наступною короткою (1–2 хв) експозицією тканини у безкальцієвому розчині, розраховані значення τ і n були 1,73 с і 2,1 ($r = 0,99$); 1,98 с і 2,2 ($r = 0,98$); і 1,98 с і 2,2 ($r = 0,99$) відповідно. Подібні результати були отримані в експериментах з амплітудою викликаних фазних скорочень м'язів сечоводу, що модулювалися зміною товщини препарату або шляхом модулювання входу Ca^{2+} ніфедипіном (1 мкМ) (табл. 1).

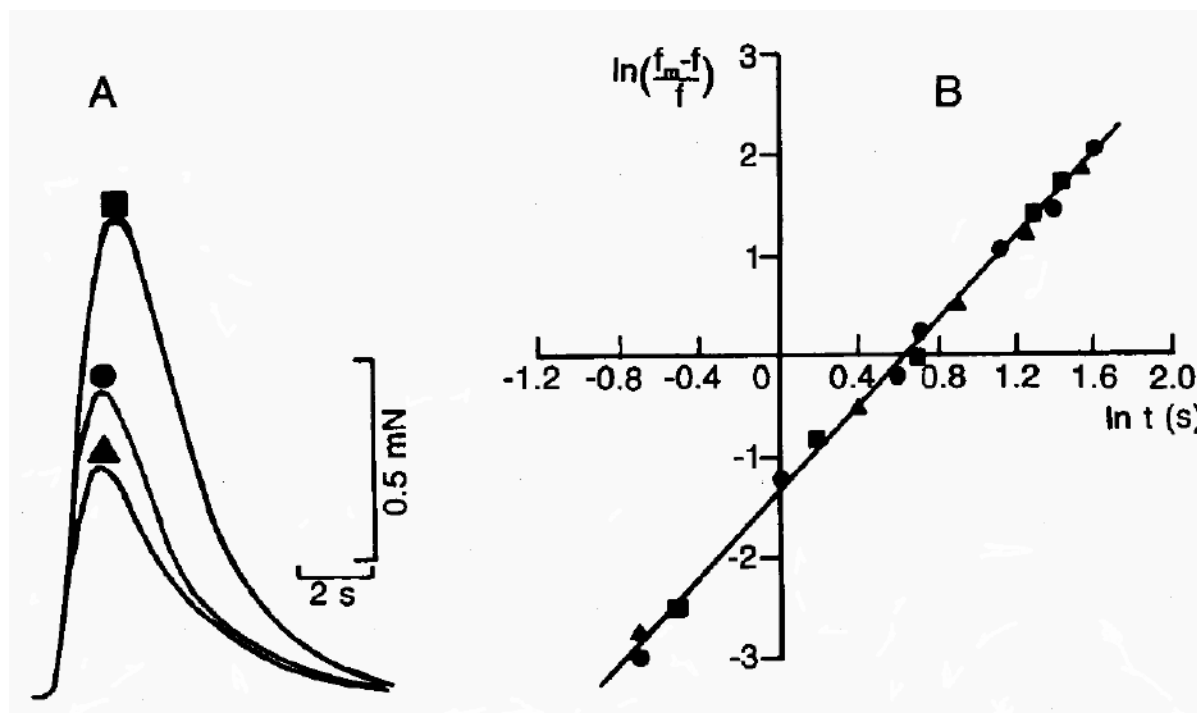


Рис. 3. Демонстрація незалежності кінетичних параметрів фази розслаблення від амплітуди фазного скорочення сечоводу щура. Значення f_m при 27 °С становили 0,58 мН (▲); 0,73 мН (●); 1,20 мН (■); відповідно.

А: Викликані фазні скорочення сечоводу щура; одиничні електричні імпульси (4 В, 20 мс) після повторного введення розчину Ca^{2+} в безкальцієвий розчин (див. текст для подробиць).

Б: Лінеаризація кінетичних кривих розслаблення фазних скорочень, представлених на рис. 3А.

По-третє, лінеаризація фази розслаблення у випадку скорочень гладеньком'язових препаратів, у відповідності до рівняння (3), зазвичай спостерігається в різноманітних експериментальних умовах (див. табл. 1).

Аналіз експериментальних записів, отриманих іншими дослідниками (див. табл. 2), показав, що рівняння (1) та (3) також коректно описують кінетику фази релаксації внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів у випадку серцевих та гладеньком'язових клітин незалежно від типу стимуляції, що використовувалась для отримання кальцієвого сигналу (рис. 2, крива f ; табл. 2). У цих розрахунках f_m та f в рівнянні (3) були замінені відповідними значеннями $[\text{Ca}^{2+}]_{i, \max}$ та $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вимірними за допомогою кальцієвого зонду Fura 2.

Таблиця 1. Кінетичні параметри фази розслаблення у випадку фазних скорочень сечоводу щура за різних експериментальних умов. Значення r знаходилось в межах 0.97–0.99.

Експериментальні умови	Температура, °С	f_{max} , мН	τ , с	n	V_n (відносні одиниці)
Кребс	36	1,1	0,32	2,7	2,40
0Na ⁺ (Li ⁺)	36	1,1	0,57	2,6	1,32
Кребс	37	0,4	0,30	2,7	2,50
Кребс	31	0,9	0,50	2,5	1,50
Кребс	26	1,2	1,40	2,4	0,50
Кребс	30	1,1	0,50	2,5	1,50
Кребс + ніфедипін (1 мкМ)	30	0,5	0,50	2,2	1,40
Кребс	22	1,4	2,40	2,4	0,30
Кребс + папаверин (0,1 мМ)	22	1,0	1,80	2,7	0,43

Таблиця 2. Значення емпіричних параметрів r і n , що були розраховані за рівнянням (3) для спонтанного затухання кальцієвих транзйєнтів при різного роду стимуляціях. Кальцієві транзйєнти реєстрували за допомогою кальцієвого зонду Fura-2 в клітинах серцевих та гладеньких м'язів. У всіх випадках значення r знаходилось в межах 0.98–0.99.

Тип м'язових клітин	Стимуляція	τ , с	n	Література
кардіоміоцити морської свинки	потенціал дії	0,16	2,5	[5]
міоцити повздошної кишки морської свинки (23 °С)	потенціал дії	1,30	2,3	[6]
міоцити аорти щура	ангіотензин (100 нМ)	11,00	2,0	[7]
міоцити аорти щура	іономіцин (1 мкМ)	14,30	2,0	[4]
міоцити аорти щура	іономіцин (1 мкМ)	19,00	2,00	[8]

8.3. Максимальна нормована швидкість релаксації механічної напруги

Таким чином, рівняння (1) та (3) адекватно описують кінетику як релаксації механічної відповіді, так і затухання кальцієвих транзєнтів, принаймні, у серцевих та гладеньком'язових клітинах. Відповідно до рівняння (1), миттєва швидкість розслаблення (v):

$$v = -\frac{df}{dt} = f_m \frac{n\tau^n t^{n-1}}{(\tau^n + t^n)^2} \quad (4)$$

Час $t = \theta$, при якому на кривій розслаблення спостерігається перегин (координати $[f_\theta; \theta]$) можна знайти за умови, що $\left(\frac{dV}{dt}\right)_{t=\theta} = 0$ з врахуванням рівняння (4):

$$\theta = \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^{\frac{1}{n}} \tau \quad (5)$$

Підставляючи замість t в рівнянні (4) θ з рівняння (5) для максимальної швидкості $V = v_{t=\theta}$, отримаємо:

$$V = \frac{f_m (n-1)^{\frac{n-1}{n}} (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \quad (6)$$

це значення може бути використане для отримання максимальної нормованої швидкості релаксації $\left(V_n = \frac{V}{f_m}\right)$:

$$V_n = \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \quad (7)$$

із значенням V_n , заданим у відносних одиницях сили за 1 с. Відповідно до рівняння (7) значення V_n не залежить від максимальної сили скорочення f_m , але визначається виключно значеннями параметрів τ і n . Це добре видно з даних, наведених на рис. 3.

Тут зростання сили скорочення від 0,58 мН до 1,2 мН призвело до пропорційного збільшення V від $0,2 \text{ мНс}^{-1}$ до $0,4 \text{ мНс}^{-1}$, залишаючи V_n практично незмінною (0,34–0,39 відносних одиниць за 1 с).

Таким чином, саме V_n є зручним параметром, який можна використовувати як коректну кількісну характеристику фази розслаблення транз'єнтних скорочень. Значення V_n , отримані для фази розслаблення фазних скорочень сечоводу, воротної вени, vas deferens та міометрія щура при $30 \text{ }^\circ\text{C}$, становили відповідно 1,40; 1,40; 0,90; 0,11 відносних одиниць сили за 1 с.

8.4. Кінетичний аналіз фази розслаблення механічної напруги для ідентифікації систем активного транспорту Ca^{2+}

Представлений метод кінетичного аналізу може бути використаний для ідентифікації систем активного транспорту Ca^{2+} , відповідальних за процес розслаблення в гладеньких м'язах.

У даному дослідженні ми можемо підтвердити залежність кінетичних параметрів фази розслаблення фазного скорочення сечоводу щура від різних факторів та агентів, які впливають на вхід Ca^{2+} в гладеньком'язові клітини або на його викачування. Релаксація у всіх типах м'язів, з загальноприйнятої точки зору, відбувається внаслідок видалення кальцієвими помпами Ca^{2+} , що надійшов у клітину внаслідок стимулюючого впливу [9].

З літературних даних відомо, що підтримання концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у гладеньких м'язах може контролюватися трьома основними системами: кальцієвою помпою та системою Na^+ - Ca^{2+} обміну плазматичної мембрани, а також кальцієвою помпою саркоплазматичного ретикулуму [2, 10, 11]. Є підстави стверджувати, що всі три системи функціонують у гладенькому м'язі сечоводу [12–14].

Ми змогли зафіксувати вплив видалення натрію на кінетичні параметри фази розслаблення викликаного фазного скорочення, коли весь NaCl був заміщений на LiCl. Табл. 1 ясно показує, що ця процедура викликала збільшення значення τ і зменшення в 2 рази значення V_n , залишаючи значення n практично незмінним.

Щоб розкрити можливе залучення енергозалежних кальцієвих pomp в процес релаксації, нами був досліджений вплив температури на кінетику фази розслаблення гладенького м'язу сечоводу. Відомо, що низька температура впливає на швидкість релаксації у всіх типах м'язів [15–18], а також мікросомальне АТР-індуковане поглинання Ca^{2+} [19]. Табл. 1 показує, що зниження температури викликає позитивний інотропний ефект і суттєво уповільнює релаксацію фазного скорочення сечоводу щура.

Блокатор кальцієвих каналів ніфедипін (1 мкМ), який справляє сильну негативну інотропну дію, практично не впливав на кінетику фази розслаблення фазного скорочення гладенького м'язу сечоводу щура (табл. 1).

З іншого боку, неселективний кальцієвий антагоніст папаверин (100 мкМ), який також справляв негативну інотропну дію на сечовід щура, викликав прискорення фази розслаблення фазного скорочення (табл. 1). З цього випливає, що, на відміну від ніфедипіну, папаверин може викликати прискорення роботи АТР-залежних кальцієвих pomp і може посилювати розслаблення за допомогою цього механізму.

Таким чином, лінеаризоване рівняння (3) достовірно описує зміни в динаміці розслаблення гладеньких м'язів, що викликані різними фізико-хімічними та фармакологічними чинниками.

8.5. Кінетичний аналіз фази розслаблення експериментальних механокінетичних кривих

Точна кількісна характеристика скоротливої відповіді є важливим кроком у вивченні її феноменології та взаємозв'язку механізмів збудження і скорочення в м'язовій тканині. Існує кілька методів кінетичного аналізу процесу скорочення-розслаблення різних м'язів [16, 17, 20]. На жаль, жоден із запропонованих методів не може бути застосований для характеристики всієї механокінетичної кривої релаксації. Наприклад, для серцевих м'язів людини або тварини початкова ділянка ізометричної релаксації описується квадратичною моноекспонентою, тоді

як остання частина описується загальною моноекспоненційною функцією [20]. Очевидно, що використання кількох емпіричних залежностей, які описують лише деякі окремі частини механокінетичної кривої релаксації, ускладнить точний кількісний кінетичний аналіз цього процесу та, зокрема, інтерпретацію експериментальних даних про механізми дії різних речовин, які модулюють скоротливу відповідь.

У даному дослідженні ми запропонували простий графічний метод, який можна використати для аналізу повних кінетичних кривих фази розслаблення при скороченні гладеньких м'язів.

Лінеаризація всієї механокінетичної кривої релаксації в координатах $\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) - \ln t$ (рис. 2) дозволяє визначити емпіричні параметри фази розслаблення n і τ , що дає можливість розрахувати важливу характеристику цього процесу – відносну максимальну швидкість розслаблення, V_n (див. рівняння (7)).

Як правило, лінеаризовані графіки характеризуються дуже високим значенням коефіцієнта кореляції ($r = 0.97-0.99$) (див. табл. 1). Це надійно показує, що емпіричне рівняння (1) точно описує повну кінетику фази розслаблення при скороченні гладеньких м'язів.

Помітно, що значення τ і n практично не залежать від сили скорочення (рис. 3). В основному цей факт дає можливість коректно порівнювати експериментальні дані, одержані різними авторами при дослідженні препаратів одного й того ж типу гладеньких м'язів, якщо ці препарати відрізняються за довжиною і товщиною смужок.

Запропонований метод адекватно описує процес релаксації як швидких (сечоводу, воротної вени), так і повільних (міометрій) гладеньких м'язів (рис. 2) у різних експериментальних умовах (табл. 1).

Слід зазначити, що в різних експериментальних умовах значення параметра n змінювалось мало (2,0–2,7), тоді як значення характеристичного часу τ змінювалось у широкому діапазоні (0,3–16 с) (рис. 2 і табл. 1).

