

УДК 591.133:577.15:599.723.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ $K_m V'$ -СИСТЕМЫ КООРДИНАТ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКЕ

Г.П. Лапина, Н.В. Золотарева

Тверской государственной университет

Построен и проанализирован «геометрический портрет» ферментативной системы, состоящей из алкогольдегидрогеназы (АДГ) печени лошади, C_2H_5OH , НАД при введении различных эффекторов (фармакологических препаратов) – зорекса, унитиола (составной части зорекса) и пирацетама. Рассчитаны ферментативные параметры. Обнаружено, что при воздействии различных активаторов меняется не только интенсивность, но и тип, а также механизм изучаемой ферментативной реакции.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа (АДГ) печени лошади, интенсивность активирующего эффекта, двухпараметрически согласованная активация (Ia-тип), двухпараметрически рассогласованная активация (IIa-тип), «геометрический портрет».

Введение. Наиболее полно изучен ферментативный механизм утилизации этанола в организме человека с участием фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ). Однако вопросы регуляции ферментативной активности алкогольдегидрогеназы мало изучены. Данные ряда работ [2; 3; 4] свидетельствуют об ингибирующем влиянии на каталитическую активность АДГ из дрожжей различных соединений неорганической и органической природы, в частности ряда ионов металлов, анионов, некоторых азотсодержащих, а также серосодержащих органических соединений, в том числе пестицидов. Однако данные исследования проводились главным образом с целью изучения физико-химических свойств фермента.

По величинам K_a невозможно проследить за развитием интенсивности активирующего эффекта от молекулярной массы активатора. При использовании такого подхода возможна лишь общая интерпретация полученных экспериментальных зависимостей.

Наибольший интерес в последнее время вызывают фармакологические препараты зорекс, унитиол и пирацетам, оказывающие влияние на каталитическую активность АДГ, но физико-химическое действие которых до конца не изучено. В работе [2] изучено влияние пирацетама на каталитическую активность АДГ печени лошади.

Цель настоящей работы – построение и анализ «геометрического портрета» (визуализации специфических особенностей хода течения химической реакции) изучаемой ферментативной системы с АДГ при добавлении различных ферментативных препаратов пирацетам, зорекс и унитиол.

Методика. Из группы препаратов, применяемых в практической медицине, для изучения регуляции активности АДГ были выбраны эффекторы пирацетам, зорекс и унитиол, т.к. они являются одними из самых применяемых при лечении больных хроническим алкоголизмом [1; 2]. Для изучения каталитической реакции в спектрофотометрическую кювету помещали по 0,1 мл каждого из эффекторов фиксированной концентрации ($1,5 \times 10^{-2} \text{M}$), 0,1 мл раствора субстрата НАД ($1,5 \times 10^{-2} \text{M}$), 0,1 мл раствора субстрата этилового спирта ($1,5 \times 10^{-2} \text{M}$), 0,1 мл АДГ ($2,41 \times 10^{-4} \text{M}$). Содержимое кювет быстро перемешивали и определяли оптическую плотность (D) при длине волны 345 нм в течение 5 мин через каждые 15 с на спектрометре «Spesol». Контрольная кювета не содержала субстрата (субстрат заменяли бидистиллированной водой).

Ферментативная реакция сопровождается восстановлением НАД. При окислении спирта происходит восстановление НАД до НАД·Н₂ (на 1 моль окисленного спирта приходится 1 моль НАД·Н₂). Его количество определялось спектрофотометрически при $\lambda=345 \text{nm}$. Конечным продуктом ферментативной реакции является уксусный альдегид [3; 5].

Объекты исследования: 1) фермент АДГ печени лошади – очищенный, гомогенный, коммерческий препарат фирмы «Reanal» (Венгрия); 2) пирацетам (2-оксо-1-пирролидинилацетамид) – фармакологический, коммерческий препарат фирмы ОАО «Фармстандарт-УфаВита» (Россия); 3) зорекс – фармакологический, коммерческий препарат (состоящий из унитиола (2,3-димеркаптопропансульфонат натрия) и кальция пантотената) – препарат фирмы «Valenta» (Россия).

