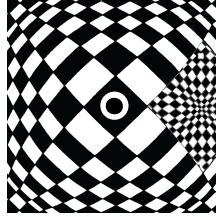


Кинетика ферментативных процессов

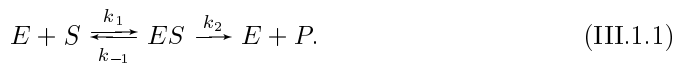


§ 1. Простейшие ферментативные реакции

Подавляющее большинство важнейших биологических процессов протекает с участием ферментов, химические свойства которых рассматривают в курсах по биохимии. Ферменты играют ключевую роль в клеточном метаболизме, определяя не только пути превращения веществ, но и скорости образования продуктов реакций. Физические аспекты и механизмы ферментативного катализа подробно рассмотрены в гл. XIV, здесь же будут описаны кинетические свойства ферментативных реакций, которые определяют характер динамического поведения метаболических процессов. Характер ферментативных процессов допускает феноменологическое описание их кинетики с помощью систем дифференциальных уравнений, переменными в которых выступают концентрации взаимодействующих веществ: субстратов, продуктов, ферментов. При этом достаточно использовать общие биохимические представления о последовательности событий в ферментативной реакции, не вдаваясь в физические детали механизмов, т. е. учитывать, что необходимым этапом ферментативного катализа является образование фермент-субстратного комплекса (комплекс Михаэлиса), а также использовать представления о регулировании ферментативных процессов ингибиторами и активаторами.

Кинетический анализ оказался эффективным при изучении разнообразных ферментативных реакций и позволил не только разработать методы количественной оценки эффективности ферментативных процессов, но и сделать определенные выводы об их механизмах и способах регулирования. При построении математических моделей ферментативных процессов широко применяют изложенные выше методы качественного изучения моделей биологических систем.

Уравнение Михаэлиса–Ментен. Наиболее простая ферментативная реакция с участием одного субстрата и образованием одного продукта выглядит следующим образом:



Здесь S — субстрат; P — продукт; E — фермент; ES — субстрат-ферментный комплекс; k_1 , k_{-1} — константы прямой и обратной реакций образования фермент-субстратного комплекса; k_2 — константа скорости образования продукта. Эта реакция при малых концентрациях продукта является, как правило, необратимой. Константа эффективного распада фермент-субстратного комплекса k_2 показывает,

сколько актов катализа в единицу времени может осуществлять фермент, и поэтому называется числом оборотов фермента. Запишем систему дифференциальных уравнений, отвечающую схеме реакций (III.1.1)

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES], \\ d[E]/dt &= -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] + k_2[ES], \\ d[ES]/dt &= k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES], \\ d[P]/dt &= k_2[ES]. \end{aligned} \quad (\text{III.1.2})$$

Сложив второе и третье уравнения системы (III.1.2), получим условие сохранения общего количества фермента в системе:

$$\frac{d}{dt}([E] + [ES]) = 0, \quad \text{или} \quad [E] + [ES] = [E_0] = \text{const.} \quad (\text{III.1.3})$$

В замкнутой системе сохраняется также сумма масс субстрата и продукта $[S] + [P] = \text{const.}$ Как видно из (III.1.2), $d[E]/dt = -d[ES]/dt$. Выразим $E = E_0 - (ES)$ и заметим, что последнее уравнение в (III.1.2) для изменения продукта определяется переменной ES . Тогда вместо четырех уравнений (III.1.2) можно решать систему всего из двух дифференциальных уравнений для переменных $[S]$ и $[ES]$:

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= -k_1[S][E_0 - (ES)] + k_{-1}[ES], \\ d[ES]/dt &= k_1[S][E_0 - (ES)] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]. \end{aligned} \quad (\text{III.1.3 a})$$

Характерное время изменения субстрата, очевидно, равно $\tau_s = [S_0]/v_p$, где v_p — скорость ферментативной реакции. Максимальное значение v_p составляет $\mu_0 - k_2[E_0]$. Следовательно, минимальное значение τ_s равно $\tau_s^{\min} = [S_0]/k_2[E_0]$. Посмотрим, насколько различаются эти переменные по скоростям своих изменений. Характерное время оборота фермента определяется в основном реакцией распада $[ES]$ и константой k_2 ($k_2 \gg k_1$). Оно равно $\tau_E = 1/k_2$.

В реальных биохимических процессах концентрация субстрата во много раз превышает концентрацию свободного фермента (обычно $[E_0] = 10^{-6}\text{M}$, а $[S_0] = 10^{-2}\text{M}$). Таким образом, $[E_0]/[S_0] = 10^{-4}$. \square

Отсюда $\tau_S \gg \tau_E$, т. е. переменная S меняется намного медленнее, чем $[ES]$, а это означает, что скорость изменения субстрата мала по сравнению со скоростью изменения фермент-субстратного комплекса. Следовательно, при рассмотрении поведения системы на достаточно больших отрезках времени концентрацию фермент-субстратного комплекса $[ES]$ во втором уравнении (III.1.4) можно полагать квазистационарной, а само второе уравнение этой системы может быть заменено алгебраическим. Более строго этот результат можно получить путем замены переменных в (III.1.2) и введением безразмерных величин:

$$x = [ES]/[E_0], \quad y = [S]/[S_0], \quad z = [P]/[S_0], \quad \tau_E = k_2[E_0]t/[S_0], \quad k_{-1}/k_2 = n.$$

Разделив правую и левую части второго уравнения на величину $k_1[S_0]/k_2 = m$, получим:

$$dy/dt = nx - my(1 - x), \quad \frac{[E_0]}{[S_0]} \frac{dx}{d\tau} = my(1 - x) - (n + 1)x. \quad (\text{III.1.4})$$

▽ Как показано выше (см. § 3 гл. II), наличие малого множителя $[E_0]/[S_0]$ перед производной $dx/d\tau$ в (III.1.4) означает, что соответствующая переменная x является быстрой по сравнению с переменной y , т. е. $dx/d\tau = 0$ или $my(1-x) - (n+1)x = 0$. Отсюда

$$x = \frac{y}{y + (n+1)/m}, \quad \text{или} \quad x = \frac{y}{y + (k_{-1} + k_2)/[S_0]k_1}.$$

Величина $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ является характеристической константой в химии ферментов и носит название константы Михаэлиса. □

Так как k_{-1} , k_2 — константы первого порядка, а k_1 — константа второго порядка, K_m имеет размерность концентрации $t^{-1}/(c^{-1}t^{-1}) = [c]$. Если перейти к величинам, имеющим размерность, получим, что квазистационарное значение концентрации $[ES]$ фермент-субстратного комплекса $[ES] = E_0S/(K_m + S)$.

