

10. *Строение* триптических пептидов полиэдрина вируса ядерного полиэдроса озимой совки, *Agrotis segetum* / Н. М. Гусак, Э. А. Козлов, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный // Там же.— № 6.— С. 312—317.
11. *Строение* некоторых триптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, С. Б. Серебряный, Н. В. Роднин, Э. А. Козлов // Там же.— 1986.— 2, № 1.— С. 30—35.
12. *Строение* некоторых хитотриптических пептидов гранулина вируса гранулеза озимой совки, *Agrotis segetum* / Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, С. Б. Серебряный, Э. А. Козлов // Там же.— № 2.— С. 73—81.
13. *Сравнение* аминокислотных последовательностей белков тел включений вирусов ядерного полиэдроса тутового, непарного шелкопряда и большой воцниной моли / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биоорг. химия.— 1981.— 7, № 7.— С. 1008—1015.
14. *Серусодержащие* аминокислоты полиэдриного белка вируса желтухи тутового шелкопряда / С. Б. Серебряный, В. М. Кавсан, В. К. Кибирев, М. С. Кацман // Химия природ. соединений.— 1986.— № 3.— С. 174—178.
15. Moor S., Stein N. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids related compounds // J. Biol. Chem.— 1954.— 211, N 2.— P. 907—913.
16. Кавсан В. М., Мороз Л. В., Серебряный С. Б. Приспособление для горизонтального высоковольтного электрофореза на бумаге упрощенной конструкции // Укр. биохим. журн.— 1986.— 40, № 1.— С. 104—106.
17. Eastly C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 107, N 2.— P. 386—388.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев
Ин-т биохимии АН УССР им. А. В. Палладина,
Киев

Получено 27.02.86

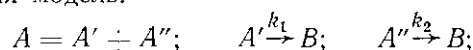
УДК 577.3.001.57

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТИ НЕКОТОРЫХ БИЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

С. А. Бобровник

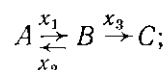
Изучение механизмов биологических процессов обычно невозможно без проведения исследований кинетики превращения веществ, участвующих в этих процессах. Характерной особенностью кривых кинетики многих биологических процессов является то, что в полулогарифмической системе координат они хорошо аппроксимируются двумя прямыми, пересекающимися под определенным углом, т. е. являются биэкспоненциальными. К примеру, биэкспоненциальный вид имеют кривые кинетики гибридизации ДНК на фильтрах [1], адсорбции многих вирусов на клетках хозяина [2—4], термоинактивации антител [5] и многие другие. Подобный вид кинетических кривых может быть обусловлен различными причинами: гетерогенностью реагирующих компонентов, обратимостью отдельных стадий реакции, многоступенчатостью процесса и т. д. Рассмотрим несколько моделей, описывающих такие реакции:

1) гетерогенная модель:



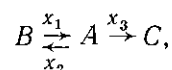
($k_1 \neq k_2$), где вещество A состоит из смеси двух видов молекул или частиц A' и A'' , превращающихся в B с различными скоростями;

2) последовательная модель:



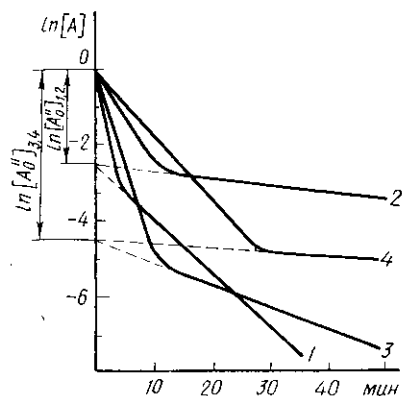
здесь исходное вещество A обратимо превращается в B , которое в свою очередь может необратимо превращаться в C ;

3) конкурентная модель:



в которой исходное вещество A может обратимо превращаться в B или необратимо — в C .