Відносна максимальна швидкість розслаблення скоротливої відповіді V_n є основною об'єктивною динамічною характеристикою процесу релаксації в гладеньких м'язах. Фактично, V_n є максимальною швидкістю релаксації ізометричної сили, нормалізованої до амплітуди скорочення.

Наприклад, дані, наведені в табл. 1, наочно показують, що ізотонічна заміна Na^+ на Li^+ суттєво гальмує швидкість розслаблення, виражену величиною V_n , залишаючи максимальну силу скорочення сечоводу щура практично незмінною. Це свідчить про те, що в цій тканині Na^+ - Ca^{2+} обмін задіяний у контролі процесу релаксації [12, 14].

На швидкість розслаблення цих гладеньких м'язів суттєво впливало охолодження (при зниженні температури від 36°C до 26°C значення V_n зменшувалось у 3 рази), але не ніфедипін, який справляв виражену негативну інотропну дію на м'язи сечоводу, скорочуючи плато потенціалу дії [21]. Ці дані показують, що, у випадку гладенького м'язу сечовода, ніфедипін не впливає на температурозалежні транспортні системи Ca^{2+} , що беруть участь у процесі релаксації; ці результати дійсно підтверджують точку зору, що ніфедипін є специфічним кальцієвим антагоністом [22].

З іншого боку, використання параметра V_n дозволяє ідентифікувати вплив різних факторів, перевірених окремо, на фазу розслаблення, незважаючи на їх можливий вплив на амплітуду скорочення. Дія папаверину є гарним прикладом у цьому відношенні. Застосування цього препарату, який також блокує плато потенціалу дії м'язів сечоводу [21], приводило до 30 % зниження амплітуди скорочення. Також, на відміну від ніфедипіну, він значно (на 40 %) підвищував швидкість релаксації. Ці дані підтверджують думку про те, що папаверин є неселективним кальцієвим антагоністом [1]. Папаверин є потужним блокатором активності фосфодіестерази і може спричиняти підвищення рівня сАМР в міоплазмі [23], і, як відомо, стимулює АТР-керовані кальцієві помпи [24].

Зниження температури на 11°C призводило до сильного позитивного інотропного ефекту на гладенькі м'язи сечоводу (див. табл. 1); однак, з допомогою параметра V_n можна вірно оцінити ефект охолодження на кінетику фази

розслаблення, незважаючи на маскуючий вплив температури на амплітуду скорочення (табл. 1).

На наш погляд, параметр V_n може бути корисним при фармакологічному скринінгу механізмів дії різних речовин, що регулюють цикл скорочення-розслаблення в гладеньких та інших типах м'язів.

Аналіз даних, одержаних іншими авторами (див. табл. 2), показав, що запропонований метод кінетичного аналізу також можна застосувати для кількісного опису динаміки затухання кальцієвих транзєнтів, зарєєстрованих за допомогою Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних барвників, в гладеньком'язових клітинах, а також в кардіоміоцитах (рис. 2, крива f ; табл. 2).

Ми вважаємо, що використання методу механокінетичного аналізу фази розслаблення при скороченні та динаміки затухання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клітинах гладеньких м'язів відкриває перспективи тестування механізмів Ca^{2+} -залежного контролю процесу релаксації та виявлення функціональної ролі енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем, пов'язаних з плазматичною мембраною, саркоплазматичним ретикулумом або мітохондріями.

Таким чином, для кінетичного аналізу фази розслаблення механічної відповіді гладенького м'язу нами запропонований метод, що передбачає лінеаризацію повної механокінетичної кривої релаксації в координатах $\ln\left(\frac{f_m - f}{f}\right) - \ln t$ (де f_m та f максимальне та поточне значення сили у фазі розслаблення відповідно, t – час) з наступним розрахунком максимальної швидкості релаксації з нормованою амплітудою, V_n . Використання методу проілюстровано на гладеньких м'язах сечоводу, воротної вени, vas deferens, міометрія щура та сечоводу морської свинки в різних експериментальних умовах. Цей метод можна застосовувати для опису затухання кальцієвого транзєнту в міоплазмі, отриманого з використанням Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних барвників. Метод може бути використаний також для ідентифікації внеску різних енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем у процесі контролю релаксації, а також для скринінгу механізмів дії різних факторів, які модулюють цикл скорочення-розслаблення.

8.6. Кінетичний аналіз повного циклу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів

Ізольовані препарати гладеньких м'язів знайшли широке застосування при дослідженнях механізму електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньком'язових клітинах, проведенні фармакологічного скринінгу речовин-регуляторів контрактильної відповіді [25–27]. Тому важливого значення набуває коректне визначення кінетичних параметрів, що характеризують скоротливість гладеньких м'язів, та її зміни під дією фізіологічно активних і фармакологічних речовин.

Проте, на відміну від скелетних м'язів і міокарду [20, 28, 29], відомості про динамічні закономірності скорочення-розслаблення гладеньких м'язів вельми обмежені. Це є суттєвою перешкодою при проведенні кількісного аналізу внеску механізмів трансмембранного переносу Ca^{2+} в забезпечення скорочення-розслаблення, в пошуку ефективних регуляторів рівня концентрації Ca^{2+} в клітинах гладеньком'язової тканини, які викликають скорочення гладеньких м'язів.

У відповідності з вищевикладеним ми поставили перед собою мету дослідити динамічні закономірності повного циклу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів, розробити узагальнюючий метод кінетичного аналізу контрактильної активності гладеньком'язових препаратів.

При проведенні досліджень викликані потенціали дії й асоційовані з ними фазні ізометричні скорочення ізольованих смужок гладеньких м'язів сечоводу і *taenia coli* морської свинки реєстрували за допомогою методу подвійного сахарозного містка [30].

Склад нормального розчину Кребса (мМ): NaCl – 120,4; NaHCO_3 – 15,5; NaH_2PO_4 – 1,2; KCl – 5,9; CaCl_2 – 2,5; MgCl_2 – 4,2; глюкоза – 11,5; pH – 7,4; 37 °C.

Безнатрієві розчини готували шляхом ізоосмотичного заміщення NaCl на сахарозу, а NaHCO_3 і NaH_2PO_4 – на *трис*-HCl (pH 7,4).

В дослідах використовували моненсин фірми «Calbiochem» (США).

8.7. Рівняння для описання кінетичних кривих повного циклу скорочення-розслаблення гладенького м'язу

Результати фізіологічних експериментів [31, 32] свідчать про те, що графічна залежність сили f , що розвивається в процесі скорочення-розслаблення, від часу t має наступні особливості: дзвоноподібний вид кривої, що характеризується максимальним значенням сили f_m в момент часу $t = \tau_0$; наявність двох точок перегину з координатами $[f_c, \tau_1]$ і $[f_p, \tau_2]$ для фаз скорочення та розслаблення відповідно (рис. 4а). Такому ходу механокінетичної кривої задовольняють декілька різних емпіричних залежностей f від t [32], найбільш проста з них має вигляд

$$f = At^n e^{-kt} \quad (8)$$

де A , n і k – константи, причому з рівняння (8) випливає, що

$$A = \left(\frac{e}{\tau_0}\right)^n f_m = \left(\frac{ke}{n}\right)^n f_m \quad (9)$$

$$\tau_0 = \frac{\tau_1 + \tau_2}{2} = \frac{n}{k} \quad (10)$$

$$\tau_1 = \frac{n - n^{1/2}}{k}, \quad \tau_2 = \frac{n + n^{1/2}}{k} \quad (11)$$

Якщо f_i – значення сили на рівні фази скорочення в момент часу $t < \tau_0$, а f_j – значення сили на рівні фази розслаблення в момент часу $t + \Delta t > \tau_0$ ($\Delta t = \text{const}$) (рис. 4б), то, у відповідності до (1), можна записати:

$$\ln\left(\frac{f_j}{f_i}\right) = -k\Delta t + n \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right) \quad (12)$$

Дійсно, кінетичні криві скорочення-розслаблення гладеньких м'язів лінеаризуються в координатах $\ln\left(\frac{f_j}{f_i}\right) - \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right)$ (рис. 5).

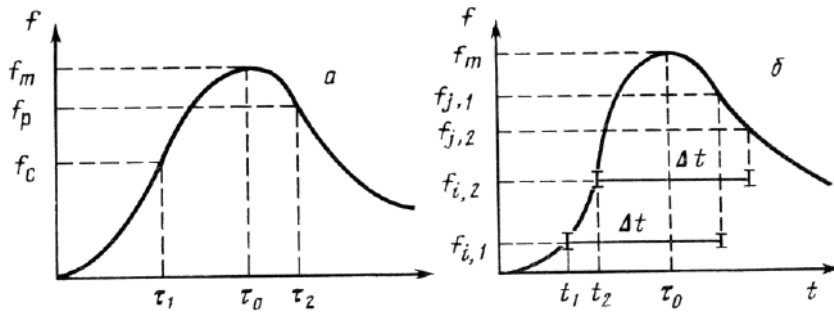


Рис. 4. Характерна кінетична крива циклу скорочення-розслаблення гладенького м'язу: *a* – характеристичні параметри механокінетичної кривої; *б* – обробка механокінетичної кривої з метою її лінеаризації.

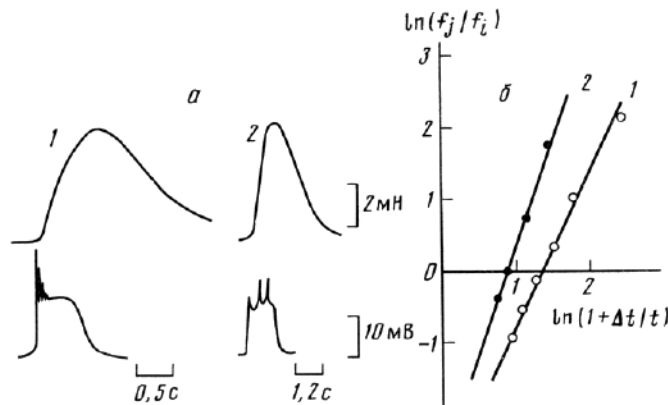


Рис. 5. Кінетика зміни сили фазного скорочення, асоційованого з викликаним потенціалом дії, у випадку гладеньких м'язів сечоводу (1) і *taenia coli* (2): *a* – викликана електрична (нижні криві) та механічна відповідь (верхні криві) гладеньких м'язів; *б* – лінеаризація механокінетичних кривих, перебудованих в координатах $\ln\left(\frac{f_j}{f_i}\right) - \ln\left(1 + \frac{\Delta t}{t}\right)$ у відповідності з рівнянням (5). Значення Δt у випадку 1 та 2 складають 1,0 і 1,2 с відповідно. Сечовід: $n = 2,5$; $k = 3,4 \text{ c}^{-1}$; *taenia coli*: $n = 3,5$; $k = 2,5 \text{ c}^{-1}$.

Факт лінеаризації повних механокінетичних кривих свідчить про те, що співвідношення (8) дійсно коректно описує повний цикл динаміки контрактильної відповіді гладеньких м'язів сечоводу і *taenia coli*.

У відповідності з виразом (12) константа k розраховується (при заданому значенні Δt) за величиною відрізка, що відсікається при екстраполяції лінійного графіка на вісь ординат, а константа n – за тангенсом кута нахилу.

У випадку препаратів гладеньких м'язів сечоводу і *taenia coli* значення n складають 2,5 і 3,5; а k – 3,4 і 2,5 с⁻¹ відповідно (рис. 5б). Необхідно зазначити, що величини n і k можуть мати різні значення для різних препаратів гладеньком'язових тканин в залежності від їх маси і геометричних параметрів, віку, гормонального стану тварин і т.д.

Виходячи зі співвідношень (8) і (9), для швидкості зростання сили скорочення-розслаблення гладеньких м'язів $v = \frac{df}{dt}$ одержуємо рівняння

$$v = \left(\frac{ke}{n}\right)^n e^{-kt} (nt^{n-1} - kt^n) \quad (13)$$

Підставляючи в рівняння (13) замість t вирази для τ_1 і τ_2 , що представлені рівняннями (11), для максимальних швидкостей наростання сили скорочення v_c та розслаблення v_p будемо мати

$$v_c = kf_m e^n \psi(-n) > 0 \quad (14)$$

$$v_p = kf_m e^n \psi(+n) < 0 \quad (15)$$

де $\psi(\pm n)$ – характеристична функція константи n , що визначається співвідношенням

$$\psi(\pm n) = \exp\left[-(n \pm n^{1/2})\right] \left[\left(\frac{n \pm n^{1/2}}{n}\right)^{n-1} - \left(\frac{n \pm n^{1/2}}{n}\right)^n \right] \quad (16)$$

Зручним параметром, який кількісно характеризує процес скорочення-розслаблення гладеньких м'язів та зміни в ході цього процесу, що відбуваються

внаслідок дії факторів, модифікуючих контрактильну активність (варіювання іонного складу омиваючого середовища, внесення в неї фармакологічних агентів і т.д.), є коефіцієнт швидкості χ , що визначається наступним чином:

$$\chi_c = \frac{v_c}{v'_c} \quad (\text{для фази скорочення}),$$

$$\chi_p = \frac{v_p}{v'_p} \quad (\text{для фази розслаблення})$$

(тут і надалі величини зі штриховим індексом і без нього характеризують процес скорочення-розслаблення гладеньких м'язів після і до дії модифікуючого фактору відповідно).

Згідно рівнянь (14) та (15) маємо

$$\chi_c = \frac{k}{k'} \frac{f_m}{f'_m} e^{(n-n')} \frac{\psi(-n)}{\psi(-n')} \quad (17)$$

$$\chi_p = \frac{k}{k'} \frac{f_m}{f'_m} e^{(n-n')} \frac{\psi(+n)}{\psi(+n')} \quad (18)$$

8.8. Кінетичний аналіз експериментальних механокінетичних кривих

Щоб проілюструвати запропонований нами метод кінетичного аналізу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів, ми дослідили вплив безнатрієвого середовища, Na^+ - H^+ -іонообмінника моненсину, а також зниження температури на контрактильну активність гладеньком'язової тканини сечоводу.