Скорость реакции (скорость образования продукта, равная скорости убыли субстрата) выражается из четвертого уравнения системы (III.1.2):

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_2E_0S}{K_m + S} = \frac{v_0S}{K_m + S}. \quad (\text{III.1.5})$$

▽ Уравнение (III.1.5) называется уравнением Михаэлиса. Из уравнения видно, что при увеличении концентрации субстрата S от 0 до ∞ скорость реакции (тангенс угла наклона начальных участков кинетических кривых $S(t)$) возрастает от нуля до своего максимального значения $v = k_2E_0$. Таким образом, ферментативные процессы — это процессы с насыщением. На рис. III.1 изображена зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (гипербола Михаэлиса). □

Из уравнения (III.1.5) также видно, что при $K_m = S$ скорость реакции равна $v/2$. Таким образом, константа Михаэлиса по физическому смыслу и числовому значению равна концентрации субстрата, при которой стационарная скорость реакции достигает половины своего максимального значения, или, другими словами, когда половина молекул фермента находится в состоянии комплекса с субстратом.

В живых системах константы Михаэлиса соответствующих ферментативных процессов и концентрации реагентов обычно величины одного порядка. Величина K_m сильно варьирует (от 1 до 10^{-8} М). Например, для лактатдегидрогеназы пировиноградной кислоты $K_m = 3,5 \cdot 10^{-5}$ М, для инвертазы сахарозы $K_m = 2,8 \cdot 10^{-2}$ М, для мальтазы мальтозы $K_m = 2,1 \cdot 10^{-1}$ М.

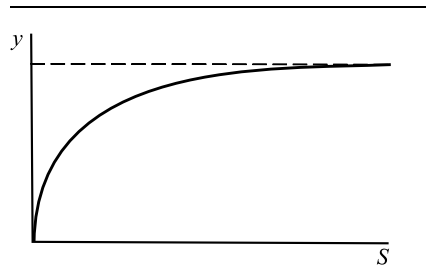


Рис. III.1
Стационарная скорость простейшей ферментативной реакции как функция концентрации субстрата

▽ **Роль ингибиторов.** В присутствии некоторых веществ, называемых ингибиторами (I), ферментативная реакция может замедляться. Так, если ингибитор способен соединиться с ферментом (E) в его активном центре по схеме $E + I \rightleftharpoons [EI]$,

то говорят о реакции в присутствии конкурентного ингибитора, заменяющего субстрат. В этом случае формула (III.1.5) для скорости реакции усложняется:

$$\mu = \frac{\mu_0 S}{K_m + S + k_1 I}.$$

Если фермент в состоянии принять как молекулу ингибитора, так и молекулу субстрата с образованием комплекса, то говорят об аллостерическом (неконкурентном) ингибировании. При этом скорость образования продукта запишется в виде

$$\mu = \frac{\mu'_0 S}{(K'_m + S)(1 + k'_1 I)}. \quad \square$$

Заметим, что при избытке субстрата, когда скорость реакции перестает зависеть от его концентрации, обе формулы приводят к единой качественной зависимости скорости образования продукта от концентрации ингибитора:

$$\mu = \frac{\mu_i}{1 + k_i I}.$$

Дальнейший анализ аллостерических свойств ферментов привел к выводу, что они могут обладать значительно большим, чем один, числом каталитических центров. Это означает, что к молекуле фермента может присоединиться n молекул субстрата ($n > 1$). Изменив стехиометрию реакции фермента с субстратом, получаем цепочку:



Скорость наработки продукта в этой реакции будет равна $\mu = \mu_n S^n / (1 + k_n S^n)$. Существенно, что для аллостерических ферментов со стехиометрическим коэффициентом n , отличным от единицы ($n > 1$), характер зависимости $\mu(S)$ меняется. Кривая приобретает сигмоидный характер с характерной точкой перегиба (рис. III.2, кривая 2).

Аналогичная особенность возникает при учете ингибирующего воздействия избытка субстрата. При этом скорость определяется формулой

$$\mu = \frac{\mu_{ni}}{1 + k_{ni} I^n}.$$

Рис. III.2

Два варианта зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (по Селькову Е. Е., 1967):

1 — $n = 1$, 2 — $n > 1$

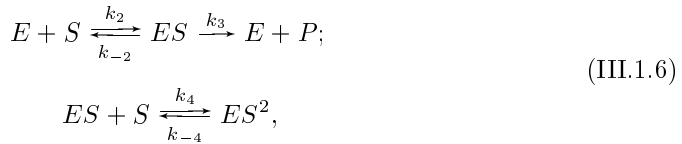
Наряду с ингибиторами имеются вещества, увеличивающие интенсивность работы фермента и называемые активаторами (A). Образую тройной комплекс с субстратом и ферментом, они увеличивают скорость образования продукта:

$$\mu = \frac{\mu_A S}{K_m + S} \frac{A}{k_A + A}.$$

Нетрудно видеть, что качественно влияние активаторов на скорость ферментативной реакции описывается аналогично влиянию концентрации субстрата.