Результаты и обсуждение. Для каждой из изучаемых систем (система 1 включала в себя АДГ, С₂Н₅ОН, НАД и унитиол, система 2 – АДГ, С₂Н₅ОН, НАД и пирацетам, система 3 – АДГ, С₂Н₅ОН, НАД и зорекс), строили и анализировали кинетические зависимости изменения оптической плотности D во времени t течения ферментативной реакции для рН водной среды 6,0. Строили кинетические кривые (D – t). Кривые имели стандартный вид с насыщением. По полученным зависимостям для каждой системы определяли и анализировали важнейшие ферментативные параметры (K_m, V_{max}) каталитической активности АДГ (табл. 1).

Таблица 1

Рассчитанные значения каталитических характеристик и молекулярной массы для фармакологических препаратов зорекс, унитиол и пирацетам

Системы	Субстраты	$K_m, \times 10^{-5} \text{M}$	$V_{max}, \times 10^{-4}$ опт.ед./с	Молекулярный вес	Тип активаци ции
	контроль	2,51	1,11	-	-
1	унитиол	2,12	3,30	124,00	Ia
2	пирацетам	5,01	2,11	142,16	IIa
3	зорекс	2,03	3,57	612,09	Ia

Установлено, что введение в систему зорекса и унитиола влияет на изменение кинетических параметров АДГ, а именно, способствует активации фермента по типу Ia-двухпараметрически согласованной активации, который характеризуется тем, что присутствие активатора (пирацетама) в фермент-субстратной системе ведет к усилению связывания фермента с субстратом и к увеличению максимально скорости его окисления:

$$K'_m < K_m^0, V' > V^0,$$

где K'_m – эффективная, а K_m^0 – кажущаяся константы Михаэлиса, V' – максимальная скорость реакции, определяемая в присутствии активатора (пирацетама), V^0 – максимальная скорость без активатора.

Данному типу активации фермента АДГ будет удовлетворять такое положение прямой активируемой реакции относительно прямой исходной реакции, которая описывается уравнением

$$V_a = V' / \left(1 + \left(\frac{K'_m}{S} \right) \right)$$

или в линеаризованном виде

$$\frac{1}{V_a} = \left(\frac{K'_m}{V'} \right) \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V'}.$$

Эта прямая проходит ниже исходной с углом наклона к оси абсцисс, уменьшенным в $K_m^0 \cdot V' / K'_m \cdot V^0$ раз относительно исходной и пересекает её во втором квадранте координат Лайнуивера-Берка в точке, определяемой вышеприведенными уравнениями.

Уравнение для расчета значения K_{Ia} имеет вид:

$$K_{Ia} = a / \left(\left(\frac{K_m^0 \cdot V'}{K'_m \cdot V^0} \right) - 1 \right).$$

графическое построение данных в координатах $\left(\left(\frac{K_m^0 \cdot V'}{K'_m \cdot V^0} \right) - 1 \right) - [a]$

дано на рис. 1 и позволяет рассчитать K_{Ia} по формуле $K_{Ia} = 1/\text{tgr}$.

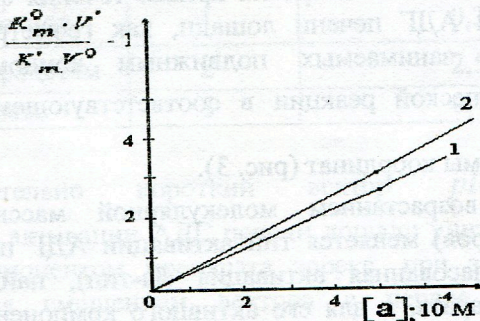


Рис. 1. Активация АДГ унитиолом (1) и зорексом (2)

Рассчитанное значение K_{Ia} составляет $4,54 \times 10^{-4}$ М для препарата унитиола и $3,36 \times 10^{-4}$ М для зорекса.