Ізотонічна заміна NaCl на сахарозу модифікувала як фазу скорочення, так і фазу розслаблення гладеньких м'язів сечоводу, при цьому спостерігалось зниження амплітуди скоротливої відповіді (величини f_m і f'_m складають 4,75 і 3,75 мН відповідно) (рис. 6).

Згідно значень χ_c та χ_p , розрахованим за допомогою (17) і (18), така заміна в 1,8 рази інгібувала максимальну швидкість скорочення, але ще більше (в 3,4 рази) – максимальну швидкість розслаблення.

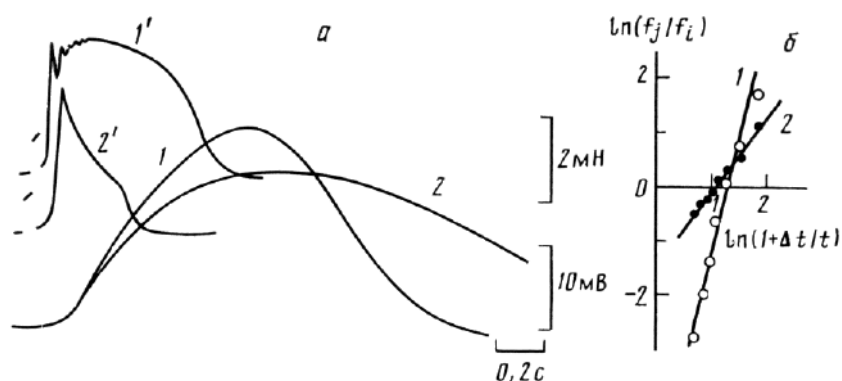


Рис. 6. Кінетика зміни силифазного скорочення гладенького м'язу сечоводу, викликаного потенціалом дії, у випадку середовища, що містить NaCl (120,4 мМ) та при ізотонічному заміщенні NaCl на сахарозу: *a* – викликані потенціали дії (1' і 2') та фазні скорочення (1 і 2) в безнатрієвому розчині (2' і 2) та в розчині, що містив натрій (1' і 1). Тут і в подальшому записи електричних та механічних відповідей накладені для наочності; *б* – лінеаризація механокінетичних кривих. В обох випадках $\Delta t = 1$ с. Середовище з NaCl: $n = 4,4$; $k = 6,0$ с⁻¹; середовище з сахарозою: $n' = 1,5$; $k' = 1,6$ с⁻¹.

Введення моненсину (20 мкМ) в омиваюче середовище також впливало на обидві фази процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів, пригнічуючи амплітуду скоротливої відповіді (величини f_m і f'_m дорівнюють 4,45 і 2,30 мН відповідно) (рис. 7). Згідно значень χ_c та χ_r моненсин в 2,4 рази інгібував максимальну швидкість скорочення і в 3,5 рази – максимальну швидкість релаксації.

Отримані дані про інгібуючу дію моненсину та ізотонічної заміни NaCl-сахароза на фазу скорочення гладеньких м'язів ($\chi_c > 1$) можна інтерпретувати наступним чином. В обох випадках відбувається значне скорочення протяжності плато потенціалу дії (рис. 6, 7), внаслідок чого знижується величина потоку іонів кальцію, що входить в клітину під час збудження.

Дійсно, блокатор електрокерованих кальцієвих каналів ніфедипін викликав аналогічне скорочення протяжності плато потенціалу дії, внаслідок чого амплітуда і швидкість наростання скоротливої відповіді гладеньких м'язів сечоводу знижувалась [21].

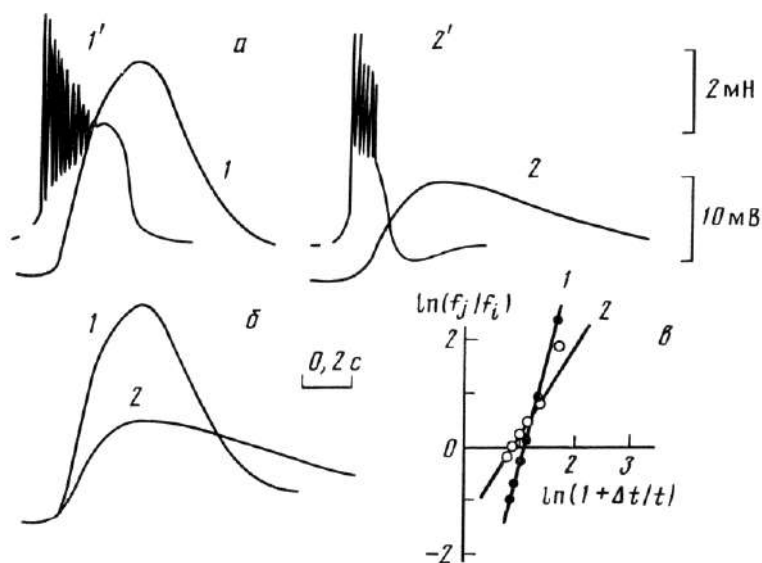


Рис. 7. Вплив моненсину (20 мкМ) на кінетику зміни сили, викликаного потенціалом дії, фазного скорочення гладенького м'язу сечоводу: *a* – викликані потенціали дії (1' і 2') та фазні скорочення (1 і 2) в нормі (1' і 1) та на 15-ій хвилині дії моненсину (2' і 2); *б* – накладення відповідних механічних відповідей; *в* – лінеаризація механокінетичних кривих. У випадках 1 та 2 значення $\Delta t = 0,9$ с. Контроль: $n = 4,0$; $k = 4,7$ с⁻¹; середовище з моненсином: $n' = 1,6$; $k' = 1,8$ с⁻¹.

Що стосується фази розслаблення, то отримані при заміщенні NaCl сахарозою і дії моненсину значення $\chi_p > 1$ можна пояснити, виходячи з уявлень про функціонування Na⁺-Ca²⁺-обмінника в сарколемі гладеньких м'язів [12].

Якщо іони Na відсутні в омиваючому середовищі, Na⁺-індукований викид іонів Ca²⁺ з міоцитів, що скоротились, не відбувається, що приводить до затримки зниження концентрації цього двовалентного катіону в міоплазмі і, відповідно, до зменшення швидкості розслаблення, потенціюванню релаксації (рис. 6).

Зменшення натрієвого градієнту, спрямованого всередину міоцитів, може бути досягнуто за рахунок підвищення внутрішньоклітинної концентрації Na⁺ при обробці гладеньком'язової тканини натрієвим іонофором моненсином, в результаті чого швидкість релаксації, що контролюється Na⁺-Ca²⁺-обмінником, також зменшується (рис. 7).

Зниження температури (37–22 °С) середовища, омиваючого гладеньком'язовий препарат, впливало як на фазу скорочення, так і на фазу розслаблення гладеньких м'язів (амплітуда скоротливої відповіді знижувалась від 5,1 до 3,4 мН) (рис. 8). Як у першому, так і в другому випадку цей вплив був досить значним: максимальна швидкість скорочення і релаксації зменшувалась в 5,7 рази ($\chi_c = \chi_p$).

Безперечно, дія охолодження на контрактильну здатність гладеньких м'язів є комплексною: в його основі лежить як мінімум інгібування АТРазної активності скоротливих білків, систем енергозалежного транспорту та пасивного зв'язування Ca^{2+} , зміна в'язкопружних і реологічних властивостей гладеньком'язової тканини.

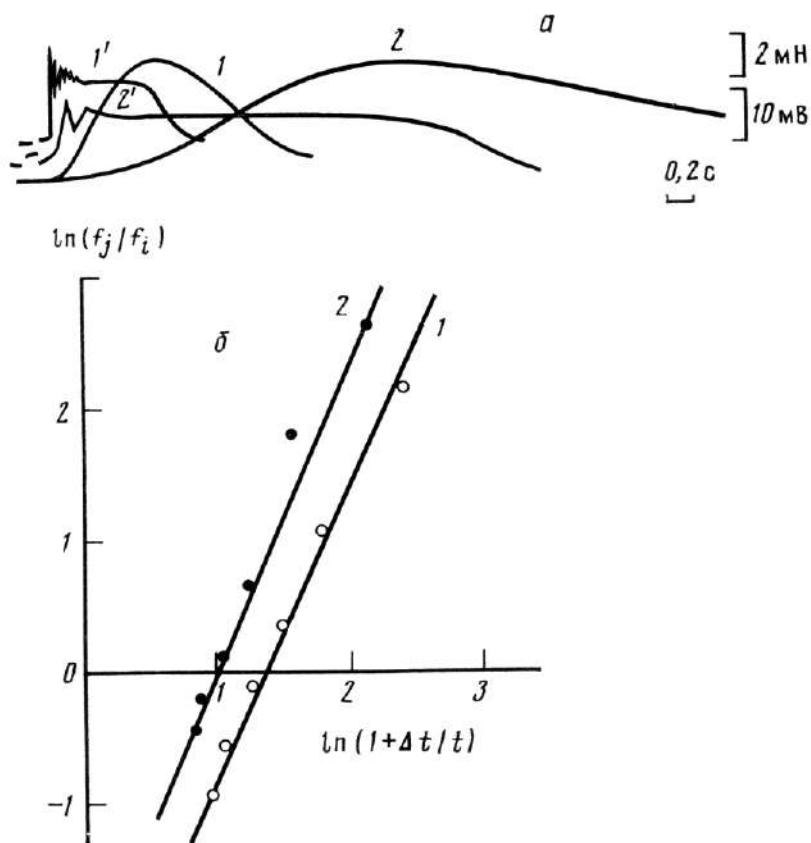


Рис. 8. Вплив температури на кінетику зміни сили, викликаній потенціалом дії, фазного скорочення гладенького м'язу сечоводу: *a* – викликані потенціали дії (1' і 2') та фазні скорочення (1 і 2) при 37 (1' і 1) та при 22 °С (2' і 2); *б* – лінеаризація механокінетичних кривих. У випадках 1 та 2 значення Δt складають 1 і 3 с відповідно. При 37 °С: $n = 2,5$; $k = 3,4 \text{ c}^{-1}$; при 22 °С: $n' = 2,5$; $k' = 0,9 \text{ c}^{-1}$.

Як видно, запропонований нами метод кінетичного аналізу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів, який базується на лінеаризації механокінетичної кривої та визначенні коефіцієнтів швидкостей χ_c і χ_p , дозволяє дати коректну кількісну інтерпретацію змін контрактильної активності гладеньком'язової тканини, що виникають під дією фізико-хімічних та фармакологічних факторів. Цей метод може бути корисним при дослідженнях закономірностей електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньких м'язах, при пошуку фармакологічних речовин – ефективних регуляторів контрактильної активності гладеньком'язових клітин.

ПІДСУМКИ

Безперечно, фундаментальна наука є основою пізнання закономірностей та механізмів протікання біологічних процесів. Втім, ПРИРОДА зовсім «не знає» про те, що дослідники, відповідно до своїх вподобань, схильностей, освіти, здібностей, знань, «диференціюють» її у форматі БІОЛОГІЇ, ФІЗИКИ, ХІМІЇ, МАТЕМАТИКИ. ВОНА – ЄДИНА!

Дійсно, найцікавіші фундаментальні проблеми сучасної біології, наприклад, у галузі вивчення механізмів ензиматичного каталізу, мембранного транспорту речовин, молекулярної рецепторики тощо, локалізовані саме на «перехресті» різноманітних наук і наукових напрямів. Вивчення таких фундаментальних проблем потребує активного залучення теорій, гіпотез, концепцій, бачень, уявлень, методів та методологій, які притаманні не лише біохімії, біофізиці та молекулярній біології, але й фізичній, колоїдній та супрамолекулярній хімії, хімії поверхні, термодинаміці та статистичній фізиці, хімічній фізиці, а також математиці та комп'ютерним технологіям.

Саме з цим пов'язане виникнення в останні десятиріччя таких трансдисциплінарних напрямів, як фізико-хімічна біологія, системна біологія, біофізична хімія, хімічна біофізика, фізична біохімія, біоматематика та біоінформатика, квантова біохімія, молекулярна фізіологія, біоінженерія, молекулярна медицина, інженерна ензимологія, технічна біохімія, біосенсорика, нанобіотехнологія, біохімія «*in silico*» тощо.

І тут треба відзначити, що у світовій літературі маємо велику кількість прикладів успішного та плідного застосування методів математики та комп'ютерних технологій до вивчення фундаментальних біологічних проблем.

В математичній біології серед таких методів традиційно особливе, навіть, можна сказати, пріоритетне, місце посідають методи кінетичного аналізу. Як вже підкреслювалося на сторінках цієї монографії, кінетика являє собою міждисциплінарний науковий напрям, що пов'язаний із вивченням явищ природи в динаміці їхнього розвитку, тобто у часі. Можна згадати багато прикладів використання кінетичних підходів, перш за все, в біохімії та біофізиці, але також в фармакології, фізіології, молекулярній імунології, онкології, мікробіології, біотехнології, екології. Проте в цій монографії автори намагалися акцентувати увагу переважно на деяких вибраних питаннях ензимологічної кінетики. Звичайно, ці питання віддзеркалюють особисті наукові інтереси авторів, які, головним чином, були акцентовані на тлумаченні формальнокінетичних властивостей елементарного ензиматичного акту, а також деяких інших біофізикохімічних процесів.

Нам здавалося, що при викладанні матеріалу в монографії, перш за все, було важливим зосередження уваги читачів на інтерпретації таких класичних характеристичних кінетичних ензимологічних параметрів, як істинні та уявні константи Міхаеліса, коефіцієнт інгібування I_{50} тощо. Ми намагалися приділити увагу й оцінці впливу оборотних ефекторів (зокрема, інгібіторів) на початкову швидкість ензиматичної реакції (система «ензим/переносник – субстрат – ефектор»). Також було розглянуте важливе методологічне питання: врахування в кінетичних розрахунках парціального внеску «паралельного» суто хімічного (неензиматичного) перетворення субстрату в загальну динаміку ензиматичної реакції, що реалізується за умов *in vitro*. Ми вважаємо, що такий аналіз є суттєвим для розуміння протікання біохімічної реакції у системі «проба» (субстрат + ензим) – «контроль» (субстрат); адже така система є головним об'єктом дослідження в експериментальній ензимології. Автори також зосередили увагу на описі методів кінетичного аналізу суперскладних кінетичних кривих у фізико-хімічній біології (на прикладі тлумачення механокінетичних кривих скорочення-розслаблення м'язів, а також внутрішньоклітинних кальцієвих транз'єнтів).