До сих пор предполагалось, что при больших концентрациях субстрата скорость ферментативной реакции не зависит от этой концентрации. Однако существуют ферментативные реакции, имеющие характерную зависимость стационарной скорости от концентрации субстрата в виде кривой с максимумом. Подобного рода зависимость объясняется так называемым субстратным торможением (ингибирование), которое является следствием образования (наряду с активным) неактивного комплекса субстрата с ферментом. Соотношение вероятностей образования активного и неактивного комплексов меняется с изменением концентрации субстрата. При больших концентрациях субстрата преобладает вероятность образования неактивных комплексов ES^2 , которые включают одновременно две молекулы субстрата. Как будет показано дальше, именно субстратное угнетение ферментов — наиболее типичная причина нелинейности биохимических систем. Наличие такого типа нелинейности обуславливает важные, с точки зрения механизмов регулирования, свойства ферментативных систем: множественность стационарных состояний, колебательный характер изменения переменных. \square

Стационарная скорость реакции в системе, где помимо активного комплекса ES образуется неактивный комплекс ES^2 :



выражается в виде

$$v = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S] + [S^2]/K_S}, \quad (\text{III.1.7})$$

где $K_S = k_4/k_{-4}$.

Рассмотрим открытую ферментативную систему с субстратным угнетением и постоянной скоростью притока субстрата в сферу реакции. Если, кроме того, имеет место отток продукта из сферы реакции, схема (III.1.6) дополняется еще двумя реакциями:



Система кинетических уравнений, соответствующая схемам (III.1.6) и (III.1.8), имеет вид

$$\begin{aligned} d[S]/dt &= k_1[S_0] - k_2[S][E] + k_{-2}[SE] - k_4[SE][S] + k_{-4}[S^2E], \\ d[ES]/dt &= k_2[S][E] - k_{-2}[SE] - k_3[SE] - k_4[SE][S] + k_{-4}[S^2E], \\ d[E]/dt &= -k_2[S][E] + k_{-2}[SE] + k_3[SE], \\ d[S^2E]/dt &= k_4[SE][S] - k_{-4}[S^2E], \\ d[P]/dt &= k_3[SE] - k_5[P], \quad [E] + [SE] + [S^2E] = E_0. \end{aligned} \quad (\text{III.1.9})$$

Система (III.1.9) может быть упрощена с учетом того, что концентрация фермента E_0 существенно меньше концентрации субстрата, подобно тому, как это делали выше для простой ферментативной реакции.

Замена дифференциальных уравнений для скорости изменения концентраций фермент-субстратных комплексов на алгебраические и подстановка соответствующих переменных в уравнение для изменения концентрации субстрата приводят к следующему уравнению ферментативной реакции с субстратным угнетением:

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = \alpha - \frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} = f(\alpha, \sigma). \quad (\text{III.1.10})$$

Здесь $\sigma = [S]/K_m$ — безразмерная концентрация субстрата; $\tau = k_3[E_0]t/K_m$ — безразмерное время; $\alpha = k_1[S_0]/k_3[E_0]$, $c = k_{-2}/k_3$, $a = k_2[S_0]/k_3$, $\beta = (k_3/k_2)(k_4/k_{-4})$.

От выражения (III.1.7) уравнение (III.1.10) отличается свободным членом α , характеризующим скорость поступления субстрата в сферу реакции. Стационарные точки уравнения (III.1.10) находят из условия $d\sigma/d\tau = 0$ или

$$\frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} = \alpha. \quad (\text{III.1.11})$$

Для определения числа и характера особых точек этого уравнения удобно использовать графическое представление зависимости скорости притока α и расхода субстрата в реакции v от величины σ . Решениям уравнения (III.1.11) будут соответствовать точки пересечения графика функции

$$v(\sigma) = \frac{(c+1)a\sigma}{1+a\sigma+\beta(a\sigma)^2} \quad (\text{III.1.12})$$

с прямой постоянного источника α .

Как уже было показано, функция $v(\sigma)$ графически выражается кривой с максимумом (рис. III.3).

Скорость притока субстрата в сферу реакции можно рассматривать как параметр, наиболее удобный для управления ферментативной системой, в уравнении (III.1.10) ему соответствует величина α . Зависимость стационарного значения σ от значения скорости притока субстрата в систему α представляет собой бифуркационную диаграмму (рис. III.4). \square

§ 2. Множественность стационарных состояний в ферментативных системах

В тех случаях, когда функция притока субстрата в сферу реакции не является постоянной, а носит более сложный характер, возможны и более сложные типы поведения ферментативной системы. Например, в открытой ферментативной системе с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата



возможно наличие двух устойчивых стационарных состояний, т. е. такая система является триггерной (см. § 1 гл. II). \square

В отличие от рассмотренной системы (III.1.10) безразмерная скорость изменения концентрации субстрата в (III.2.1) имеет вид

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = \alpha - \beta\sigma - \frac{\sigma}{1+\sigma+\gamma\sigma^2} = f(\alpha, \sigma). \quad (\text{III.2.2})$$

Здесь $\sigma = [S]/K_m$, $K_m = (k_{-2} + k_3)/k_2$, $\alpha = k_1[S_0]/(k_3E_0)$, $\beta = k_{-1}K_m/(k_3E_0)$, $\gamma = K_mk_4/k_{-4}$.

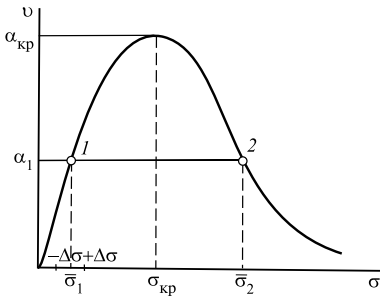


Рис. III.3

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (по Селькову Е. Е., 1972)

Различным значениям скорости притока субстрата T соответствует семейство прямых, параллельных оси абсцисс. График функции $T(\sigma)$ может иметь две или одну точку пересечения с прямой α или не иметь ни одной. Это соответствует наличию двух или одного стационарных состояний в системе или отсутствию таковых. При наличии двух стационарных состояний в системе особая точка $\bar{\sigma}_1$ является