Решение систем дифференциальных уравнений, описывающих рассмотренные выше процессы, приводит к сложным трансцендентным иррациональным уравнениям. Определение значений констант скоростей реакции из этих уравнений известными методами требует применения ЭВМ и больших затрат времени. В настоящей работе предложен простой метод численного решения подобных уравнений, позволяющий с высокой точностью вычислять из кинетических кривых константы скорости реакций.



Теоретические кривые изменения концентрации вещества для двухкомпонентной гетерогенной модели: 1, 2 — $\ln[A_0''] = -2,3$; 3, 4 — $\ln[A_0'''] = -4,3$

Theoretical curves of the substrate concentration changes for the two-component heterogeneous model: 1, 2 — $\ln[A_0''] = -2,3$; 3, 4 — $\ln[A_0'''] = -4,3$

Рассмотрим вначале двухкомпонентную гетерогенную модель. Динамика изменения концентрации вещества A для этой модели будет описываться уравнениями:

$$\begin{cases} \frac{d[A']}{dt} = -k_1 [A']; \\ \frac{d[A'']}{dt} = -k_2 [A''], \end{cases} \quad (1)$$

откуда

$$[A] = [A_0'] \exp(-k_1 t) + [A_0''] \exp(-k_2 t), \quad (2)$$

где $[A_0']$ и $[A_0'']$ — начальные значения концентраций A' и A'' .

Теоретические кривые изменения концентрации вещества A , рассчитанные из уравнения (2), аппроксимируются двумя прямыми, пересекающимися под определенным углом (рисунок), если $k_1 \gg k_2$ (или $k_2 \gg k_1$). В связи с этим при больших значениях t для таких процессов можно считать, что $[A_0'] \exp(-k_1 t) \approx 0$ (если $k_1 \gg k_2$), и кинетика подобных реакций (при $t \gg 0$) с высокой точностью описывается уравнением первого порядка:

$$[A] \approx [A_0''] \exp(-k_2 t) \text{ при } t \gg 0, \quad (3)$$

откуда

$$\ln [A] \approx \ln [A_0''] - k_2 t. \quad (4)$$

Тогда

$$k_2 = \frac{\ln \frac{[A_n]}{[A_{n+1}]}}{t_{n+1} - t_n}, \quad (5)$$

где $[A_n]$ и $[A_{n+1}]$ — концентрации вещества A в моменты времени t_n и t_{n+1} ($0 \ll t_n < t_{n+1}$). Из уравнения (4) видно, что в полулогарифмической системе координат касательная к кинетической кривой при $t \gg 0$ имеет угол наклона, тангенс которого равен k_2 , и эта касательная пересекает ось ординат на расстоянии, равном $\ln [A_0'']$ от начала координат (рисунок). Зная координаты этой касательной, можно легко найти значение $\ln [A_0'']$:

$$\ln [A_0''] = \frac{t_{n+1} \ln [A_n] - t_n \ln [A_{n+1}]}{t_{n+1} - t_n}, \quad (6)$$

откуда

$$[A_0''] = \exp\left(\frac{t_{n+1} \ln [A_n] - t_n \ln [A_{n+1}]}{t_{n+1} - t_n}\right). \quad (7)$$

Для определения значения k_1 преобразуем уравнение (2) следующим образом:

$$[A] - [A_0''] \exp(-k_2 t) = \{[A_0] - [A_0'']\} \exp(-k_1 t). \quad (8)$$

Тогда

$$\exp(-k_1 t) = \frac{[A] - [A_0''] \exp(-k_2 t)}{[A_0] - [A_0'']}, \quad (9)$$

откуда

$$k_1 = \frac{1}{t_1} \ln \frac{[A_0] - [A_0'']}{[A_1] - [A_0''] \exp(-k_2 t_1)}, \quad (10)$$

где $[A_1]$ — концентрация вещества A в момент времени t_1 .

Таким образом, получены простые выражения для определения констант скоростей из кинетических кривых для двухкомпонентной гетерогенной модели, а также исходного количества компонентов $[A_0'']$ и $[A_0'] = [A_0] - [A_0'']$.

