

УДК 577.3

## СТРУКТУРНАЯ КИНЕТИКА ОТКРЫТЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В ПРЕДСТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ

Ш.К. БАЙРАМОВ, З.А. ТАГИЕВ, Г.Г. ГАДЖИЕВА

*Азербайджанский Медицинский Университет  
370022, Баку, ул. Бакиханова-23*

Предложен теоретический подход к изучению кинетики открытой ферментативной реакции в предстационарной фазе с использованием теории графов. Получена формула определения концентрации различных комплексов фермента в переходной фазе открытой ферментативной реакции для некоторых частных случаев. Приводится пример применения полученной формулы.

В последние годы теоретические методы решения кинетических задач, основанные на применении теории графов, широко используются в биокинетических исследованиях [1-4]. При анализе стационарной и предстационарной фаз ферментативных реакций, в которых предполагается участие не более одной ферментной формы в каждой элементарной стадии, используются линейные графы.

Разработанные линейные граф-теоретические методы и правила применяются в кинетике стационарной и предстационарной фаз реакций в закрытых системах, т.е. в системах, где общая концентрация разных ферментных форм остается постоянной [1, 3, 4]. Однако, биологические "реакторы" по своей сущности являются открытыми, т.е. общая концентрация разных ферментных форм не остается постоянной, и во многих случаях приходится учитывать это обстоятельство. Соответствующие кинетические уравнения при этом являются неоднородными. Решение подобной системы уравнений граф-теоретическим методом существенно облегчило бы теоретическое исследование кинетики открытых биохимических реакций. В настоящее время нам не известны, основанные на теории графов, метод или алгоритмические правила, позволяющие найти скорость открытых ферментативных реакций в предстационарной фазе. Граф-теоретический способ решения задач кинетики предстационарной фазы открытой ферментативной реакции является предметом обсуждения данной статьи. При этом мы придерживаемся методики, разработанной для закрытых систем и успешно применяемой [4].

Пусть ферментативная реакция протекает с образованием  $n+1$  ферментных комплексов  $E\chi_i$ , включая свободный фермент, т.е.  $i=1, 2, \dots, n$ . В предстационарной стадии производные концентрации ферментных комплексов по времени не равны нулю и выражаются уравнениями:

$$d[E_i]/dt = \sum k_{ji}[E_j] - [E_i] \sum k_{ij}, i \neq j, \quad (1)$$

где  $[E_i]$  - ( $i=1, 2, \dots, n$ ) концентрация различных ферментных комплексов,  $k_{ij}$  - постоянные скорости стадии  $E_i \leftrightarrow E_j$ . В предстационарном режиме предполагается, что можно пренебречь зависимостью от времени концентрации субстратов, так как они очень медленно меняются по сравнению с  $[E_i]$ , поэтому  $k_{ij}$  в уравнениях (1) постоянны. Применение интегрального преобразования Карсона-Хевисайда к системе (1) превращает ее в систему алгебраических уравнений, которую можно решать методом теории графов [1].

В открытых реакциях уравнения (1) имеют вид:

$$d[E_i]/dt = \sum k_{ji}[E_j] - [E_i] \sum k_{ij} + v_i(t), i \neq j, \quad (2)$$

где  $v_i(t)$  - функция скорости поступления  $i$ -ой формы фермента в реакционную систему. Преобразуем систему (2) с помощью интегрального преобразования Карсона -Хевисайда [6]:

$$[E_i^*] = \lambda \int_0^{\infty} \exp(-\lambda t) [E_i(t)] dt$$

$$(d[E_i]/dt)^* = \lambda [E_i^*] - \lambda [E_{oi}],$$

где  $\lambda$  - комплексный образ времени  $t$ ,  $[E_{oi}]$  - начальная концентрация  $i$ -ой ферментной формы. Начальные значения концентрации комплексов зададим в виде:  $[E_{oi}] \neq 0, i=1, \dots, n$ . В рамках этих начальных условий, трансформанта системы (2) будет иметь вид:

$$\lambda [E_i^*] - \lambda [E_{oi}] + [E_i^*] \sum_{j \neq i} k_{ij} - \sum_{j \neq i} k_{ji} [E_j^*] = v_i^*(\lambda), \quad (3)$$

где  $v_i^*(\lambda)$  трансформанта функции скорости.