устойчивой, а $\bar{\sigma}_2$ — неустойчивой. В этом нетрудно убедиться путем следующих рассуждений. Пусть в результате некоторого отклонения $\Delta\sigma < 0$ от стационарной точки $\bar{\sigma}_1$ величина σ стала меньше стационарного значения. В области $\sigma < \bar{\sigma}_1$ скорость притока субстрата больше скорости его оттока ($\alpha > v$) и, следовательно, переменная σ будет расти, приближаясь к $\bar{\sigma}_1$. Если же отклонение от стационарной точки $\Delta\sigma > 0$, скорость расхода субстрата больше его притока и σ будет уменьшаться, вновь приближаясь к стационарному значению $\bar{\sigma}_1$. Таким образом, при любом отклонении от стационарного состояния $\bar{\sigma}_1$ система будет в него возвращаться и, следовательно, состояние $\bar{\sigma}_1$ устойчиво. Аналогичные рассуждения в отношении стационарной точки $\bar{\sigma}_2$ приводят к выводу, что она имеет неустойчивый характер. Этот вывод легко сделать, определив знак производной по σ правой части функции $f(\alpha, \sigma)$ выражения (III.1.10), который отрицателен для $\sigma < \sigma_{кр}$ и положителен для $\sigma > \sigma_{кр}$ (см. исследование на устойчивость стационарного состояния для одного уравнения — § 2, гл. I)

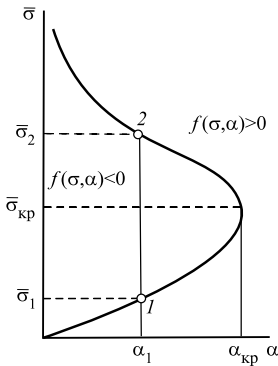


Рис. III.4

Бифуркационная диаграмма системы с субстратным угнетением (по Селькову Е. Е., 1972)

Параметрическая кривая ферментативной системы $\bar{\sigma}(\alpha)$ состоит из двух ветвей (как на рис. I.2 для системы (I.2.4)). Точки, лежащие на нижней ветви кривой, — устойчивые, на верхней ветви — неустойчивые. Значение параметра $\alpha_{кр}$ является бифуркационным, ему соответствует единственное стационарное состояние на стыке верхней и нижней ветвей. При значениях $\alpha > \alpha_{кр}$ ее стационарное состояние недостижимо, при этом в системе будет происходить неограниченное накопление субстрата

Воспользуемся, как и прежде, графическим представлением и найдем стационарные решения уравнения (III.2.2) из равенства

$$\alpha - \beta\sigma - \frac{\sigma}{1 + \sigma + \gamma\sigma^2} = 0 \tag{III.2.3}$$

как точки пересечения графика функции $v(\sigma)$ расхода субстрата в реакции и прямой источника $\bar{v}_i = \alpha - \beta\sigma$ (рис. III.5). Эти же точки можно найти, построив зависимость $\bar{\sigma}$ стационарных решений уравнения (III.3) от значения параметра α , характеризующего скорость притока субстрата в систему (рис. III.6).

При всех значениях управляющего параметра в интервале $\alpha_1 \leq \alpha \leq \alpha_2$, где α_1 , α_2 — соответствуют бифуркационным значениям параметра, рассматриваемая си-

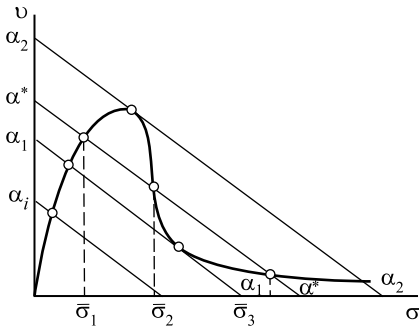


Рис. III.5

Графическое определение числа стационарных состояний в системе с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата (по Селькову Е. Е., 1972)

Различным значениям α соответствует семейство параллельных прямых α_i . При некоторых значениях скорости притока субстрата α^* уравнение (III.2.3) имеет три корня, что соответствует трем различным состояниям рассматриваемой системы

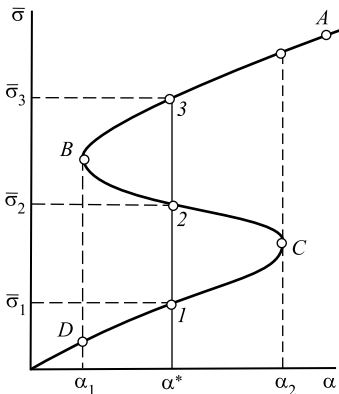


Рис. III.6

Кривая стационарных состояний системы с субстратным угнетением и обратимой реакцией притока субстрата (по Селькову Е. Е., 1972)

Система характеризуется S-образной кривой стационарных состояний. При изменении управляющего параметра в интервале $\alpha_1 \leq \alpha \leq \alpha_2$ каждому значению отвечают три различных стационарных состояния системы. В соответствии со знаком производной $f'_\sigma(\alpha, \sigma)$ функции, стоящей в правой части уравнения (III.2.2), все точки, лежащие на нижней ветви DC и верхней BA ветвях, относятся к устойчивым ($f'_\sigma < 0$), а лежащие на промежуточном участке кривой BC — к неустойчивым стационарным состояниям ($f'_\sigma > 0$)

стема может функционировать в одном из двух устойчивых стационарных состояний, т. е. обладает триггерными свойствами. Это означает, что при изменении управляющего параметра система может переключаться из одного устойчивого режима в другой. Поясним с помощью графика, как это происходит (рис. III.6).

Предположим, что исходному состоянию системы соответствует стационарная точка A, лежащая на верхней ветви кривой $\bar{\sigma}(\alpha)$. Будем понижать скорость притока субстрата α , при этом система начнет «перемещаться» влево вдоль верхней устойчивой ветви стационарных состояний. При достижении бифуркационного значения параметра α_1 система покинет неустойчивую точку B и, совершив скачкообразный переход $B \rightarrow D$, попадет на нижнюю ветвь устойчивых стационарных состояний. Увеличивая снова значения управляющего параметра от α_1 до α_2 , можно перевести систему вдоль устойчивой ветви DC до бифуркационной точки C, после достижения которой система самопроизвольно вернется в исходное состояние A. При обратимом изменении управляющего параметра α (уменьшении, а затем увеличении до прежних значений) осуществится замкнутый цикл состояний рассматриваемой системы.