Як добре відомо, в основу хімічної кінетики покладено декілька універсальних положень. Перш за все, звичайно, мова йде за закон діючих мас, але також суттєво

важливими є принципи збереження загальної концентрації речовини в ізольованому хімічному реакторі (пробірка, кювета), незалежного протікання хімічних реакцій, стаціонарних концентрацій Боденштейна-Семенова та рівноважного наближення, а також принципи ізоляції та лімітуючої стадії багатостадійного процесу тощо.

Як свідчить досвід, закон діючих мас та зазначені принципи хімічної кінетики мають значний ступень узагальнення і, взагалі кажучи, можуть бути використані при описі динаміки будь-якого хімічного процесу. У цій монографії автори намагалися наочно проілюструвати, що використання закону діючих мас в принципі дозволяє проводити моделювання складних багатостадійних біохімічних реакцій. Втім, для таких реакцій в більшості випадків не вдається вивести рівняння початкової швидкості у аналітичному вигляді. Проте застосування математичних методів рішення диференціальних рівнянь дає можливість знайти розв'язок і провести теоретичний аналіз досліджуваної моделі. При цьому кінетичні дослідження можуть бути проведені для таких умов, яких практично неможливо дотримуватись при виконанні експерименту, і в результаті таких досліджень можуть бути розраховані концентрації всіх реагентів, що приймають участь в реакції, навіть тих, для яких це неможливо зробити експериментально. Проведення такого аналізу дозволяє знайти кінетичні особливості, що відрізняють дану реакцію від інших подібних реакцій, та визначити оптимальні умови проведення реакції.

Очевидно, що при моделюванні біохімічних реакцій треба завжди пам'ятати про наступне: відсутність співпадіння теоретичних розрахунків з експериментальними результатами свідчить про те, що обрана модель не відповідає реальній досліджуваній реакції. Якщо ж теоретичні розрахунки адекватно описують результати експерименту, то це ще зовсім не означає, що запропонована модель є єдиною, що відповідає досліджуваній реакції: адже можуть існувати й інші моделі, які будуть адекватно описувати відповідні експериментальні дані.

І такий результат можна оцінювати по-різному.

З одного боку це може свідчити про своєрідну «неоднозначність» Природи, кожне явище якої може бути описане різними моделями, або про те, що як би

детально не був досліджений конкретний процес, завжди будуть залишатися певні, не до кінця зрозумілі, його фрагменти.

Для дискримінації різних моделей в своїх дослідженнях необхідно покладатись не лише на кінетичні методи, але застосовувати й інші фізико-хімічні методи дослідження. І нам здається, що дуже влучною є цитата з книги «Основные законы химии» (Р.Дикерсон, Г.Грей, Дж.Хейт. Основные законы химии. Т. 2.– М.: Мир, 1982.– 620 с.): *«Ніколи не можна бути впевненим, що механізм реакції, який припускається, є абсолютно коректним; можна лише стверджувати, що він поки що не спростований. Варто постійно бути готовим до того, щоб змінити свою точку зору, коли цього будуть вимагати нові дані».*

З іншого боку, цю сентенцію можна сприймати як вказівку на факт нескінченності процесу Пізнання, що, безперечно, важливо з точки зору перспектив подальшого розвитку наукового пошуку.

Ми сподіваємося, що матеріал, наведений в монографії, буде корисним для зацікавлених читачів, які б хотіли опанувати навичками кількісного аналізу біохімічних та біофізичних процесів, зокрема на рівні використання технології «лінійної» (в графічному аспекті) інтерпретації кінетичних та концентраційних залежностей у фізико-хімічній біології, у тому числі при математичному моделюванні метаболічних перетворювань.

В цілому ж ми вважаємо, що подальший прогрес у галузі теоретичного та практичного вирішення різноманітних проблем сучасної біології та медицини неможливий без ґрунтовної підготовки біологів і медиків – студентів та аспірантів у сфері фундаментальних наук хімічного, фізико-хімічного та фізико-математичного циклів. Впевнені, що якісна освіта, всебічна підготовка наукових та науково-інженерних кадрів – фахівців у галузі природничих та технічних наук – запорука наукового, технологічного та соціального прогресу України!

Якщо погляди авторів монографії щодо застосування описаних в ній методів формальної кінетики у біохімії та біофізиці викличуть увагу з боку читачів, то ми будемо вважати свою задачу виконаною.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

До вступу

1. Hawking S. A Brief History of Time.– Bantam, 1998.– 240 p.
2. Rovelli C. What is time? What is space?.– Di Renzo, 2006.– 70 p.
3. The Arrows of Time: A Debate in Cosmology. In Fundamental Theories of Physics. Vol. 172. / Edited by L. Mersini-Houghton, R. Vaas.– Springer-Verlag, 2012.– 222 p.
4. Taylor W.B. Kinetic Theories of Gravitation. In The Perfect Library.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016.– 114 p.
5. Flinta J.E. Kinetic Energy, the Driving Force of Our Universe.– Createspace, 2010.– 46 p.
6. Bernstein J. Kinetic Theory Expanding Universe. In Cambridge Monographs on Mathematical Physics.– Cambridge University Press, 2004.– 160 p.
7. LaViolette P.A. Subquantum Kinetics: A System Approach to Physics and Cosmology. 2nd Ed.– Starlane, 2003.– 318 p.
8. Uchaikin V.V. Fractional Kinetics in Space: Anomalous Transport Models.– World Scientific Publishing, 2018.– 300 p.
9. Benz A.O. Plasma Astrophysics: Kinetic Processes in Solar and Stellar Coronae. In Astrophysics and Space Science Library. Vol. 184. – Springer, 1993.– 320 p.
10. Rimstidt J.D. Geochemical Rate Models: An Introduction to Geochemical Kinetics.– Cambridge University Press, 2014.– 232 p.
11. Kreuzer H.J., Gortel Z.W. Physisorption Kinetics. In Springer Series in Surface Sciences. Vol. 1.– Springer, 2011.– 328 p.
12. Yiacomou S., Tien C. Kinetics of Metal Ion Adsorption from Aqueous Solutions: Models, Algorithms, and Applications.– Springer, 1995.– 221 p.
13. Sonntag H., Strenge K. Coagulation Kinetics and Structure Formation.– Springer, 2013.– 180 p.

14. Mandelkern L. Crystallization of polymers. Vol. 2. Kinetics and mechanisms. 2nd Ed.– CUP, 2004.– 478 p.
15. Gerasimov D.N., Yurin E.I. Kinetics of Evaporation. In Springer Series in Surface Sciences. Vol. 68.– Springer, 2018.– 321 p.
16. Beltran F.J. Ozone Reaction Kinetics for Water and Wastewater Systems.– CRC Press, 2003.– 384 p.
17. Readey D.W. Kinetics in Materials Science and Engineering.– CRC Press, 2017.– 636 p.
18. Ray H., Ray S.. Kinetics of Metallurgical Processes.– Springer Singapore, 2018.– 455 p.
19. Копосов Е.Б. Кинетика ядерных реакторов.– М., Изд-во МГТУ, 2005.– 68 с.
20. Gusak A.M., King-Ning T. Kinetics in Nanoscale Materials. 2nd Ed.– John Wiley & Sons, 2014.– 312 p.
21. Yabuki K. Photosynthetic Rate and Dynamic Environment.– Kluwer Academic Publishers, 2004.– 126 p.
22. Sadana A., Sadana N., Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics.– Elsevier Science, 2010.– 536 p.
23. Kinetics and Dynamics: From Nano- to Bio-Scale. In Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics. Vol. 12. / Series Editor: J. Leszczynski, Volume Editors: P. Paneth, A. Dybala-Defratyka.– Springer Science+Business Media, 2010.– 530 p.
24. Воронцов Н.Н. Эволюция. Видообразование. Система органического мира.– М.: Наука, 2005.– 394 с.
25. Yuan M. Human Dynamics in Space and Time: A Brief History and a View Forward. // Transactions in GIS.– 2018.– Vol. 22, N 4.– P. 900–912.
26. Математические модели природы и общества / Н.Н. Калиткин, Н.В. Карпенко, А.П. Михайлов, В.Ф. Тишкин, М.В. Черненко.– М.: Физматлит, 2005.– 360 с.
27. Goswami S., Chakraborti A. Kinetic Exchange Models in Economics and Sociology. In Nonlinear Maps and their Applications. Springer Proceedings in

Mathematics & Statistics. Vol. 112. / Edited by R. López-Ruiz, D. Fournier-Prunaret, Y. Nishio, C. Grácio.– Springer, 2015.– P. 69–88.

28. Galam S. Sociophysics: A Physicist's Modeling of Psycho-Political Phenomena. In *Understanding Complex Systems*.– Springer-Verlag New York, 2012.– 439 p.

29. Weidlich W. Sociodynamics: A Systematic Approach to Mathematical Modelling in the Social Sciences. In *Dover Books on Mathematics*.– Dover Publications, 2006.– 400 p.

30. Mathematical Modeling of Collective Behavior in Socio-Economic and Life Sciences. In *Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology* / Edited by G. Naldi, L. Pareschi, G. Toscani.– Springer Science+Business Media, 2010.– 438 p.

31. Turchin P. Historical Dynamics: Why States Rise and Fall. In *Princeton Studies in Complexity*. Vol. 8.– Princeton University Press, 2003.– 264 p.

32. Prigogine I., Herman R.C. Kinetic Theory of Vehicular Traffic.– Elsevier, 1971.– 100 p.

33. Hammes G.G. Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences.– Wiley-Interscience, 2000.– 192 p.

34. Biothermodynamics: The Role of Thermodynamics in Biochemical Engineering / Edited by U. von Stockar.– EPFL Press, 2013.– 380 p.

35. Zuckerman D.M. Statistical Physics of Biomolecules: An Introduction.– CRC Press, 2010.– 356 p.

36. Chemical and Biochemical Physics, Kinetics and Thermodynamics: New Perspectives / Edited by P.E. Stott, G.E. Zaikov, V.F. Kablov.– Nova Science Publishers, 2008.– 256 p.

37. P. Atkins, J. de Paula. Physical Chemistry for the Life Sciences. 2nd Ed.– Oxford University Press, 2015.– 624 p.

38. Burshtein A.I. Introduction to Thermodynamics and Kinetic Theory of Matter. In *Physics Textbook*. 2nd Ed.– Wiley-VCH, 2005.– 349 p.

39. R. Holze. Electrochemical Thermodynamics and Kinetics. In *Landolt-Börnstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology - New Series*. Vol. 9: Electrochemistry. 2007th Ed.– Springer, 2012.– 427 p.

40. Story T.L.. *Mathematical Modeling I: Kinetics, Thermodynamics and Statistical Mechanics*. 2nd Ed. – The Educational Publisher / Biblio Publishing, 2015.– 296 p.
41. Riyazuddin P.. *Computers in Chemistry*.– I.K.International Publishing House, 2011.– 440 p.
42. Prinz H. *Numerical Methods for the Life Scientist: Binding and Enzyme Kinetics Calculated with GNU Octave and MATLAB*.– Springer, 2011.– 149 p.
43. Pavé A. *Modeling of Living Systems: From Cell to Ecosystem*. In *Environmental Engineering Series*.– Wiley-ISTE, 2012.– 620 p.
44. Bellouquid A., Delitala M. *Mathematical Modeling of Complex Biological Systems: A Kinetic Theory Approach*. In *Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology*.– Birkhäuser Boston, 2006.– 188 p.
45. Malcata F.X. *Mathematics for Enzyme Reaction Kinetics and Reactor Performance*. (2 Vol. Set). In *Enzyme Reaction Engineering*.– Wiley, 2019.– 1152 p.
46. *Modeling and Computational Methods for Kinetic Equations*. In *Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology* / Edited by P. Degond, L. Pareschi, G. Russo.– Birkhäuser, 2004.– 300 p.
47. Demin O., Goryanin I.. *Kinetic Modelling in Systems Biology*. In *Chapman & Hall/CRC Mathematical and Computational Biology*.– Chapman and Hall/CRC, 2008.– 360 p.
48. Bourne D.W.A. *Mathematical Modeling of Pharmacokinetic Data*.– CRC Press, 1995.– 152 p.
49. *Tutorials in Mathematical Biosciences II: Mathematical Modeling of Calcium Dynamics and Signal Transduction*. In *Lecture Notes in Mathematics*. Vol. 1867. *Mathematical Biosciences Subseries* / Edited by J. Sneyd.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.– 202 p.
50. Kee R.J., Coltrin M.E., Glarborg P., Zhu H. *Chemically Reacting Flow: Theory, Modeling, and Simulation*. 2nd Ed.– Wiley, 2017.– 792 p.
51. Ладиков-Роев Ю.П., Черемных О.К. *Математические модели сплошных сред*.– К.: Наукова думка, 2010.– 552 с.