Двухпараметрически рассогласованной активации АДГ типа IIa – соответствует увеличение максимальной скорости реакции и ослабление связывание фермента с субстратом, т.е.

$$V' > V^0, \quad K_m' > K_m^0$$

Уравнение для расчета константы K_{IIa} данного двухпараметрически рассогласованного типа активации АДГ при введении пираретама имеет вид

$$K_{IIa} = \frac{a}{\left(\frac{K_m' \cdot V'}{K_m^0 \cdot V^0} \right) - 1}$$

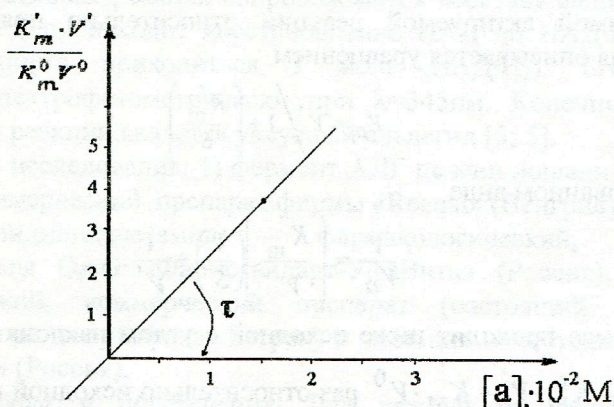


Рис. 2. Активация АДГ пираретамом

Графическое построение представлено на рис. 2 и позволяет рассчитать значение $K_{IIa} = 1/\text{tg}\tau$, составившее $0,44 \times 10^{-2}$ М.

Более детальную информацию о функционировании АДГ и способностях её регуляции можно получить с использованием трехмерной

$K_m' V'$ -системы координат.

На основе данных табл.1 построена кривая течения ферментативной реакции, катализируемой АДГ печени лошади, как геометрическое место точек, последовательно занимаемых подвижным концом трехмерных \vec{L} -векторов биокаталитической реакции в соответствующем пространстве

трехмерной $K_m' V'$ -системы координат (рис. 3).

Видно, что с возрастанием молекулярной массы эффекторов (ингибиторов и активаторов) меняется тип активации АДГ печени лошади: двухпараметрически согласованная активация (Ia-тип), найденная и для основного (зорекса) препарата, и для его активного компонента (унитиола), становится двухпараметрически рассогласованной активацией (IIa-тип) при введении в ферментативную систему препарата пираретама. Рассчитаем

дополнительный ферментативный параметр – интенсивность активации для 3-х обсуждаемых систем, т.е. длины [4; 5; 6] $\vec{p\bar{I}a}_{(1)}$ -, $\vec{p\bar{I}a}_{(2)}$ -, $\vec{p\bar{I}a}_{(3)}$ -векторов (табл. 2).