∇ Какое из двух возможных устойчивых состояний реализуется в системе и какое направление имеют скачкообразные переходы, зависит от того, происходит увеличение или уменьшение параметра. Указанное свойство системы — совершать переход из одного состояния в другое различными путями в зависимости от направления изменения значений параметра — называется гистерезисом (рис. III.7). □

Множественность стационарных состояний и связанные с ней гистерезисные и триггерные явления играют важную роль как средства регулирования биологических систем. Действительно, при наличии гистерезисных свойств поведение системы в ответ на изменение параметров, отражающее изменение внешних условий, будет зависеть от ее предыстории. Таким образом, свойственный ферментативным системам гистерезис может являться основой динамической памяти, присущей всем биологическим объектам.

∇ Триггерные свойства ферментативных систем играют решающую роль в регулировании внутриклеточных процессов метаболизма, а также в процессах клеточной дифференциации, когда при делении появляются дочерние клетки, качественно отличные от клеток предшественников. В настоящее время хорошо известны также триггерные свойства ферментативных систем, осуществляющих транспортную функцию. В частности, такие явления были обнаружены при изучении переноса растворов через пористые мембраны. Система мембранного переноса, сопряженная с химической реакцией, в которой участвует транспортируемое соединение, обладает триггерными свойствами. □

Предположим, что химический процесс катализируется ферментом, свойства которого, в свою очередь, зависят от концентрации субстрата (транспортируемое вещество) или продукта реакции. Такая зависимость может быть основана на изменении конформационного состояния фермента при некоторых критических концентрациях названных соединений. В этих условиях вместе с конформационным состоянием фермента будут меняться его активность и, следовательно, скорость химического процесса.

Для скорости ферментативной реакции типична S -образная зависимость от концентрации субстрата (рис. III.8).

Величина концентрации S , характер ее изменения во времени и активность фермента определяются соотношением скоростей притока субстрата извне через мембрану и его расходования в химической реакции. Пусть скорость химической реакции I_r потребления субстрата S описывается уравнением

$$I_r = -\frac{d[S]}{dt} = -k_r(S)[S],$$

где $E(S)$ — активность фермента как функция концентрации $[S]$; k_r — константа скорости рассматриваемой реакции.

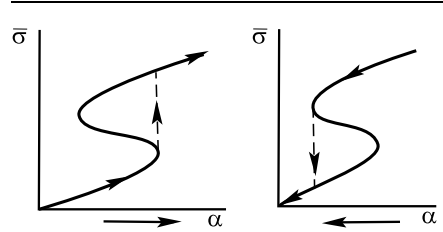


Рис. III.7

Явление гистерезиса в системе с субстратным угнетением и обратной реакцией притока субстрата

В соответствии со сделанным выше предположением о свойствах фермента зависимость $I_r(S)$ графически выражается кривой, показанной на рис. III.9, А. Допустим, что скорость диффузии субстрата извне через мембрану в сферу реакции описывается уравнением первого порядка

$$I_d = d[S]/dt = k_d([S_e] - [S]), \quad (\text{III.2.4})$$

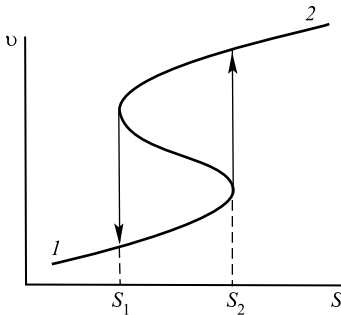


Рис. III.8

S -образная зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

С увеличением концентрации субстрата скорость реакции возрастает (участок 1), однако активность фермента при этом остается постоянной. При достижении критической концентрации $[S_2]$ конформационное состояние фермента скачкообразно (в результате конформационного перехода) изменяется и его активность повышается. Теперь при повышенной активности фермента зависимость скорости реакции от концентрации субстрата определяется участком 2 кривой

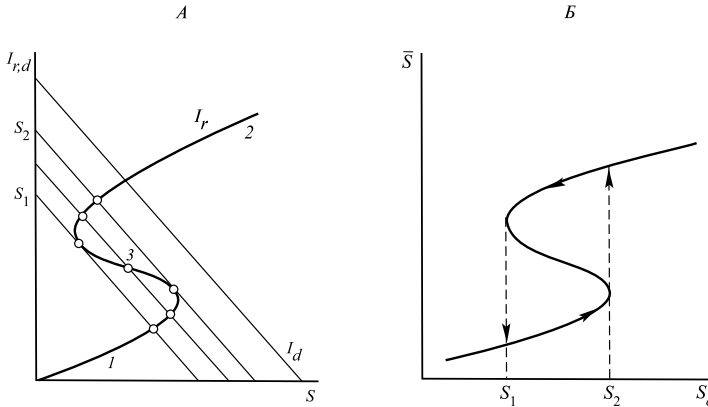


Рис. III.9

Графическое определение стационарных состояний в системе мембранного переноса, сопряженной с ферментативной реакцией:

А — зависимость скорости химической реакции (I_r) и скорости диффузии субстрата (I_d) от концентрации субстрата S ; Б — кривая стационарных концентраций субстрата в сфере реакции в зависимости от значений управляющего параметра $[S_e]$

А — все точки, лежащие на нижней (1) и верхней (2) ветвях кривой $I_r(S)$ относятся к устойчивым, а лежащие на промежуточной ветви (3) — к неустойчивым стационарным состояниям. Значения S_1 и S_2 для величины S соответствуют точкам предельной устойчивости двух конформационных состояний фермента.