Система дифференциальных уравнений, описывающих изменения концентрации веществ A , B и C в соответствии с последовательной моделью, будет следующей:

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -(x_1 + x_2)[A] + x_2[B]; \\ \frac{d[B]}{dt} = x_1[A] - x_2[B]; \\ \frac{d[C]}{dt} = x_3[A], \end{cases} \quad (11)$$

где x_1 , x_2 и x_3 — константы скорости реакции. Если при $t = 0$ $[A] = [A_0]$, $[B] = 0$ и $[C] = 0$, то $[C] = [A_0] - ([A] + [B])$, и третье уравнение является линейной комбинацией двух первых дифференциальных уравнений. Решение полученной системы дифференциальных уравнений приводит к трансцендентным иррациональным выражениям зависимости концентраций веществ A и B от констант скоростей реакции и времени:

$$[A] = \frac{[A_0]}{\sqrt{b^2 - 4c}} \left\{ \left(\frac{b + \sqrt{b^2 - 4c}}{2} - x_2 - x_3 \right) \exp\left[\frac{t}{2}(-b - \sqrt{b^2 - 4c})\right] - \left(\frac{b - \sqrt{b^2 - 4c}}{2} - x_2 - x_3 \right) \exp\left[\frac{t}{2}(-b + \sqrt{b^2 - 4c})\right] \right\}; \quad (12)$$

$$[B] = \frac{x_1 [A_0]}{\sqrt{b^2 - 4c}} \left\{ \exp\left[\frac{t}{2}(-b + \sqrt{b^2 - 4c})\right] - \exp\left[\frac{t}{2}(-b - \sqrt{b^2 - 4c})\right] \right\}, \quad (13)$$

где $b = x_1 + x_2 + x_3$, $c = x_1 x_3$.

Для конкурентной модели:

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = -(x_1 + x_3)[A] + x_2[B]; \\ \frac{d[B]}{dt} = x_1[A] - x_2[B]; \\ \frac{d[C]}{dt} = x_3[A]. \end{cases} \quad (14)$$

При тех же начальных условиях, что и для последовательной модели, получим:

$$[A] = \frac{[A_0]}{\sqrt{b^2 - 4c}} \left\{ \left(\frac{-b + \sqrt{b^2 - 4c}}{2} + x_2 \right) \exp \left[\frac{t}{2} (-b + \sqrt{b^2 - 4c}) \right] - \left(\frac{-b - \sqrt{b^2 - 4c}}{2} + x_2 \right) \exp \left[\frac{t}{2} (-b - \sqrt{b^2 - 4c}) \right] \right\}; \quad (15)$$

$$[B] = \frac{k_1 [A_0]}{\sqrt{b^2 - 4c}} \left\{ \exp \left[\frac{t}{2} (-b + \sqrt{b^2 - 4c}) \right] - \exp \left[\frac{t}{2} (-b - \sqrt{b^2 - 4c}) \right] \right\}, \quad (16)$$

где $b = x_1 + x_2 + x_3$, $c = x_2 x_3$.

Подставляя в полученные выражения (12) или (15) три различных значения концентрации вещества A в соответствующие моменты времени, получим системы трех трансцендентных иррациональных уравнений с тремя неизвестными (x_1 , x_2 и x_3), численное решение которых позволит определить константы скорости реакции для последовательной или конкурентной модели. Однако подобный способ определения констант скорости известными в настоящее время методами является очень громоздким и трудоемким из-за сложности решения систем трансцендентных уравнений и требует применения ЭВМ.