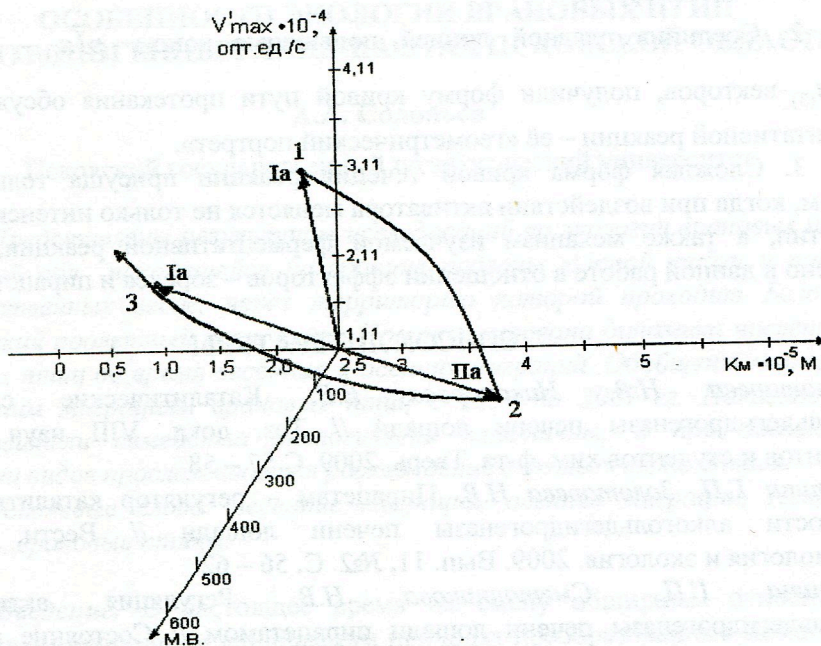


Рис. 3. Влияние на каталитическое поведение АДГ печени лошади препаратов зорекс (3), унитиол (1) и пирацетам (2) в трехмерной

$K_m' V'$ -системе координат

Таблица 2

Значения длин $\vec{p\bar{I}a}_{(1)}$ -, $\vec{p\bar{I}a}_{(2)}$ -, $\vec{p\bar{I}a}_{(3)}$ -векторов

Препарат	Системы	Длины \vec{p} - векторов, у.е.
Унитиол	1	0,39
Пирацетам	2	2,50
Зорекс	3	0,48

Относительно короткий вектор $\vec{p\bar{I}a}_{(1)}$, характеризующий интенсивность активации АДГ печени лошади унитиолом, который является активным компонентом препарата зорекс, при замене его на пирацетам сопровождается смещением вектора в первое объемное пространство

$K_m' V'$ -системы координат, значительно возрастает его длина (до 2,50 у.е.).

Выводы. 1. Сравнение эффективности активации АДГ печени лошади препаратами унитиол и зорекс подтверждает вклад активного компонента унитиола, а именно, эффективность активации АДГ унитиолом составляет 81,25%, т. е. доминирует.

2. Соединив плавной линией подвижные концы $p\bar{I}a_{(1)}$ -, $p\bar{I}a_{(2)}$ - и $p\bar{I}a_{(3)}$ -векторов, получили форму кривой пути протекания обсуждаемой ферментативной реакции – её «геометрический портрет».

3. Сложная форма кривой течения реакции присуща только тем случаям, когда при воздействии активатора меняется не только интенсивность, но и тип, а также механизм изучаемой ферментативной реакции, что и выявлено в данной работе в отношении эффекторов – зорекса и пирацетама.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотарева Н.В. Никонорова Е.В. Каталитические свойства алкогольдегидрогеназы печени лошади // Тез. докл. VIII науч. конф. аспирантов и студентов хим. ф-та. Тверь, 2009. С 57 – 58.
2. Лапина Г.П. Золотарева Н.В. Пирацетам – регулятор каталитической активности алкогольдегидрогеназы печени лошади // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2009. Вып. 11, №2. С. 56 – 62.
3. Лапина Г.П., Сметанникова Н.В. Регуляция активности алкогольдегидрогеназы печени лошади пирацетамом // Состояние воды в биологических и модельных системах: Тез. докл. I Междунар. конф. Тверь, 2007. С. 173 – 174.
4. Лапина Г.П. Элементы кинетики ферментативных реакций. Тверь, 2006. С. 64 – 65.
5. Лапина Г.П. Пероксидазы растений, протеолитические ферменты, протеазы: структурные и регуляторные свойства. Тверь, 2008.
6. Лапина Г.П. Окислительно-восстановительные ферменты растений. Тверь, 2007.

THREE-DIMENSIONAL $K_m V'$ - SYSTEMS OF COORDINATES THE ANALYSIS OF DATA FERMENT-KYNETIK WITH USE

G.P. Lapina, N.V. Zolotareva

Tver State University

The work purpose – to construct and analyze «a geometrical portrait» studied ferment systems at addition of preparations Piracet, Zorex, Unitol, calculation additional ferments parameters. Use of sizes K_a does not allow to track development of intensity of activating effect from molecular weight of the activator.

Key words: liver alcohol dehydrogenase (ADG) of horse, rate of activating ferment, two-parameter coordinated activation (Ia-type), two-parameter noncoordinated activation (IIa-type), «geometric portrait».