Общая концентрация фермента в момент времени  $t$  будет равной:

$$\sum_i [E_i(t)] = [E_o] + V(t),$$

где

$$[E_o] = \sum_{i=1}^n [E_{oi}],$$

$$V(t) = \sum_{i=1}^n V_i = \sum_{i=1}^n \int_0^t v_i(\tau) d\tau$$

Изображение первообразной функции скорости  $V_i^*$  определяется по теореме интегрирования оригинала

$$V_i^* = \frac{v_i^*}{\lambda} \Rightarrow \sum_{i=1}^n V_i^* = \sum_{i=1}^n \frac{v_i^*}{\lambda} = \frac{v^*}{\lambda}$$

Пользуясь вышеприведенными обозначениями, значение общей концентрации фермента можно представить в виде комплексного переменного:

$$[E^*] = \sum_i [E_i^*(\lambda)] = [E_o] + \frac{v^*}{\lambda}.$$

Введем обозначение:  $e_i^* = [E_i^*]/[E^*]$  безразмерной концентрацией  $i$ -ой формы фермента и  $u_i^* = v_i^*/[E^*]$ . В этих обозначениях преобразованная система (3) принимает форму:

$$\lambda e_i^* - \lambda e_{oi} + e_i^* \sum_{j \neq i} k_{ij} - \sum_{j \neq i} k_{ji} e_j^* = u_i^* \quad (4)$$

Используя тождество

$$\sum_{j=1}^n e_j^* = 1 = e_i^* + \sum_{j \neq i} e_j^*, \quad (5)$$

производную изображения можно преобразовывать следующим образом

$$\lambda e_i^* - \lambda e_{oi} = \lambda e_i^* - \lambda e_{oi} \sum_{j=1}^n e_j^* = \lambda e_i^* - \lambda e_{oi} e_i^* - \lambda e_{oi} \sum_{j \neq i} e_j^*, \quad (6)$$

с другой стороны очевидно, что

$$e_{oi} = 1 - \sum_{j \neq i} e_{oj} - \frac{1}{\lambda} \sum_{j=1}^n u_j^* \quad \text{и} \quad e_i^* u_i^* - u_i^* = -u_i^* \sum_{j \neq i} e_j^* \quad (7)$$

Подставляя (6) в (4) и учитывая в ней соотношения (7) после необходимых сокращений получаем окончательно:

$$e_i^* \sum_{j \neq i} (k_{ij} + u_j^* + \lambda e_{0j}) - \sum_{j \neq i} (k_{ji} + u_i^* + \lambda e_{0i}) e_j^* = 0 \quad (8)$$

Обозначая

$$k_{ij}^* = k_{ij} + u_j^* + \lambda e_{0j} = k_{ij} + \lambda \frac{\lambda[E_{0j}] + v_j^*}{\lambda[E_0] + v^*}, \quad (9)$$

(8) можно записывать в следующем простом виде:

$$\sum_j e_j^* k_{ji}^* = e_i^* \sum_j k_{ij}^*. \quad (10)$$

Полученная система уравнений аналогична по форме системе уравнений предстационарной кинетики закрытой системы [4], с единственной разницей, заключающейся в том, что в ней присутствуют связанные со скоростью притока добавочные члены в константах реакций. Это означает, что граф открытой реакции в переходной фазе может быть изображен так же, как и граф закрытой реакции, но с добавочными ветвями, параллельными  $\lambda$ -ветвям графа закрытой системы.

Таким образом, предстационарный граф открытой ферментативной реакции содержит дополнительные ветви, направленные из каждого узла в те узлы  $j$ , к которым имеются притоки фермента со скоростью  $v_j$ . Если в узел графа не поступает фермент извне, то в соответствующий узел графа не входит никаких дополнительных ветвей скорости.

Пользуясь одним из алгоритмов теории графов для нахождения скорости стационарной реакции [1, 3, 5], получим скорость реакции преобразованную по Карсону-Хевисайду. Узловые величины графа, т.е. комплексные образы соответствующих концентраций, находим, перечисляя деревья, направленные в соответствующий узел.

Преобразованная концентрация в  $i$ -ом узле графа равна  $e_i^* = \frac{D_i^*}{\sum_{i=1}^n D_i^*}$ , где  $D_i^*$  -

соответствующие суммы, направленных в узел  $i$  деревьев графа [1].

Принципиальное значение полученной формулы (10) заключается в том, что она позволяет применить известный для закрытых систем алгоритм к изучению предстационарной кинетики открытых реакций.

Применяя обратное преобразование Карсона-Хевисайда (таблицы такого преобразования имеются во многих руководствах, например Г.Кори, Т.Кори [6]), можно получить скорость реакции в предстационарном режиме в виде суммы экспоненциальных членов, зависящих от времени.

Отметим, однако, что характеристические времена, присутствующие в экспоненциальных членах, являются корнями характеристического многочлена. Нахождение этих корней может быть достаточно трудоемким, так как в открытой системе конкретный вид характеристического многочлена зависит также от величины скорости притока.