52. Аристов В.В, Забелок С.А., Фролова А.А. Моделирование неравновесных структур кинетическими методами.– М.: Физматкнига, 2017.– 267 с.
53. Lipoprotein Kinetics and Modeling / Edited by Berman M.– Academic Press, 2012.– 510 p.
54. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. В 10 томах. Том 10. Физическая кинетика. 2-е изд, испр.– Физматлит, 2007.– 536 с.
55. Moravetz K. Interacting Systems far from Equilibrium: Quantum Kinetic Theory.– Oxford University Press, 2018.– 608 p.
56. Alexeev V.V. Generalized Boltzmann Physical Kinetics.– Elsevier, 2004.– 376 p.
57. Bikkin H., Lyapilin I.I. Non-Equilibrium Thermodynamics and Physical Kinetics.– De Gruyter, 2014.– 359 p.
58. Demirel Y. Nonequilibrium Thermodynamics: Transport and Rate Processes in Physical, Chemical and Biological Systems. 3rd Ed.– Elsevier Science, 2014.– 792 p.
59. Nolting W. Theoretical Physics 3: Electrodynamics.– Springer, 2016.– 659 p.
60. Landau L.D., Lifshitz E.M., Pitaevskii L.P. Landau and Lifshitz Course Of Theoretical Physics. Vol. 8. Electrodynamics of Continuous Media. 2nd Ed.– Elsevier India, 2013.– 460 p.
61. Meyer O.E. The Kinetic Theory of Gases: Elementary Treatise With Mathematical Appendices.– Sagwan Press, 2015.– 500 p.
62. Rate Constant Calculation for Thermal Reactions: Methods and Applications / Edited by H. DaCosta, M. Fan.– John Wiley & Sons, 2012.– 360 p.
63. Kinetic Processes in Gases and Plasmas / Edited by A.R. Hochstim.– Academic Press, 2012.– 472 p.
64. Swanson D.G. Plasma Kinetic Theory. In Series in Plasma Physics. Vol. 23.– Chapman and Hall/CRC, 2008.– 344 p.
65. Diamond P.H., Itoh S.-I., Itoh K. Modern Plasma Physics. Vol. 1. Physical Kinetics of Turbulent Plasmas.– CUP, 2010.– 434 p.
66. Загородній А.Г., Момот А.І.. Вступ до кінетичної теорії плазми.– К.: Наук. Думка, 2015.– 458 с.

67. Soto R. Kinetic Theory and Transport Phenomena. In Oxford Master Series in Physics. Vol 25.– Oxford University Press, 2016.– 304 p.
68. Haug H., Jauho A.-P. Quantum Kinetics in Transport and Optics of Semiconductors. In Springer Series in Solid-State Sciences. Vol. 123. 2nd Ed.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.– 362 p.
69. Stöhr J., Siegmann H. C. Magnetism: From Fundamentals to Nanoscale Dynamics. In Springer Series in Solid-State Sciences. Vol. 152.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.– 822 p.
70. Fast Ion Transport in Solids. In NATO ASI Series. Series E: Applied Sciences. Vol. 250 / Edited by B. Scrosati, A. Magistris, C. M. Mari, G. Mariotto.– Springer Netherlands, 1993.– 374 p.
71. Bezryadin A. Superconductivity in Nanowires: Fabrication and Quantum Transport.– Wiley-VCH, 2012.– 282 p.
72. Bonitz M. Quantum Kinetic Theory. 2nd Ed.– Springer, 2016.– 406 p.
73. Kinetics of Phase Transitions / Edited by S. Puri, V. Wadhawan.– CRC Press, 2009.– 346 p.
74. Slezov V.V. Kinetics of First Order Phase Transitions.– Wiley-VCH, 2009.– 429 p.
75. Beard D.A., Qian H. Chemical Biophysics: Quantitative Analysis of Cellular Systems. In Cambridge Text in Biomedical Engineering.– Cambridge University Press, 2008.– 330 p.
76. Phillips R., Kondev J., Theriot J., Garcia H. Physical Biology of the Cell. 2nd Ed.– Garland Science, 2012.– 1088 p.
77. Cercignani C. Mathematical Methods in Kinetic Theory.– Springer, 1990.– 252 p.
78. Mackey M.C. Ion Transport through Biological Membranes: An Integrated Theoretical Approach. In Lecture Notes in Biomathematics. Vol. 7.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1975.– 242 p.
79. Friedman M.H. Principles and Models of Biological Transport. 2nd Ed.– Springer-Verlag New York, 2008.– 510 p.

80. Walters R.J. Ion Channel Kinetics: A conceptual approach.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2017.– 250 p.
81. Matthews J.C. Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics. In CRC Press Revivals.– CRC Press, 2019.– 182 p.
82. Rall J.A. Mechanism of Muscular Contraction. In Perspectives in Physiology.– Springer-Verlag New York, 2014.– 471 p.
83. Morel J.E. Molecular and Physiological Mechanisms of Muscle Contraction.– CRC Press, 2015.– 350 p.
84. Hancock J.T. Cell Signalling. 4th Ed.– Oxford University Press, 2017.– 400 p.
85. Nelson J. Structure and Function in Cell Signalling.– Wiley, 2008.– 410 p.
86. Костюк П.Г., Костюк О.П., Лук'янець О.О. Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури та функції.– Київ: Наукова думка, 2010.– 176 с.
87. Signal Transduction and Smooth Muscle. In Methods in Signal Transduction Series / Edited by M. Trebak, S. Earley.– CRC Press, 2018.– 432 p.
88. Nolting B. Protein Folding Kinetics: Biophysical Methods. 2nd Ed.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.– 222 p.
89. C.M. Gomes, P.F.N. Faisca. Protein Folding: An Introduction. In SpringerBriefs in Molecular Science: Protein Folding and Structure.– Springer, 2019.– 63 p.
90. Connors K.A. Chemical Kinetic: The Study of Reaction Rates in Solution.– John Wiley & Sons, 1990.– 480 p.
91. Espenson J.H. Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms. 2nd Ed.– McGraw-Hill Education, 2002.– 296 p.
92. Advances in Kinetics and Mechanism of Chemical Reactions / Edited by G.E. Zaikov, A.J.M. Valente, A.L. Iordanskii.– Apple Academic Press, 2013.– 238 p.
93. Пятницький Ю.І., Орлик С.М. Кінетика і механізм гетерогенно-каталітичних реакцій.– К.: Науковий світ, 2009.– 46 с.
94. Metiu H. Physical Chemistry: Kinetics.– Taylor & Francis, 2006.– 192 p.
95. Engel T., Reid P. Physical Chemistry: Thermodynamics, Statistical Thermodynamics, and Kinetics. 4th Ed.– Pearson, 2018.– 672 p.

96. Atkins P., de Paula J. *Physical Chemistry: Thermodynamics, Structure, and Change*. Vol. 1: Thermodynamics and Kinetics. 10th Ed.– W. H. Freeman, 2014.– 528 p.
97. Темкин О.Н., Одинцов К.Ю., Брук Л.Г. *Приближения квазистационарности и квазиравновесия в химической кинетике*.– М.:МИТХТ, 2001.– 79 с.
98. Vallance C. *An Introduction to Chemical Kinetics*.– IOP Concise Physics, 2017.– 79 p.
99. House J.E. *Principles of Chemical Kinetics*, 2nd Ed.– Academic Press, 2007.– 336 p.
100. Wright M.R. *Introduction to Chemical Kinetics*.– Wiley-Interscience, 2004.– 562 p.
101. Farrington D. *Chemical Kinetics*.– Franklin Classics, 2018.– 288 p.
102. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. *Курс химической кинетики*. 4-е изд. М.: Высшая школа, 1984, 463 с.
103. Skinner G.B. *Introduction to Chemical Kinetics*.– Academic Press, 2012.– 224 p.
104. Gates S. *Chemical Kinetics*.– Willford Press, 2016.– 275 p.
105. Denisov E.T., Sarkisov O.M., Likhtenshtein G.I. *Chemical Kinetics: Fundamentals and New Developments*.– Elsevier, 2011.– 568 p.
106. Ancheyta J. *Chemical Reaction Kinetics: Concepts, Methods, and Case Studies*.– John Wiley & Sons, 2017.– 304 p.
107. Berry R.S., Rice S.A., Ross J. *Physical and Chemical Kinetics*. In *Topics in Physical Chemistry*. 2nd Ed.– Oxford University Press, 2001.– 276 p.
108. *Chemical Kinetics: Beyond the Textbook* / Edited by K. Lindenberg, R. Metzler, G. Oshanin.– World Scientific, 2019.– 476 p.
109. Arnaut L., Formosinho S., Serpa C. *Chemical Kinetics. From Molecular Structure to Chemical Reactivity*. 2nd Ed.– Elsevier, 2019. – 600 p.
110. Wojciechowski B.W., Rice N.M. *Experimental Methods in Kinetic Studies*. Rev. Ed.– Elsevier Science, 2003.– 310 p.
111. Chorkendorff I., Niemantsverdriet J. W. *Concepts of Modern Catalysis and Kinetics*. 3rd Ed.– John Wiley VCH, 2017.– 524 p.

112. Vannice M.A. Kinetics of Catalytic Reactions.– Springer, 2005. –240 p.
113. Helfferich F.G. Kinetics of Multistep Reactions. In Comprehensive Chemical Kinetics. Vol. 40. 2nd Ed. / Edited by N.J.B. Green.– Elsevier Science, 2004.– 508 p.
114. Steinfeld J.I., Francisco J.S., Hase W.L. Chemical Kinetics and Dynamics. 2nd Ed.– Pearson, 2009.– 528 p.
115. Temkin O.N., Zeigarnik A.V., Bonchev D.G. Chemical Reaction Networks. A Graph-Theoretical Approach.– CRC Press, 1996.– 304 p.
116. Marin G.B., Yablonsky G.S., Constales D. Kinetics of Chemical Reactions: Decoding Complexity. 2nd Ed.– Wiley-VCH, 2019.– 464 p.
117. Grey P., Scott S.K. Chemical Oscillations and Instabilities: Non-linear Chemical Kinetics. In International Series of Monographs on Chemistry. Vol. 21.– Clarendon Press, 1994.– 472 p.
118. Deb P. Kinetics of Heterogeneous Solid State Processes. In SpringerBriefs in Materials.– Springer, 2014.– 60 p.
119. Semenov N.N. Some Problems in Chemical Kinetics and Reactivity. Vol. 2. In Princeton Legacy Library. Vol. 5077. – Princeton University Press, 2017.– 254 p.
120. Turányi T., Tomlin A.S. Analysis of Kinetic Reaction Mechanisms.– Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016.– 376 p.
121. Ašperger S. Chemical Kinetics and Inorganic Reaction Mechanisms. 2nd Ed.– Springer US, 2003.– 361 p.
122. Inorganic/Bioinorganic Reaction Mechanisms. In Advances in Inorganic Chemistry. Vol. 64.– Academic Press, 2012.– 320 p.
123. Reaction Rate Constant Computations: Theories and Applications. In RSC Theoretical and Computational Chemistry Series. Vol. 6. / Edited by K. Han, T. Chu.– Royal Society of Chemistry, 2013.– 572 p.
124. Singh O., Kaushik R.D., Singh J. Stopped Flow Kinetics for Evaluation of Stability Constant.– LAP LAMBERT Academic Publishing, 2018.– 140 p.
125. Albert A., Serjeant E.P. The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual. 3rd Ed.– Springer, 2001.– 218 p.

126. Korobov V., Ochkov V. Chemical Kinetics with Mathcad and Maple.– Springer, 2011.– 344 p.
127. Нарышкин Д.Г. Кинетика химических реакций. Возможности компьютерной математики при исследовании поведения химических систем во времени.– М.: МЭИ, 2009.– 190 с.
128. В. Barnes, G.R. Fulford. Mathematical Modelling with Case Studies: Using Maple and MATLAB. In Textbooks in Mathematics. 3rd Ed.– Chapman and Hall/CRC, 2014.– 388 p.
129. Connors K.A. Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability.– Wiley-Interscience, 1987.– 432 p.
130. Denisov E.T. Liquid-Phase Reaction Rate Constants.– Springer, 2012.– 800 p.
131. Kinetics for the Life Sciences: Receptors, Transmitters and Catalysts / Edited by H. Gutfreund.– CUP, 1995.– 360 p.
132. Hermans J., Lentz B. Equilibria and Kinetics of Biological Macromolecules.– John Wiley & Sons, 2013.– 524 p.
133. Biocalorimetry: Foundations and Contemporary Approaches / Edited by M. Bastos.– CRC Press, 2016.– 416 p.
134. Photokinetics. Vol. 36. Theoretical Fundamentals and Applications. In Comprehensive Chemical Kinetics / Edited by R.G. Compton, G. Hancock.– Elsevier Science, 1998.– 554 p.
135. Klappa P. Kinetics for Bioscientist.– Peter Klappa and Ventus Publishing ApS, 2009.– 221 p.
136. Applications of Kinetic Modelling. In Comprehensive Chemical Kinetics. Vol. 37. / Edited by G. Hancock, R.G. Compton.– Elsevier Science, 1999.– 713 p.
137. Modeling of Chemical Reactions. In Comprehensive Chemical Kinetics. Vol. 42. / Edited by N.J.B. Green, Volume Editor: R.W. Carr.– Elsevier Science, 2007.– 316 p.
138. Coker A.K. Modeling of Chemical Kinetics and Reactor Design.– Gulf Professional Publishing, 2001.– 1136 p.

139. Reaction Kinetics and the Development of Catalytic Processes. In *Studies in Surface Science and Catalysis*. Vol. 122: Proceedings of the International Symposium, Brugge, Belgium, April 19-21, 1999 / Edited by G.F. Froment, K.C. Waugh.– Elsevier Science, 1999.– 475 p.
140. Hill C.G., Root T.W. *Introduction to Chemical Engineering Kinetics and Reactor Design*. 2nd Ed.– Wiley, 2014.– 576 p.
141. Butt J.B. *Reaction Kinetics and Reactor Design*.– CRC Press, 2000.– 752 p.
142. McDuffie N.G. *Bioreactor Design Fundamentals*.– Butterworth-Heinemann, 2013.– 150 p.
143. Haefner J.W. *Modeling Biological Systems: Principles and Applications*. 2nd Ed.– Springer, 2005.– 475 p.
144. Bruce C. *The Art of Kinetics for Bioscientist*.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016.– 222 p.
145. Liu S. *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability, and Reactor Design*. 2nd Ed.– Elsevier, 2016.– 1172 p.
146. Walker T. *Kinetics for Bioscientist For You*.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016.– 222 p.
147. *Chemical and Biological Kinetics. New Horizons. Vol. 2. Biological Kinetics* / Edited by E.B. Burlakova, S.D. Varfolomeev.– CRC Press, 2005.– 1104 p.
148. Hannon B., Ruth M. *Modeling Dynamic Biological Systems*. In *Modeling Dynamic Systems*. 2nd Ed.– Springer, 2014.– 434 p.
149. Sauro H.M. *Systems Biology: Introduction to Pathway Modeling*.– Ambrosius Publishing, 2014.– 424 p.
150. Eftimie R. *Hyperbolic and Kinetic Models for Self-organised Biological Aggregations: A Modelling and Pattern Formation Approach*. In *Lecture Notes in Mathematics*. Vol. 2232.– Springer, 2018.– 296 p.
151. Purich D.L. *Enzyme Kinetics. Catalysis & Control: A Reference of Theory and Best-Practice Methods*.– Elsevier, 2010.– 920 p.
152. Sauro H.M. *Enzyme Kinetics for Systems Biology*.– Ambrosius Publishing, 2012.– 322 p.