Предлагаемый в настоящей работе метод решения подобных уравнений, а значит и определения констант скорости реакции из кинетических кривых, состоит в следующем. Уравнения (12) и (15), описывающие изменение концентрации вещества A для последовательной и конкурентной моделей, сходны с уравнением (2), соответствующим гетерогенной модели, и отличаются только показателями экспоненциальных множителей и коэффициентами при этих множителях. Поскольку отыскать значения этих величин из кинетических кривых для гетерогенной модели можно при помощи выражений (5), (7) и (10), то, приравнявая найденные значения соответствующим выражениям в уравнениях (12) или (15), получим две системы трех уравнений с тремя неизвестными. Для последовательной модели (при $[A_0] = 1$):

$$\begin{cases} [A_0]'' = \frac{x_2 + x_3 - x_1 + \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_1 x_3}}{2 \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_1 x_3}}; \\ k_1 = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_1 x_3}}{2}; \\ k_2 = \frac{x_1 + x_2 + x_3 - \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_1 x_3}}{2}. \end{cases} \quad (17)$$

Откуда получим:

$$x_1 = k_1 - [A_0]'' (k_1 - k_2); \quad (18)$$

$$x_2 = k_2 + [A_0]'' (k_1 - k_2) - \frac{k_1 k_2}{k_1 - [A_0]'' (k_1 - k_2)}; \quad (19)$$

$$x_3 = \frac{k_1 k_2}{k_1 - [A_0]'' (k_1 - k_2)}. \quad (20)$$

Для конкурентной модели аналогично (при $[A_0] = 1$):

$$\begin{cases} [A_0]'' = \frac{x_2 - x_1 - x_3 + \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_2 x_3}}{2 \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_2 x_3}}; \\ k_1 = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_2 x_3}}{2}; \\ k_2 = \frac{x_1 + x_2 + x_3 - \sqrt{(x_1 + x_2 + x_3)^2 - 4x_2 x_3}}{2}. \end{cases} \quad (21)$$

Откуда:

$$x_1 = k_1 + [A_0''] (k_1 - k_2) - \frac{k_1 k_2}{k_2 + [A_0''] (k_1 - k_2)} ; \quad (22)$$

$$x_2 = k_2 + [A_0''] (k_1 - k_2); \quad (23)$$

$$x_3 = \frac{k_1 k_2}{k_2 + [A_0''] (k_1 - k_2)} . \quad (24)$$

Таким образом, получены простые выражения, позволяющие определить значения констант скоростей x_1 , x_2 и x_3 для последовательной и конкурентной моделей, используя значения k_1 , k_2 и $[A_0'']$, вычисленные которых из кинетических кривых описано выше.

Значения x_1 , x_2 и x_3 , взятые для расчета теоретических кривых, и эти же величины, вычисленные из полученных теоретических кривых при помощи выражений (18—20) или (22—24)

x_1 , x_2 and x_3 values, taken for determination of theoretical curves, and the some determinants, acquired from the theoretical curves obtained by equations (18—20) or (22—24)

Константы	Последовательная модель		Конкурентная модель	
	Исходные значения констант	Вычисленные значения константа	Исходные значения константа	Вычисленные значения констант
x_1	1,0	1,0000010	0,8	0,8000022
x_2	0,3	0,3000024	0,2	0,2000012
x_3	0,1	0,1000003	0,3	0,2999984

Примечание. При вычислении представленных в таблице констант скорости из рассчитанных теоретических кривых были взяты следующие значения концентраций и времени: для последовательной модели — $t_1=1$, $[A_1]=4,37758 \cdot 10^{-1}$; $t_n=30$, $[A_n]=2,69757 \cdot 10^{-2}$; $t_{n+1}=50$, $[A_{n+1}]=5,95916 \cdot 10^{-3}$; $[A_0'']=2,59809 \cdot 10^{-1}$; для конкурентной модели — $t_1=1$, $[A_1]=3,701865 \cdot 10^{-1}$; $t_n=30$, $[A_n]=2,99945 \cdot 10^{-2}$; $t_{n+1}=50$, $[A_{n+1}]=1,1503 \cdot 10^{-2}$; $[A_0'']=1,26296 \cdot 10^{-1}$.

В таблице приведены значения констант скорости реакции, произвольно выбранные для расчета теоретических кривых, и эти же константы, вычисленные из полученных теоретических кривых при помощи выражений (18—20) для последовательной и (22—24) для конкурентной моделей (все расчеты выполнены при помощи микрокалькулятора «Электроника БЗ-21»). Как видно из таблицы, предлагаемый метод позволяет вычислять константы скорости реакции с высокой точностью.