Поэтому имеет смысл рассмотреть простые случаи, которые более практичны и часто встречаются в биохимической кинетике.

1. Если для начальной концентрации и скорости притока выполняются соотношения (11), то формула (10) ни чем не отличается от соответствующего выражения для констант скоростей в предстационарной фазе закрытых биохимических реакций и величины дополнительных узлов равны  $\alpha_i \lambda$ .

$$\frac{[E_{0i}]}{[E]} = \frac{v_i^*}{v^*} = \alpha_i \quad (11)$$

Это условие, в частности, означает, что имеется только одна форма фермента в начальной, не нулевой, концентрации и этот же узел является открытым. В ферментативных реакциях, как правило, такой формой является свободный фермент, и

следовательно, рассматриваемый случай не является простой формальностью, и может быть часто встречаемой реальной схемой.

Таким образом, если в процессе открытой ферментативной реакции выполняется условие (11), то предстационарный граф реакции будет содержать дополнительные  $\lambda$ -ветви величиной  $\alpha_i \lambda$ , направленные из каждого узла в те узлы  $i$ , в которых имеется приток или начальная ненулевая концентрация ферментной формы. Соответствующие константы скоростей в этом случае будут иметь вид:

$$k_{ij}^* = k_{ij} + \alpha_i \lambda$$

Для решения системы уравнений (9) с константами  $k_{ij}^*$  можно применять теорему о деревьях [4], которая приводит к выражению для относительных концентраций:

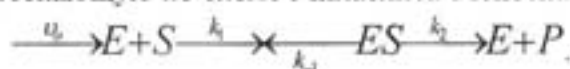
$$e_i^*(\lambda) = \frac{R_i(\lambda)}{Q(\lambda)}, \quad (12)$$

где  $R_i(\lambda)$  и  $Q(\lambda)$  многочлены, которые получаются перечислением деревьев и поддеревьев, соответствующей закрытой схемы реакции на основе теоремы о деревьях [4]. Следовательно, выражение концентраций будет иметь вид:

$$[E_i^*(\lambda)] = [E_0] \frac{R_i(\lambda)}{Q(\lambda)} + \frac{v^*}{\lambda} \frac{R_i(\lambda)}{Q(\lambda)} \quad (13)$$

Таким образом, в рассматриваемом случае значение концентрации представляется, в виде линейной функции скоростей, и может быть получена из соответствующего выражения для закрытых систем с добавлением второго слагаемого в (13).

В качестве примера рассмотрим простейшую открытую ферментативную реакцию, протекающую по схеме Михаелиса-Ментена



Предположим, что фермент в свободной форме поступает в реакционную систему с постоянной скоростью  $v_0$  и начальная концентрация этой формы равна  $[E_0]$ .

В закрытой системе относительные концентрации определяются выражениями [1]:

$$[E_1^{*c}(\lambda)] = \frac{\lambda + k_{21}}{\lambda + k} [E_0]$$

$$[E_2^{*c}(\lambda)] = \frac{k_{12}}{\lambda + k} [E_0],$$

где  $k = k_{12} + k_{21}$ .

В рассмотренной открытой системе относительные концентрации ферментных форм согласно формуле (13) будут иметь вид:

$$[E_1^{*o}(\lambda)] = \frac{(\lambda + k_{21})(\lambda[E_0] + v_0)}{\lambda(\lambda + k)}$$

$$[E_2^{*o}(\lambda)] = \frac{k_{12}(\lambda[E_0] + v_0)}{\lambda(\lambda + k)}$$

Применяя обратное преобразование Карсона – Хевисайда, получаем зависимость от времени  $t$  концентрации разных форм фермента, например для  $[E_2^o(t)]$  получается следующее выражение:

$$[E_2^o(t)] = \left( \frac{k_{12}[E_0]}{k} - \frac{k_{12}v_0}{k^2} \right) (1 - e^{-\mu t}) + \frac{k_{12}v_0}{k} t$$

2. Можно рассмотреть другой случай ферментативной реакции, где концентрации ферментных форм так же определяются выражением (12). Этот случай имеет место в ферменто-терапии. В некоторых патологиях наблюдается недостаток фермента и при



лечении применяется ферментотерапия: введение фермента в организм. Некоторые ферменты (например, фибринолизин, стрептолизин, стрептодеказа и т. д.) при этом вводятся внутривенно (или внутриаартериально) путем непрерывной инфузии [8]. В этих случаях приходится решать задачу о зависимости желаемой дозы лекарства от скорости инфузии.