153. Punekar N.S. ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms.– Springer Singapore, 2018.– 562 p.
154. Vaddi K., Keller M., Newton M. The Chemokine Factsbook: Ligands and Receptors.– Academic Press, 1997.– 205 p.
155. Bellelli A., Carey J. Reversible Ligand Binding: Theory and Experiment.– Wiley-Blackwell, 2017.– 310 p.
156. Functioning of Transmembrane Receptors in Cell Signaling / Edited by R.A. Bradshaw, E.A. Dennis.– Academic Press, 2011.– 458 p.
157. Baici A. Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions: Selected Topics in the Theory and Diagnosis of Inhibition and Activation Mechanisms.– Springer-Verlag Wien, 2015.– 489 p.
158. Purich D.L. Enzyme Kinetics and Mechanism. Part F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates. In Methods in Enzymology. Vol. 354.– Academic Press, 2002.– 650 p.
159. Frey P.A., Hegeman A.D. Enzymatic Reaction Mechanisms.– Oxford University Press, 2007.– 848 p.
160. Taylor K.B. Enzyme Kinetics and Mechanisms.– Springer Science+Business Media, 2002.– 228 p.
161. Stein W.D. Channels, Carriers, and Pumps. An Introduction to Membrane Transport. 2nd Ed.– Academic Press, 2015.– 422 p.
162. Membrane Transport: A Practical Approach. In Practical Approach Series. Vol. 230. / Edited by S.A. Baldwin.– Oxford University Press, 2000.– 320 p.
163. Rega A.F., Garrahan P.J. The Ca²⁺ Pump of Plasma Membranes.– CRC Press, 2018.– 183 p.
164. Regulation of Calcium Transport across Muscle Membranes. In Current Topics in Membranes and Transport. Vol. 25. / Edited by F. Bronner, Guest Editor: A.E. Shamoo.– Academic Press, 1985.– 343 p.
165. Molecular Mechanisms of Water Transport Across Biological Membranes. In International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology. Vol. 215. / Edited by T. Zeuthen, W.D. Stein.– Academic Press, 2002.– 442 p.

166. Sliding Filament Mechanism in Muscle Contraction: Fifty Years of Research. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 565. / Edited by H. Sugi.– Springer, 2005.– 432 p.
167. Kohl P., Sachs F., Franz M.R. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias*. 2nd Ed.– Oxford University Press, 2011.– 608 p.
168. Sugi H. *Mysteries in Muscle Contraction: Evidence Against Current Dogmas*.– Pan Stanford, 2017.– 302 p.
169. Smith G.A. *New Concepts in the Control of Muscle Contraction*.– Rowans Scientific, 2007.– 96 p.
170. Excitation-Contraction Coupling in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 311. / Edited by G.B. Frank, C.P. Bianchi, H.E.D.J. ter Keurs.– Springer Science+Business Media, 2012.– 464 p.
171. Regulation of Smooth Muscle Contraction. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 304. / Edited by R.S. Moreland.– Springer, 1991.– 576 p.
172. Prasad A.M., Inesi G. Analysis of Calcium Transients in Cardiac Myocytes and Assessment of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Contribution. In *Myogenesis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 798. / Edited by J. DiMario.– Humana Press, 2012.– P. 411–421.
173. Understanding Calcium Dynamics: Experiments and Theory. In *Lecture Notes in Physics*. Vol. 623. / Edited by M. Falcke, D. Malchow.– Springer, 2003.– 300 p.
174. Calcium Signaling in Airway Smooth Muscle Cells / Edited by Yong-Xiao Wang.– Springer International Publishing, 2014.– 469 p.
175. Kumbhare D., Robinson L., Buschbacher R. *Buschbacher's Manual of Nerve Conduction Studies*. 3rd Ed.– Demos Medical, 2015.– 320 p.
176. Pannese E. *Neurocytology: Fine Structure of Neurons, Nerve Processes, and Neuroglial Cells*. 2nd Ed.– Springer International Publishing, 2015.– 319 p.
177. Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications. In *Methods in Molecular Biology*. Book 1113. / Edited by S. Nagar, U.A. Argikar, D.J. Tweedie.– Springer Science+Business Media, 2014.– 538 p.

178. Stringer J.L. Basic Concepts in Pharmacology: What You Need to Know for Each Drug Class. 5th Ed.– McGraw-Hill Education, 2017.– 256 p.
179. Van Boxtel C.J., Santoso B., Edwards I.R. Drug Benefits and Risks: International Textbook of Clinical Pharmacology. Rev. Ed.– IOS Press, 2008.– 848 p.
180. Thermodynamics and Kinetics of Drug Binding. In Methods and Principles in Medicinal Chemistry. Vol. 65./ Edited by G. Keserü, D.C. Swinney. Series Editors: R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers.– Wiley-VCH, 2015.– 360 p.
181. Curry S.H., Whelpton R. Introduction to Drug Disposition and Pharmacokinetics.– John Wiley & Sons, 2017.– 336 p.
182. Kwon Y. Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists.– Springer Science+Business Media, 2002.– 291 p.
183. New Horizons in Predictive Drug Metabolism and Pharmacokinetics. In RSC drug discovery series / Edited by A.G.E. Wilson.– Royal Society of Chemistry, 2015.– 434 p.
184. Loftsson T. Essential Pharmacokinetics: A Primer for Pharmaceutical Scientists.– Academic Press, 2015.– 178 p.
185. Jambhekar S.S., Breen P.J. Basic Pharmacokinetics.– Pharmaceutical Press, 2009.– 384 p.
186. Riviere J.E. Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications. 2nd Ed.– Wiley-Blackwell, 2011.– 456 p.
187. Kallen A. Computational Pharmacokinetics. In Chapman & Hall CRC Biostatistics Series. Vol. 23.– Chapman and Hall/CRC, 2007.– 184 p.
188. Pharmacokinetics in Drug Development: Advances and Applications. Vol. 3. / Edited by P.L. Bonate, D.R. Howard.– Springer US, 2011.– 319 p.
189. Systems Pharmacology and Pharmacodynamics. In AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. Vol. 23. / Edited by D.E. Mager, H.H.C. Kimko.– Springer International Publishing, 2016.– 511 p.
190. Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Integrated Textbook and Computer Simulations. 2nd Ed. / Edited by S.E. Rosenbaum.– Wiley, 2016.– 576 p.

191. Tozer T.N., Rowland M. Essentials of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 2nd Ed.– LWW, 2015.– 408 p.
192. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs / Edited by S.B. Karch, MD.– CRC Press, 2007.– 208 p.
193. Fundamentals of Antimicrobial Pharmacokinetics and Pharmacodynamics / Edited by A.A. Vinks, H. Derendorf, J.W. Mouton.– Springer-Verlag New York, 2014.– 466 p.
194. Kinetics of Drug Action. In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 47. / Edited by J.M. van Rossum.– Springer, 2012.– 438 p.
195. Macheras P., Iliadis A. Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics: Homogeneous and Heterogeneous Approaches. In Interdisciplinary Applied Mathematics: Mathematical Biology. Vol. 30. 2nd Ed.– Springer, 2016.– 483 p.
196. Shargel L., Yu A.B.C. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 7th Ed.– McGraw-Hill Education, 2015.– 928 p.
197. Pharmacology & Pharmacokinetics: A Basic Reader. In Competency-Based Critical Care. / Edited by M. Tomlin.– Springer-Verlag London, 2010.– 86 p.
198. Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice / Edited by A. Dash, S. Singh, J. Tolman.– Academic Press, 2013.– 392 p.
199. Yakovlev A.Yu., Yanev N.M. Transient Processes in Cell Proliferation Kinetics. In Lecture Notes in Biomathematics. Vol. 82.– Springer, 1989.– 214 p.
200. Goriely A. The Mathematics and Mechanics of Biological Growth. In Interdisciplinary Applied Mathematics. Vol. 45.– Springer Science+Business Media LLC, 2017.– 646 p.
201. Panikov N.S. Microbial Growth Kinetics.– Springer, 1995.– 378 p.
202. Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms / Edited by A. H. Stouthamer.– Kluwer Academic Publisher, 1992.– 252 p.
203. Microbial Ecology of the Oceans. 3rd Ed. / Edited by J.M. Gasol, D.L. Kirchman.– Wiley-Blackwell, 2018.– 528 p.
204. Emanuel N.M. Kinetics of Experimental Tumour Processes.– Pergamon, 2013.– 348 p.

205. Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer / Edited by M. Chatterjee, K. Kashfi.– Springer-Verlag New York, 2012.– 32 p.
206. Extracellular Targeting of Cell Signaling in Cancer : Strategies Directed at MET and RON Receptor Tyrosine Kinases / Edited by J.W. Janetka, R.M. Benson.– John Wiley & Sons, 2018.– 488 p.
207. Cancer Cell Signalling / Edited by A. Harvey.– Wiley, 2013.– 228 p.
208. Соколов І.Д., Чеченева Т.М., Соколова О.І. та ін. Вступ до біометрії. Навчальний посібник.– Луганськ: Елтон-2, 2011.– 190 с.
209. Кахикало В.Г., Фенченко Н.Г., Хайруллина Н.И., Назарченко О.В. Биологические и генетические закономерности индивидуального роста и развития животных.– СПб.: Изд. «Лань», 2016.– 132 с.
210. Rhodes O.E. Jr., Chesser R.K., Smith M.H. Population Dynamics in Ecological Space and Time.– University of Chicago Press, 1996.– 396 p.
211. Anderson B.A. World Population Dynamics: An Introduction to Demography.– Pearson, 2014.– 552 p.
212. Капица С.П. Общая теория роста человечества. Как рос и куда идет мир человека. 2-е изд.– М.: Альпина Нон-фикшн, 2009.– 120 с.
213. Paradise C.J., Campbell A.M. Ecological Dynamics.– Momentum Press, 2016.– 100 p.
214. Злобин Ю.А. Популяционная экология растений современное состояние, точки роста.– Сумы: Университетская книга, 2009. – 263 с.
215. Ojha A. Population Dynamics.– LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014.– 252 p.
216. Temporal Dynamics and Ecological Process / Edited by C.K. Kelly, M.G. Bowler, G.A. Fox.– Cambridge University Press, 2014.– 333 p.
217. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Математические методы в биологии и экологии. Биофизическая динамика продукционных процессов. В 2-х ч. Ч. 1. 3-е изд. – М.: Юрайт, 2018.– 210 с.
218. Helmreich E.J.M. Biochemistry of Cell Signalling.– Oxford University Press, 2001.– 368 p.

219. Needham D.M. *Machina Carnis: The Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Development.*– Cambridge University Press, 2009.– 820 p.
220. Stein R.L. *Kinetics of Enzyme Action: Essential Principles for Drug Hunters.*– Wiley, 2011.– 320 p.
221. *Physicochemical Kinetics and Transport at Bionterfaces.* In Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Vol. 9. / Edited by H.P. Van Leeuwen, W. Köster.– Wiley, 2004.– 566 p.
222. *Muscle Contraction and Cell Motility: Fundamentals and Developments /* Edited by H. Sugi.– Pan Stanford, 2016.– 474 p.
223. Boroujerdi M. *Pharmacokinetics and Toxicokinetics.*– CRC Press, 2015.– 550 p.
224. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry 7th Edition.*– W.H.Freeman, 2017.– 1328 p.
225. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics.* 4th Ed.– Wiley-Blackwell, 2012.– 510 p.
226. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods.* 3rd Ed.– Wiley-VCH, 2017.– 336 p.
227. Marangoni A.G. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach.*– Wiley-Interscience, 2002.– 248 p.
228. Cook P.F., Cleland W.W. *Enzyme Kinetics and Mechanism.*– Garland Science, 2007.– 416 p.
229. Malcata F.X. *Analysis of Enzyme Reaction Kinetics.* (2 Vol. Set). In *Enzyme Reaction Engineering.*– Wiley, 2019.– 1472 p.
230. Copeland R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.* 2nd Ed.– Wiley-VCH, 2000.– 397 p.
231. Alberty R.A. *Enzyme Kinetics, includes CD-ROM: Rapid-Equilibrium Applications of Mathematica.*– Wiley, 2011.– 456 p.
232. Segel I.H. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* In *Wiley Classic Library.*– Wiley-Interscience, 1993.– 957 p.

233. Bennett A. Enzyme Kinetics and Regulation.– ED-TECH Press, 2018.– 327 p.
234. Hill T.L. Free Energy Transduction and Biochemical Cycle Kinetics. In Dover Books on Chemistry.– Dover Publications, 2004.– 128 p.
235. Hooper L.L. Kinetics for bioscientist. Manual.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2015.– 222 p.
236. Berg O.G., Jain M.K. Interfacial Enzyme Kinetics.– Wiley, 2002.– 328 p.
237. Leskovac V. Comprehensive Enzyme Kinetics.– Springer, 2003.– 438 p.
238. Andrews D.F. Absolute Guide to Kinetics For Bioscientist.– CreateSpace Independent Publishing Platform, 2015.– 222 p.
239. Draper N.R., Smith H. Applied Regression Analysis. In Wiley Series in Probability and Statistics. 3rd Ed.– Wiley-Interscience, 1998.– 736 p.