Б — по обратимому изменению параметра в сторону меньших, а затем больших значений (и обратно) система описывает замкнутый гистерезисный цикл стационарных состояний, совершая скачкообразные триггерные переходы при достижении критических концентраций субстрата S_1 и S_2 , соответствующих точкам предельной устойчивости конформационных состояний фермента

где $[S_e] = \text{const}$ концентрация субстрата во внешней среде; k_d — константа скорости диффузии. При одних и тех же значениях k_d , но разных концентрациях $[S_e]$ зависимости $I_d(S)$ будет соответствовать семейство параллельных прямых I_d .

Общее изменение $[S]$ в результате двух процессов описывается уравнением

$$d[S]/dt = f(S) = I_d(S) + I_r(S) = k_d([S_e] - [S]) - k_r E(S)[S]. \quad (\text{III.2.5})$$

В стационарном режиме скорости химической реакции и транспорта субстрата через мембрану равны между собой. Найдем стационарные решения уравнения (III.2.5) как точки пересечения кривых $I_r(S)$ и $I_d(S)$, в которых выполняется равенство

$$I_r(S) = I_d(S) \quad (\text{III.2.6})$$

или

$$k_d([S_e] - [S]) = k_r E(S)[S]. \quad (\text{III.2.7})$$

При определенных значениях параметров уравнение (III.2.7) имеет три корня, что соответствует трем различным стационарным состояниям рассматриваемой системы. В зависимости от расположения стационарной точки на кривой $I_r(S)$ она может носить устойчивый или неустойчивый характер.

Считая концентрацию субстрата во внешней среде $[S_e]$ управляющим параметром, рассмотрим поведение системы в ответ на изменение этой величины (рис. III.9, *B*). Как было показано в § 4 гл. II, в том случае, когда особая точка системы расположена на неустойчивой ветви (3), такая система может совершать релаксационные колебания.

§ 3. Колебания в ферментативных системах

Нелинейность кинетики важнейших биохимических процессов обуславливает возможность существования в биологических системах наряду с триггерными режимами незатухающих периодических режимов (автоколебания), для исследования свойств которых применимы качественные методы анализа динамических систем.

Обнаружение «биологических часов» с эндогенным ритмом в одноклеточных организмах послужило убедительным доказательством того, что источником биологических ритмов является автоколебательная система биохимических реакций, локализованная внутри клетки.

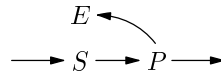
Развитие термодинамики необратимых процессов показало, что колебания в химических реакциях возможны лишь вдали от термодинамического равновесия (см. гл. VI). Известно также, что для того, чтобы в химической реакции существовало неравновесное стационарное состояние, необходимо, чтобы изменение концентраций двух различных групп реагентов происходило в двух сильно различающихся масштабах времени. В ферментативных системах это условие практически всегда выполняется, так как обычно концентрация субстрата намного превышает концентрацию фермента, что, в свою очередь, обуславливает возможность существования двух сильно различающихся масштабов времени для субстрата (τ_S) и

фермент-содержащих комплексов ($\tau_S \gg \tau_E$) (см. §1 гл. III). Временная иерархия реагентов и условия приближенной стационарности для некоторых из них (например, для фермент-субстратного комплекса) могут реализоваться не только в открытых, но и в замкнутых ферментативных системах. Однако в замкнутых системах эти условия выполняются лишь в течение некоторого ограниченного интервала времени, пока концентрация субстрата достаточно велика. Поэтому колебания, имеющие место в замкнутых ферментативных системах, всегда являются затухающими, что определяется эволюцией замкнутой системы к равновесному состоянию. \square

Незатухающие колебательные изменения концентраций реагентов возможны лишь в открытых ферментативных системах, где существование двух сильно различающихся масштабов времени может поддерживаться неограниченно долго за счет притока субстрата от внешнего источника и оттока продукта во внешнюю среду. В системе сопряженных полиферментативных реакций, в которых продукт одной реакции служит субстратом для следующей, масштаб времени, связанный с первым субстратом и последним продуктом, может значительно превосходить масштаб времени, характерный для промежуточных реагентов. Поэтому в таких системах особенно вероятно возникновение незатухающих колебаний концентраций компонентов.

Таким образом, необходимыми условиями возникновения в системах концентрационных колебаний являются нелинейный механизм реакций, «открытость» ферментативных систем и существенное различие характерных времен отдельных стадий процесса. \square

Распространенной причиной нелинейности биохимических систем является наличие обратной связи в цепи ферментативных реакций, продукт которых контролирует активность фермента по общей схеме



Характер такого влияния может быть различным: наиболее распространено продуктное угнетение, однако могут быть случаи, когда продукт активирует фермент при всех значениях собственных концентраций или угнетает при одних и активирует при других концентрациях. Другой широко распространенный механизм регулирования биохимических систем — субстратное угнетение ферментов.

В §2 настоящей главы было показано, что в открытых системах с субстратным угнетением реализуется множественность стационарных состояний и наблюдается явление гистерезиса. Торможение ферментов субстратами оказывает также сильное дестабилизирующее действие на системы, контролируемые механизмами обратной связи, способствуя возникновению в них неустойчивости и автоколебаний. Примером такой системы является реакция с субстратным и продуктным угнетением:



Полное описание динамики системы реакций в соответствии с законом действующих масс включает восемь нелинейных дифференциальных уравнений. Однако

тот факт, что обычно концентрации фермента E на несколько порядков ниже концентраций субстрата S и продукта P , позволяет редуцировать систему уравнений и существенно упростить это описание. Для относительных концентраций медленных переменных — субстрата и продукта — получим следующую систему уравнений:

$$d\sigma/d\tau = \nu_1 - \nu(\sigma, \rho), \quad d\rho/d\tau = \nu(\sigma, \rho) - \nu_2, \quad (\text{III.3.2})$$

где σ , ρ — безразмерные концентрации субстрата и продукта соответственно; τ — безразмерное время; $\nu(\sigma, \rho)$ — относительная квазистационарная скорость ферментативной реакции.