Имеющиеся концентрации фермента в организме можно считать пренебрежимо малыми, и процесс непрерывной инфузии можно рассматривать открытой ферментативной реакцией с нулевой начальной концентрацией и ненулевой начальной скоростью.

Следовательно, постоянные скорости в предстационарной фазе при этом будут иметь вид:

$$k_{ij}^* = k_{ij} + \lambda \frac{v_i^*}{v^*},$$

т.е. вновь можно применять теорему о деревьях. При этом структура графа будет содержать дополнительные  $\lambda$  ветви величиной  $\lambda v_i$ , и значение концентраций будет определяться выражением:

$$[E_i^*(\lambda)] = \frac{v_i^* R_i(\lambda)}{\lambda Q(\lambda)}.$$

В переходной фазе закрытых систем корни характеристического многочлена всегда имеют отрицательную действительную часть [7], и поэтому устойчиво стационарное состояние к которому идет реакция. Поскольку в рамках рассмотренного условия общий определитель один и тот же для обеих систем, то корни характеристического многочлена одинаковы для обеих систем, и в открытых системах также не возможна неустойчивость стационарного состояния. Следовательно, в рамках линейного приближения, при выполнении условия (11), не возможно существование критических состояний (мультистационарность и/или автоколебательный режим).

Важным, на наш взгляд, моментом предложенного подхода является то, что с помощью изложенного приема неоднородные кинетические уравнения решаются алгоритмом однородных уравнений с использованием теории графов. При этом в зависимости от начальных условий и режима притока, конечный результат может быть достаточно громоздким, что существенно уменьшает его практическую ценность. Однако, характер многих биохимических реакций облегчает ситуацию, так как, в подавляющем большинстве случаев одна (свободная) форма фермента бывает в не нулевой начальной концентрации и открытым является именно узел свободного фермента, т.е. выполняется условие (11), что приводит к более простой и практичной формуле (13).

Аддитивное представление решения неоднородной системы кинетических уравнений по (13) позволяет, с одной стороны, расширить возможности граф-теоретического метода, с другой стороны, алгоритмически обобщить результаты многих кинетических исследований закрытых систем. Кроме того, в рамках (13) переменная скорость притока не вызывает особых усилий при теоретическом описании кинетики процесса.

Резюмируя вышеизложенное, можно надеяться, что предложенный подход и полученные выводы окажутся полезными и найдут нужное место в линейных граф-теоретических исследованиях кинетики биохимических процессов.

1. Б.Н. Гольдштейн, *Кинетические графы в энзимологии*, Наука, Москва, (1989) 185.
2. Э.Корниш-Боуден, *Основы ферментативной кинетики*, Мир, Москва, (1979) 280.
3. K.C. Chou, and W.M.Liu, *J.Theor.Biol.*, **91** (1981) 285.

4. B.N. Goldstein, *J. Theor. Biol.*, **103** (1983) 247.
5. C.Y. Huang, *Contemporary enzyme kinetics and mechanism*. Ed. D.L.Purich. N.Y.: *J.Diochem. Acad.Press*, (1983) 9.
6. Г.Корн, Т. Корн, *Справочник по математике*, Наука, Москва, (1984) 831.
7. Дж.Уей, Ч. Претер, *Катализ. Полифункциональные катализаторы и сложные реакции*, Мир, Москва, (1965) 69-280.
8. М.Д. Машковский *Лекарственные средства, Медицина, Москва*, 2 (1988).

**AÇIQ BİOKİMYƏVİ REAKSİYALARIN KEÇİD FAZASININ  
QURULUŞ KİNETİKASI**

**Ş.Q.BAYRAMOV, Z.H. TAĞIYEV, G.H.HACIYEVA**

Açıq biokimyəvi reaksiyaların keçid fazasının kinetikasını öyrənmək üçün qraf nəzəriyyəsini tətbiq etməklə nəzəri üsul təklif edilmişdir. Bəzi xüsusi hallar üçün açıq biokimyəvi reaksiyaların keçid fazasında müxtəlif ferment komplekslərinin konsentrasiyalarını təyin etmək üçün düstur alınmışdır. Alınmış düsturun tətbiqinə aid misallar gətirilmişdir.

**STRUCTURAL KINETICS of OPENED ENZYMATIC  
REACTIONS in TRANSIENT PHASE**

**SH.K.BAYRAMOV Z.H.TAGIYEV, G.H.HAJIYEVA**

A theoretical approach for the transient phase kinetics of opened biochemical reactions was suggested by graph-theoretical method. A formula for determination of various enzyme complexes concentration in transient phase of opened biochemical reactions was obtained in some particular cases. A sample application of the formula in investigation kinetics of mechanism of opened reaction was demonstrated.

Редактор: Ш.Нариев