До розділу 1

1. Michaelis L., Menten M.L. Die Kinetik der Invertinwirkung // Biochem. Z.– 1913.–Vol. 49.– P. 333–369.
2. Briggs G.E., Haldane J.B.S. A note on the kinetics of enzyme action // Biochem. J.– 1925.– Vol. 19.– P. 338–339.
3. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика.– М.: Фаир-Пресс, 1999.– 720 с.
4. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.– М.: Мир, 1966.– 864 с.
5. Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.К. Биохимическая кинетика.– Киев: Вища школа, 1977.– 264 с.
6. Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Биокинетика.– М.: Наука, 1979.– 312 с.
7. Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden. Third reprint.– London: Portland Press, 2002.– 344 p.
8. Garrett R.H., Grisham C.M. Biochemistry. 4th Ed.– Brooks/Cole Cengage Learning, 2010.– 1060 p.
9. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С.Северина.– 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.– 784 с.

10. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник.– Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000.– 508 с.
11. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. В 3-х томах. Т. 1.– М.: Мир, 1981.– 534 с.
12. Страйер Л. Биохимия. Т. 1.– М.: Мир, 1984. – 232 с.
13. Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics // Eur. J. Biochem. – 1982.– Vol. 128.– P. 281–291.
14. Дикерсон Р., Грей Г., Хейт Дж. Основные законы химии. Т. 1.– М.: Мир, 1982.– 652 с.
15. Slater E.C., Bonner W.D. The Effect of Fluoride on the Succinic Oxidase System // Biochem. J. – 1952.– Vol. 52, N. 2.– P. 185–196.
16. Болдырев А.И. Физическая и коллоидная химия.– М.: Высшая школа, 1974.– 504 с.
17. Волькенштейн М.В. Биофизика: Учеб. руководство. – 2-е изд.– М.: Наука, 1988.– 592 с.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.– М.: Изд-во Иностранной литературы, 1961.– 728 с.
19. Рубин А.Б., Пытьева Н.Ф., Ризниченко Г.Ю. Кинетика биологических процессов: Учеб. пособие. 2-е изд.– М.: Изд-во МГУ, 1987.– 304 с.
20. Кнорре Д.Г. Мызина С.Д. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. 3-е изд.– М.: Высш. шк., 2000.– 479 с.
21. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики.– М.: Изд-во МГУ, 1976.– 320 с.
22. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.– М.: Мир, 1990.– 350 с.
23. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на окисление о-дианизидина и гидрохинона в присутствии пероксидазы // Электронный журнал «Исследовано в России».– 2003.– Т. 6.– С. 918–933.
24. Бура М.В. Вплив рН середовища на активність N^{a+} , K^{+} -АТФази в'юна *Misgurnus Fossilis L.* впродовж раннього ембріогенезу // Фізика живого. – 2009.– Т. 17, № 2.– С. 44–48.

25. Yoshino M. A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors // *Biochem. J.*– 1987.– Vol. 248.– P. 815–820.
26. Карахім С.О., Костерін С.О., Жук П.Ф. Новий спосіб оцінки впливу оборотних інгібіторів на ензиматичний процес // *Доп. НАН України.*– 2010.– № 10.– С. 179–183.
27. IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Recommendations for nomenclature and tables in biochemical thermodynamics. Recommendations 1994 // *Eur. J. Biochem.*– 1996.– Vol. 240.– P. 1–14.
28. Карахим С.А., Горчев В.Ф. Моделирование кинетики ферментативных реакций, протекающих с участием активаторов, на примере гидролиза АТФ Mg^{2+} -АТФ-азой // *Укр. біохім. журн.*– 2006.– Т. 78, № 1.– С. 149–162.
29. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 2.– М.: Мир, 1982.– 515 с.
30. Карахім С.О., Горчев В.Ф., Костерін С.О. Ідентифікація механізму ферментативного/транспортувального процесу для системи «фермент/переносник – субстрат – ефектор» із використанням методу «ratio» // *Укр. біохім. журн.*– 2007.– Т. 79, № 2.– С. 97–113.
31. Chance B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase // *J. Biol. Chem.*– 1943.– Vol. 151.– P. 553–577.
32. Mann P.J.G. The kinetics of peroxidase action // *Biochem. J.*– 1931.– Vol. 25, N. 3.– P. 918–930.
33. Botts J., Morales M. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate // *Trans. Faraday Soc.*– 1953.– Vol. 49.– P. 696–707.
34. Chance B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase. (P. 1–23). In *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, Vol. 73: Mechanism of Enzyme Action, Part A, Edited by D.L. Purich.– John Wiley & Sons, Inc.– 1999.– 283 p.
35. Дикерсон Р., Грей Г., Хейт Дж. Основные законы химии. Т. 2.– М.: Мир, 1982.– 620 с.

До розділу 2

1. Гаммет Л. Основы физической органической химии.– М.: Мир, 1972.– 534 с.
2. Брей Дж., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов.– М.: ИЛ, 1959.– 380 с.
3. Уэстли Дж. Ферментативный катализ.– М.: Мир, 1972.– 269 с.
4. Chance B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase // J. Biol. Chem.– 1943.– N 151.– P. 553–577.
5. Бугаєнко Г.О. Методи математичної фізики.– К.: Вища школа, 1970.– 310 с.
6. Ашмор П. Катализ и ингибирование химических реакций.– М.: Мир, 1966.– 507 с.

До розділу 3

1. Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden. 3rd reprint. – London: Portland Press, 2002. – 344 p.
2. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.– М.: Мир, 1966.– 864 с.
3. Dickerson R.E., Gray H.B., Haight G.P. Chemical Principles. 3rd Ed.– London: The Benjamin / Cummings Publ., 1979.– 1037 p.
4. Alberty R.A. Principle of Detailed Balance in Kinetics // J. Chem. Edu.– 2004.– Vol. 81, N 8.– P. 1206–1209.
5. Lewis G.N. A New Principle of Equilibrium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1925.– Vol. 11, N 3.– P. 179–183.
6. Карахим С.А., Жук П.Ф. Детальный баланс в циклических реакциях: за и против.– LAP Lambert Academic Publishing, 2016.– 324 с.
7. Colquhoun D.D., Dowsland K.A., Beato M., Plested A.J.R. How to Impose Microscopic Reversibility in Complex Reaction Mechanisms // Biophys. J. – 2004.– Vol. 86.– P. 3510–3518.

8. Keener J., Sneyd J. *Mathematical Physiology. I: Cellular Physiology*. 2nd Ed.– Springer, 2009.– 547 p.

9. Copeland R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2nd Ed.– New York: A John Wiley & Sons, 2000.– 397 p.

До розділу 4

1. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.– М.: Мир, 1966.– 862 с.

2. Кретович В.Л. Введение в энзимологию.– М.: Наука, 1986.– 333 с.

3. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа.– М.: Наука, 1965, 248 с.

4. Петушкова Е.В. Введение в кинетику ферментативных реакций.– М.: Изд. МГУ, 1972.– 200 с.

5. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.– М.: Мир, 1990.– 348 с.

6. Березин И.В., Клесов И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики.– М.: Изд. МГУ, 1976.– 320 с.

7. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Бабич Л.Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} – транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журн.– 1996.– Т. 68, № 6.– С. 50–61.

8. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 2.– М.: Мир, 1982.– 806 с.

До розділу 5

1. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа.– М.: Наука, 1965.– 248 с.

2. Петушкова Е.В. Введение в кинетику ферментативных реакций.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1972.– 200 с.

3. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.– М.: Мир, 1990.– 352 с.

4. Березин И.В., Клесов И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976.– 320 с.

5. Cortes A., Cascante M., Cardenas M., Cornish-Bowden A. Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data // *Biochem. J.*– 2001.– Vol. 357.– P. 263–268.

6. Данилович Г.В., Данилович Ю.В., Коломієць О.В., Костерін С.О., Родік Р.В., Черенок С.О., Кальченко В.І., Чуніхін О.Ю., Горчев В.Ф., Карахім С. О. Зміни поляризації плазматичної та внутрішньої мітохондріальної мембран клітин міометрія за дії каліксаренів – інгібіторів Na^+ , K^+ -АТФ –ази плазматичної мембрани // *Укр. біохім. журн.*– 2012.– Т. 84, № 6. – С. 37–48.

7. Векліч Т.О., Кочешкова Н.С., Родік Р.В., Бойко В.І., Воробець З.Д., Костерін С.О. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність у плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – Т. 79, № 3. – С. 19–28.

8. Костерін С.О. Коефіцієнт інгібування I_{50} та його використання у фізико-хімічній біології // *Укр. біохім. журн.*– 1999.– Т. 71, № 2.– С. 100–103.

9. Yoshino M. A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors // *Biochem. J.*– 1987.– Vol. 248.– P. 815–820.

10. Yoshino M., Murakami K. Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types // *SpringerPlus.*– 2015.– Vol. 4:292.– 8 p.

11. Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics // *Eur. J. Biochem.* – 1982.– Vol. 128.– P. 281–291.

12. Grant G.A. The many faces of partial inhibition: Revealing imposters with graphical analysis // *Arch. Biochem. Biophys.*– 2018.– Vol. 653.– P. 10–23.

13. Bravo I.G., Busto F., De Arriaga D. et al. Application of a normalised plot to the study of uni–uni enzyme-inhibitor systems // *Biochim. et Biophys. Acta.*– 2002.– Vol. 1571.– P. 183–189.

14. *Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised ed. by A. Cornish-Bowden. 3rd reprint.*– London: Portland Press, 2002.– 344 p.

15. Amine A., Harrad L.E., Arduini F., Moscone D., Palleschi G. Analytical aspects of enzyme reversible inhibition // *Talanta.*– 2014.– Vol. 118.– P. 368–374.

До розділу 6

1. Шмид Р., Сапунов В.Н. Неформальная кинетика.– М.: Мир, 1985.– 264 с.
2. Паюсов С.А., Халемский А.М. Прикладная химическая кинетика.– Екатеринбург: Кедр, 1994.– 508 с.
3. Романовский Б.В. Основы химической кинетики.– М.: Экзамен, 2006.– 416 с.
4. Байрамов В.М. Основы химической кинетики и катализа.– М.: Academia, 2003.– 252 с.
5. Пурмаль А.П. А, Б, В ... химической кинетики.– М.: ИКЦ «Академкнига», 2004.– 278 с.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика.– М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999.– 720 с.
7. Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden. 3rd reprint. – London: Portland Press, 2002.– 344 p.
8. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.– М.: Мир, 1990.– 352 с.
9. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа.– М.: Высшая школа, 1977.– 280 с.
10. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология.– М.: Academia, 2005.– 472 с.

До розділу 7

1. Костерин С.А. О возможной H^+ -зависимой функциональной связи между плазматической мембраной и митохондриями в гладкомышечных клетках // Укр. біохім. журн.– 1998.– Т. 70, № 6.– С. 152–160.
2. Келети Т. Основы ферментативной кинетики.– М.: Мир, 1990.– 352 с.
3. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма.– М.: Мир, 1966.– 864 с.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 2.– М.: Мир, 1982.– 515 с.
5. Fundamentals of Enzyme Kinetics / Revised edition by Athel Cornish-Bowden. 3rd reprint.– London: Portland Press, 2002.– 344 p.

6. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современные методы исследования / Под ред. А.А.Болдырева.– М.:Изд. Московского университета, 1977.– 196 с.
7. Данилович Г.В., Костерин С.О. Ідентифікація та характеристика “базальної” Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності у фракції плазматичних мембран гладеньком’язових клітин // Укр. біохім. журн.– 2001.– Т. 73, № 6.– С. 30–40.
8. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research.– Clarendon Press: Oxford, 1986.– 580 p.
9. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты.– М.:Изд. Иностранной литературы, 1961.– 728 с.
10. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа.– М.:Высшая школа, 1977.– 280 с.
11. Березин И.В., Мартинек К. Кинетические закономерности обратимого влияния эффектора на двустадийную ферментативную реакцию // Мол. биол.– 1971.– Т. 5, № 3.– С. 347–350.
12. Данилович Г.В., Костерин С.А. Кінетичні закономірності перебігу та можливий механізм реакції Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ у фракції плазматичних мембран гладенького м’яза // Укр. біохім. журн.– 2004.– Т. 76, № 6.– С. 142–150.
13. Данилович Г.В. Вплив еозину на Ca^{2+} -незалежну, Mg^{2+} -залежну АТФ-азну активність плазматичних мембран гладеньком’язових клітин // Укр. біохім. журн.– 2004.– Т. 76, № 2.– С. 48–52.
14. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах.– Киев: Наукова думка, 1990.– 216 с.
15. Семчишин Г.М., Дильовий М.В., Луцак В.І. рН-залежність активності каталази *Escherichia coli* за зміни умов культивування // Укр. біохім. журн.– 2002.– Т. 74, № 5.– С. 34–41.