В заключение отметим, что при экспериментальных исследованиях выбор одной из рассмотренных моделей можно сделать следующим образом. Если механизм реакции соответствует гетерогенной модели, тогда касательные к кинетическим кривым (при $t \gg 0$), полученные при различных температурах, в полулогарифмической системе координат должны пересекать ось ординат в одной точке (рисунок, кривые 1—4), расстояние которой от начала координат равно логарифму начальной концентрации медленно реагирующего вещества ($\ln [A_0'']$). Можно также (если есть такая возможность) после резкого снижения скорости реакции каким-то образом ее остановить, исходное вещество отделить от продуктов реакции и повторно изучить кинетику реакции оставшегося непрореагировавшего вещества. Очевидно, что если предположение о гетерогенности вещества А по константам скорости реакции верно, тогда оставшаяся часть вещества А будет реагировать с константой скорости k_2 , и кинетическая кривая на полулогарифмическом графике будет прямой линией с тангенсом угла наклона, равным k_2 . Если же будет получена кинетическая кривая прежнего вида, значит, предположение о двухкомпонентности вещества А неверно.

Для выбора между последовательной и конкурентной моделями следует изучить динамику изменения суммы концентраций исходного

вещества A и промежуточного продукта B . Как показано ранее [6], кривая зависимости $[A] + [B]$ от времени для последовательной модели на полулогарифмическом графике является выпуклой, а для конкурентной модели — вогнутой, что дает возможность сделать выбор между этими моделями.

В тех случаях, когда установлено, что механизм исследуемой реакции соответствует последовательной или конкурентной модели, подставляя экспериментальные значения концентрации вещества в моменты времени t_1 , t_n и t_{n+1} в выражения (5), (7) и (18—20) или (22—24), получим величины констант скорости реакции.

Метод был успешно применен в работах [4—6] при определении констант скорости процесса адсорбции вирусов на клетках хозяина и реакции термоденатурации антител.

DETERMINATION OF RATE CONSTANTS FOR CERTAIN BIEXPONENTIAL BIOLOGICAL PROCESSES

S. A. Bobrovnik

T. G. Shevchenko State University, Kiev

Summary

Three types of reactions whose kinetic curves in the semilogarithmic scale are approximated well by the two lines intercepting at a definite angle are considered. The solution of the system of differential equations describing such reactions results in complex systems of transcendental equations of the reagent concentration time and rate constants dependence. A new method is suggested for numerical solution of similar equations. The method permits determining the rate constants on the basis of the experimental kinetic curves.

1. *Flavell R. A.* DNA-DNA hybridization on nitrocellulose filters. 1. General considerations and non-ideal kinetics // *Eur. J. Biochem.*— 1974.— 47, N 3.— P. 535—543.
2. *Stent G. S., Wollman E. I.* On the two-step nature of bacteriophage absorption // *Biochim. et biophys. acta.*— 1952.— 8, N 3.— P. 260—269.
3. *Christensen J. R.* The kinetics of reversible and irreversible attachment of bacteriophage T1 // *Virology.*— 1965.— 26, N 4.— P. 727—737.
4. *Бобровник С. А., Менджул М. И., Лысенко Т. Г.* Кинетика, механизм и термодинамика процесса адсорбции цаннофага А-1 на клетках водоросли-хозяина // *Биофизика.*— 1978.— 23, № 3.— С. 489—493.
5. *Бобровник С. А.* Кинетика и некоторые термодинамические характеристики процесса термоннактиваии специфичных к стафилококку антител // *Молекуляр. генетика и биофизика.*— 1983.— № 8.— С. 27—32.
6. *Бобровник С. А., Менджул М. И., Калниш В. В.* Кинетика и термодинамика адсорбции цаннофага LPP-1 на клетках водоросли *Plectoneta borjaniun* // *Мат. модели в биологии.*— Киев: Наук. думка, 1973.— С. 87—97.

Киев. гос. ун-т

Получено 10.02.86