В том случае, когда реакция притока субстрата обратима, а сток продукта — линейный, квазистационарная скорость ферментативной реакции $\nu(\sigma, \rho)$ определяется для неконкурентного угнетения продуктом уравнением

$$\nu(\sigma, \rho) = \frac{\sigma}{(1 + \sigma + \alpha\sigma^2)(1 + \rho)},$$

а для конкурентного угнетения — уравнением

$$\nu(\sigma, \rho) = \frac{\sigma}{(1 + \sigma + \alpha\sigma^2)(1 + \sigma + \alpha\sigma^2 + \rho)}.$$

При определении числа и характера устойчивости особых точек системы можно использовать графическое представление зависимостей $\nu_1(\sigma)$, $\nu_2(\sigma)$, $\nu(\sigma, \rho)$ (рис. III.10). В основе этого метода лежит необходимое условие стационарности процесса — равенство скоростей отдельных его стадий.

Найдем стационарное состояние системы (III.3.2) с помощью уравнения баланса для продукта: $d\rho/dt = 0$, $\nu(\rho) = \nu_2(\rho)$. Решениям этого уравнения $\nu = \nu_2$ соответствуют точки пересечения графиков $\nu(\rho)$ и $\nu_2(\rho)$, представленных на рис. III.10, Б. Видно, что кривая $\nu(\rho)$ может иметь от одной до трех точек пересечения с прямой стока продукта $\nu_2(\rho)$. Это означает, что в рассматриваемой системе возможно существование от одного до трех стационарных состояний.

К аналогичному выводу приводит рассмотрение фазовой плоскости системы σ, ρ (рис. III.11). Здесь представлено расположение на фазовой плоскости главных изоклин. Семейство кривых 1–4 соответствует изоклине горизонтальных касательных $d\rho/d\tau = 0$ при различных значениях параметра μ , характеризующего глубину продуктного угнетения. Сплошная синяя линия соответствует главной изоклине вертикальных касательных $d\sigma/d\tau = 0$. Число стационарных состояний системы и их устойчивость зависят от значения параметра μ . В случае слабого угнетения продуктом $\mu \leq 1$ в системе может реализоваться единственное стационарное состояние, расположенное на неустойчивой части характеристики $\nu(\rho)$. При этом относительная концентрация субстрата оказывается быстрой переменной по сравнению с концентрацией продукта и в системе возникают автоколебания, подобно тому, как это было описано (см. § 2 гл. II). Фазовый портрет системы при малой глубине продуктного угнетения изображен на рис. III.12 (ср. с рис. II.10). Кинетика изменения переменных во времени в такой системе, полученная с помощью ЭВМ, представлена на рис. III.13.

Как показано выше (см. рис. III.10), в зависимости от расположения главных изоклин $d\rho/d\tau = 0$, $d\sigma/d\tau = 0$ система (III.2) может иметь одно, два или три стационарных состояния. В том случае, если реализуются три стационарных состояния,

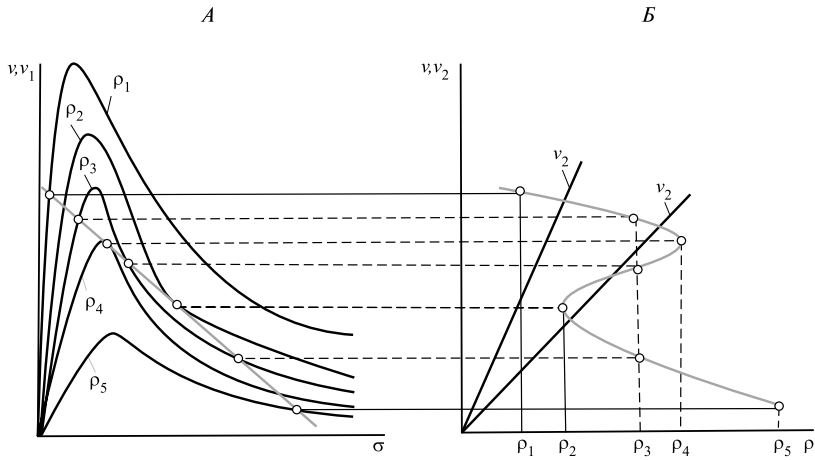


Рис. III.10

К определению числа стационарных состояний в системе с субстратным и продуктным угнетением (по Селькову Е. Е., 1972):

A — скорость «источника» v_1 и ферментативной реакции v в зависимости от концентрации субстрата σ ; *B* — скорость реакции v и стока продукта v_2 в зависимости от концентрации последнего

Функция $v_1(\rho)$ соответствует прямой, функция $v(\sigma)$ выражается кривой с максимумом. С увеличением концентрации продукта в сфере реакции максимум кривых $v(\sigma)$ понижается и смещается вправо — в область более высоких концентраций субстрата, что обусловлено наличием продуктного угнетения. В зависимости от величины ρ (концентрация продукта) графики функций $v_1(\sigma)$ и $v(\sigma)$ могут иметь от одной до трех точек пересечения. Наличие одной точки пересечения при $\rho < \rho_2$ и $\rho > \rho_4$ означает, что таким концентрациям продукта соответствуют единственные значения скорости реакции $v(\sigma)$. Каждому значению ρ из интервала $\rho_2 < \rho < \rho_4$ соответствуют три точки пересечения графиков $v_1(\sigma)$ и $v(\sigma)$; следовательно, три различных значения $v(\rho)$. Критическим значениям концентрации продукта $\rho = \rho_2$ и $\rho = \rho_4$ отвечают по два различных значения скорости реакции $v(\rho)$. Таким образом, зависимость $v(\sigma)$ графически выражается характерной Z-образной кривой

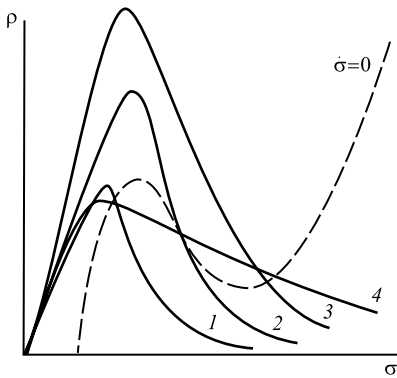


Рис. III.11

Расположение главных изоклин на фазовой плоскости системы (III.3.2) с субстратным и продуктным угнетением при ферментативной природе реакции стока продукта (по А. М. Жаботинскому, 1974):

1, 2, 3, 4 — кривые, соответствующие $\rho = 0$ при различных значениях параметров системы

одно из них будет обязательно типа «седло» и поэтому всегда неустойчиво. Два других могут иметь характер устойчивого узла или фокуса либо неустойчивого узла или фокуса. В том случае, когда два из трех стационарных состояний устойчивы, система является триггером.