До розділу 8

1. Bolton T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle // *Physiol. Rev.*– 1979.– Vol. 59.– P. 606–718.
2. Loutzenhiser R., Leyten P., Saida K., van Bremen C. Calcium compartments and mobilization during contraction of smooth muscleю In: *Calcium and Contractility* / Eds. A. K. Grover and E. E. Daniel.– New York: The Humana Press, 1985.–P. 61–92.
3. Brading A.F., Sneddon P. Evidence for multiple sources of Ca activation on the contractile machinery of the guinea-pig *taenia coli* on stimulation with carbachol // *Brit. J. Pharmacol.*– 1980.– Vol. 70.– P. 229–240.
4. Smith J.B., Zheng T., Lyu R.M. Ionomycin releases calcium from the sarcoplasmic reticulum and activates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in vascular smooth muscle cells // *Cell Calcium.*– 1989.– Vol. 10.– P. 125–134.
5. Beuckelmann D.J., Wier W.G. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells // *J. Physiol. (London).*– 1988.– Vol. 405.– P. 233–255.
6. Ito Y., Kuriyama H., Parker I. Calcium transients evoked by electrical stimulation of smooth muscle from guinea-pig ileum recorded by the use of Fura-2 // *J. Physiol. (London).*– 1988.– Vol. 407.– P. 117–134.
7. Smith J.B., Smith L. Extracellular Na dependence of changes in free Ca^{2+} , $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux, and total cell Ca produced by angiotensin II in cultured arterial muscle cells // *J. Biol. Chem.*– 1987.– Vol. 262.– P. 17455–17460.
8. Furukawa K.J., Tawada-Iwata Y., Shigekawa M. Modulation of plasma membrane Ca^{2+} pump by membrane potential in cultured vascular smooth muscle cells // *J. Biochem.*– 1989.– Vol. 106.– P. 1068–1073.
9. Ebashi S., Endo M. Calcium ion and muscle contraction // *Prog. Biophys. Mol. Biol.*– 1968.– Vol. 18.– P. 125—183.
10. Wibo M., Morel N., Godfraind T. Differentiation of Ca^{2+} transport associated with plasma membrane and endoplasmic reticulum in intestinal smooth muscle // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*– 1981.– Vol. 250.– P. 333–334.

11. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах.— Киев: Наукова думка, 1990.— 216 с.
12. Aickin C.C., Brading A.F., Burdyga Th.V. Evidence for sodium-calcium exchange in the guinea-pig ureter // *J. Physiol. (London)*.— 1984.— Vol. 347.— P. 411–430.
13. Burdyga Th.V., Magura I.S. Effects of caffeine on the electrical and mechanical activity of guinea-pig ureter smooth muscle // *Gen. Physiol. Biophys.*— 1986.— Vol. 5.— P. 581–591.
14. Burdyga Th.V., Magura I.S. Effects of temperature and NaJ on the relaxation of phasic and tonic tension of guinea-pig ureter muscle // *Gen. Physiol. Biophys.*— 1988.— Vol. 7.— P. 3–15.
15. Caputo C. The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibers // *J. Physiol. (London)*.— 1972.— Vol. 223.— P. 461–482.
16. Champan R.A. The effects of temperature and metabolic inhibitors on the spontaneous relaxation of the potassium contracture of the heart of the frog *Rana pipiens* // *J. Physiol. (London)*.— 1973.— Vol. 231.— P. 233–249.
17. Osa T. Effects of magnesium and temperature during recovery process from the potassium contracture of the pregnant rat myometrium // *Jpn. J. Physiol.*— 1973.— Vol. 25.— P. 185–199.
18. Droogmans G., Casteels R. Temperature-Dependence of ^{45}Ca fluxes and contraction in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery // *Pflugers Arch.*— 1981.— Vol. 391.— P. 183–189.
19. Inesi G., Millman M., Eletr S. Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes // *J. Mol. Biol.*— 1973.— Vol. 81.— P. 483–504.
20. Изаков В.Я., Иткин Г.П., Мархасин В.С. и др. Биомеханика сердечной мышцы / Под ред Г.Р. Иваницкого.— М.:Наука.—1981.— 325 с.
21. Brading A.F., Burdyga Th.V., Scripnyuk Z.D. The effects of papaverine on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig ureter // *J. Physiol. (London)*.—

1983.– Vol. 334.– P. 79–89.

22. Fleckenstein A. History of calcium antagonists // *Circ. Res.*– 1983.– Vol. 52.– P. 3–16.

23. Andersson R. Cyclic AMP and calcium ions in mechanical and metabolic responses of smooth muscles; influence of some hormones and drugs // *Acta Physiol. Scand. Suppl.*– 1972.– Vol. 382.– P. 1–59.

24. Andersson R., Nilsson K. Cyclic AMP and calcium in relaxation in intestinal smooth muscle // *Nature (London)*.– 1972.– Vol. 238.– P. 119–120.

25. Ashida T., Schaeffer J., Goldman W. F. et al. Role of sarcoplasmic reticulum in arterial contraction: comparison of ryanodine's effect in a conduit and a muscular artery // *Circulat. Res.*– 1988.– Vol. 62, N 4.– P. 854–863.

26. Osa T., Maruta K. The Mechanical Response of the Isolated Longitudinal Muscle of Pregnant Rat Myometrium to Adenosine Triphosphate in the Ca-Free Solution Containing Various Polyvalent Cations // *Japan J. Physiol.*– 1987.– Vol. 37, N 5.– P. 821–836.

27. Savineau J.P., Mironneau J., Mironneau C. Contractile properties of chemically skinned fibers from pregnant rat myometrium: existence of an internal Ca-store // *Europ. J. Physiol.*– 1988.– Vol. 411, N 3.– P. 296–303.

28. Дещеревский В.И. Математические модели мышечного сокращения.– М.: Наука, 1977.– 160 с.

29. Хилл А. Механика мышечного сокращения.– М.: Мир, 1972.– 183 с.

30. Büllbring E., Tomita T. Increase of Membrane Conductance by Adrenaline in the Smooth Muscle of Guinea-Pig Taenia Coli // *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*– 1969.– Vol. 172, N 1027.– P. 89–102.

31. Зайцев Л.Н. Метод количественной оценки сократительной функции гладких мышц // *Физиол. журн.*– 1981.– Т. 27, № 4.– С. 566–569.

32. Богач П.Г., Підгорна Л.А. Аналітичний опис скорочень гладком'язових клітин // *Доп. АН УРСР. Сер. Б.*– 1981.– № 12.– С. 55–58.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА (С.В.Комісаренко).....	3
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ПРО ІСТИННІ ТА УЯВНІ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА В ЕНЗИМОЛОГІЇ	21
1.1. Рівняння Міхаеліса-Ментен та умови проведення експерименту.....	22
1.2. Істинні константи.....	25
1.3. Уявні константи.....	28
1.4. Ознаки уявних констант, що відрізняють їх від істинних.....	38
1.5. Чи виконується рівняння $K_m^{app} = K_s + k_{cat}/k_1$ для ензиматичних реакцій з участю активаторів?.....	48
1.6. Чи змінюються k_{cat} та K_m^{app} пропорційно концентрації активатора при дотриманні умови $k_{cat} \gg k_{-1}$ в ензиматичних реакціях з участю активаторів?.....	83
1.7. Чи існує між уявною константою Міхаеліса та уявною граничною швидкістю лінійна залежність, завдяки якій можна визначати субстратну константу?.....	98
1.8. Підсумок роботи.....	109

РОЗДІЛ 2. ЕНТРОПІЙНЕ ТРАКТУВАННЯ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ.....	115
РОЗДІЛ 3. ВРАХУВАННЯ ВНЕСКУ ХІМІЧНОГО ПЕРЕТВОРЕННЯ СУБСТРАТУ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ДОСЛІДЖЕНЬ ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ.....	118
3.1. Стан рівноваги.....	122
3.2. Початкова швидкість.....	128
3.3. Частина кінетичної кривої між лінійним початковим відрізком та рівновагою.....	135
3.4. Початкова швидкість в умовах порушення детального балансу.....	136
3.5. Наявність продукту реакції у реактивах.....	138
3.6. Адитивність швидкості по концентрації продукту.....	139
3.7. Резюме.....	142
РОЗДІЛ 4. КОЕФІЦІЄНТ ІНГІБУВАННЯ I_{50} ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ У ФІЗИКО-ХІМІЧНІЙ БІОЛОГІЇ.....	144
РОЗДІЛ 5. СПОСОБИ ОЦІНКИ ВПЛИВУ ОБОРОТНИХ ІНГІБІТОРІВ НА ЕНЗИМАТИЧНИЙ ПРОЦЕС ТА РОЗРАХУНКУ КІНЕТИЧНИХ КОНСТАНТ.....	151
5.1. Константа інгібуючої дії.....	158
5.2. Використання методу лінеаризації для визначення Q_I та I_{50}	167
5.3. Площа під кривою титрування.....	171
5.4. Способи оцінки впливу оборотних інгібіторів на ензиматичний процес.....	177
5.5. Визначення індивідуальних кінетичних констант... ..	182
5.6. Основні результати дослідження.....	192

РОЗДІЛ 6. ІДЕНТИФІКАЦІЯ МЕХАНІЗМУ ЕНЗИМАТИЧНОГО/ ТРАНСПОРТНОГО ПРОЦЕСУ (СИСТЕМА «ЕНЗИМ/ПЕРЕНОСНИК – СУБСТРАТ – ЕФЕКТОР») ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ СПІВВІДНОШЕННЯ ПОЧАТКОВИХ ШВИДКОСТЕЙ УТВОРЕННЯ ДВОХ ПРОДУКТІВ РЕАКЦІЇ (МЕТОД “RATIO”)	194
6.1. Узагальнена модель ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»).....	197
6.2. Можливі парціальні механізми ензиматичного/транспортного процесу (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»).....	198
6.3. Початкові швидкості $v_{0,1}$ та $v_{0,2}$ утворення продуктів реакції P_1 та P_2 в ензиматичному/транспортному процесі (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»).....	200
6.4. Співвідношення початкових швидкостей («ratio» $R = \frac{v_{0,1}}{v_{0,2}}$) утворення продуктів реакції P_1 та P_2 в ензиматичному/транспортному процесі (система «ензим (переносник) – субстрат – ефектор»).....	208
6.5. Використання методу лінеаризації для ідентифікації механізму.....	212
6.6. Послідовність дій для ідентифікації конкретного парціального механізму.....	216
РОЗДІЛ 7. МОДЕЛЮВАННЯ КІНЕТИКИ ЕНЗИМАТИЧНИХ РЕАКЦІЙ, ЩО ВІДБУВАЮТЬСЯ З УЧАСТЮ АКТИВАТОРІВ (НА ПРИКЛАДІ ГІДРОЛІЗУ АТФ «БАЗАЛЬНОЮ» Mg^{2+}-АТФазою)....	221
7.1. Узагальнений механізм гідролізу АТФ.....	223
7.2. Умови дослідження моделі ензиматичного гідролізу АТФ.....	229
7.3. Утворення максимумів.....	233
7.4. Залежності типу Міхаеліса-Ментен.....	249

7.5. Кінетичні особливості механізмів з двома шляхами протікання реакції..	257
7.6. Визначення механізму досліджуваної реакції за формою залежностей початкової швидкості від концентрацій ензиму, субстрату та активатора....	265
7.7. Основні властивості дослідженої ензиматичної реакції.....	269
РОЗДІЛ 8. КІНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОЦЕСУ СКОРОЧЕННЯ-РОЗСЛАБЛЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ.....	273
8.1. Методичні аспекти	274
8.2. Рівняння для описання кінетики фази розслаблення фазних скорочень...	275
8.3. Максимальна нормована швидкість релаксації механічної напруги.....	280
8.4. Кінетичний аналіз фази розслаблення механічної напруги для ідентифікації систем активного транспорту Ca^{2+}	281
8.5. Кінетичний аналіз фази розслаблення експериментальних механокінетичних кривих.....	282
8.6. Кінетичний аналіз повного циклу процесу скорочення-розслаблення гладеньких м'язів.....	286
8.7. Рівняння для описання кінетичних кривих повного циклу скорочення-розслаблення гладенького м'язу.....	287
8.8. Кінетичний аналіз експериментальних механокінетичних кривих.....	290
ПІДСУМКИ	295
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	299



КОСТЕРІН СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ – академік

НАН України, доктор біологічних наук, професор. Випускник кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка.

Заступник директора з наукової роботи та завідувач

відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Професор кафедри біофізики Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка та кафедри біології Національного Університету «Києво-Могилянська Академія». Фахівець у галузі кінетики біохімічних процесів, біохімії та біофізики м'язів та біохімічної мембранології. У 1988 р. захистив докторську дисертацію «Механізми транспорту Ca^{2+} в гладенькому м'язі» («біохімія»). У 1990 та 1992 р. проходив наукове стажування в МакМастерському університеті м. Гамільтон, пров. Онтаріо, Канада. Автор та співавтор 350 наукових публікацій та 8 монографій та підручників (одна з монографій на замовлення у співпраці з колегами з Канади, США, Японії та Франції вийшла у США). За безпосередньої участі Костеріна С.О. та під його науковим керівництвом одержано фундаментальні результати при дослідженні біохімічних, фізико-хімічних та функціональних властивостей енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних протеїнів мембран гладеньком'язових клітин. Розробив нові методи кінетичного аналізу біохімічних процесів (у випадку ензиматичних реакцій та дії оборотних ефекторів на них, ліганд-рецепторної взаємодії). Підготував 4 докторів та 14 кандидатів наук. Наразі є науковим консультантом трьох докторантів. Голова Спеціалізованої Вченої ради (спеціальності – «біохімія», «біотехнологія») Інституту біохімії НАН України. Член Бюро Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України. Віце-президент Українського біохімічного товариства. Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки (2010) та Премії ім. О.В. Палладіна НАН України (1992). Заслужений діяч науки і техніки України (2015). Нагороджений Відзнакою Верховної Ради України «За заслуги перед Українським народом» (2013), відзнаками Президії НАН України «За наукові досягнення» та «За підготовку наукової зміни». Лауреат премії "Золота Фортуна-2012" з врученням ордена Святого Князя Володимира Великого III ступ.



КАРАХІМ СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ – кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Після закінчення навчання на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка з 1980 по 2001 рік працював у Інституті колоїдної хімії та хімії води ім. О.В. Думанського НАН України, де в 1997 захистив кандидатську дисертацію «Математичне моделювання процесів адсорбції на неоднорідній поверхні» за спеціальністю колоїдна хімія. З 2004 року – співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Наукові інтереси пов'язані з теоретичними дослідженнями кінетики складних багатостадійних та багатокомпонентних ензиматичних реакцій з участю інгібіторів та активаторів, а також з моделюванням кальцієвого гомеостазу в гладеньком'язових клітинах. Автор та співавтор 75 наукових публікацій та 1 монографії.