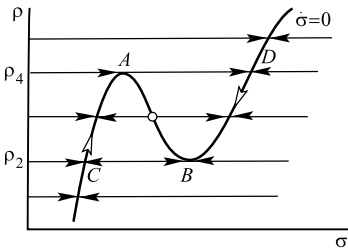


Рис. III.12
Фазовый портрет системы (III.3.2) при $\mu < 1$
(малая глубина продуктного угнетения)

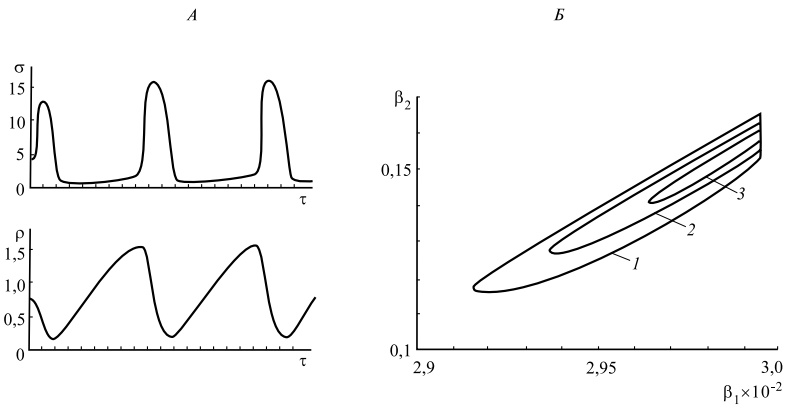


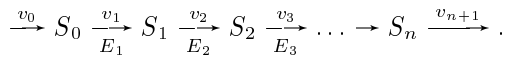
Рис. III.13
Концентрационные автоколебания в системе (III.3.2) с субстратным и продуктным угнетением (по Селькову Е. Е., 1972):

A — изменение концентрации субстрата σ и продукта ρ во времени; *B* — границы областей существования единственного устойчивого предельного цикла в системе (III.3.2), окружающего единственную стационарную точку при различных значениях μ (μ — параметр, характеризующий глубину продуктного угнетения; выражается в безразмерных единицах); β_1 — скорость притока субстрата; β_2 — скорость утилизации продукта; 1 — $\mu = 0$, 2 — $\mu = 0,006$, 3 — $\mu = 0,05$

При определенных значениях параметров, в частности когда скорость притока субстрата равна скорости утилизации продукта, в системе существует единственное устойчивое положение равновесия. В этом случае возникновение автоколебаний невозможно, так как необходимым условием существования предельного цикла на фазовой плоскости является наличие неустойчивых положений равновесия. Анализ корней характеристического уравнения системы и построение бифуркационной диаграммы показывают, что необходимым условием существования предельного цикла является преобладание скорости притока субстрата над скоростью утилизации продукта.

Множественность стационарных состояний, гистерезис и автоколебания — основные свойства кинетики исследованной реакции — являются прямым следствием сильной нелинейности, обусловленной механизмами субстратного и продуктного угнетения. Поскольку комбинированное угнетение ферментов субстратами и продуктами — явление весьма распространенное, рассмотренная модель может быть использована для объяснения периодических колебаний в различных реальных биохимических процессах. □

В ряде работ было исследовано также возникновение колебаний в полиферментативных системах, где конечный продукт влияет на скорость начальной стадии. Этот случай соответствует каскаду последовательных ферментативных реакций с обратной связью:



Согласно этой схеме, субстрат S_0 поступает в систему со скоростью v_0 и последовательно с помощью ферментов E_1, E_2, \dots, E_n превращается в конечный продукт S_n , который со скоростью v_{n+1} расходуется в дальнейших реакциях.

Активность ключевого фермента E_1 находится под влиянием конечного продукта S_n . Вопрос о существовании автоколебаний в такой системе решается путем нахождения соотношения между ее параметрами, при которых в характеристических уравнениях линеаризованной системы появляются комплексно сопряженные корни (гл. I §3). Анализ (Сельков, 1967) показал, что колебания зависят в основном от значений параметров χ_1 — влияния S_n на активность E_1 , зависимости скорости утилизации продукта S_n от его концентрации, а также от числа звеньев n в системе. Оказалось, что при $\chi_1 < 0$ (продуктное угнетение ключевой реакции E_1) и числе звеньев $n = 2$ система устойчива (устойчивый узел или фокус). Однако в этих же условиях ($\chi_1 < 0$) увеличение числа промежуточных стадий $n = 3, 4, \dots$ приводит к появлению колебательной неустойчивости (неустойчивый фокус). □

Исследование условий возникновения незатухающих колебаний в системе биохимических реакций позволило сформулировать ряд требований, которым должна удовлетворять система, чтобы в ней могли возникнуть автоколебания (Хиггинс, 1967).

Пусть имеется последовательность реакций, которую в целом можно представить в виде схемы $\xrightarrow{v_1} A \xrightarrow{v_2}, \xrightarrow{v_3} B \xrightarrow{v_4}$. Результирующие скорости образования реагентов A и B равны соответственно $v_A = v_1 - v_2$, $v_B = v_3 - v_4$.

Изменение концентраций веществ A и B может носить колебательный характер, если одновременно выполняются следующие условия:

1. Один из реагентов (A, B) должен ускорять собственное образование. Это означает, что либо накопление A должно приводить к увеличению v_1 или уменьшению v_2 , либо накопление B должно приводить к увеличению v_3 или уменьшению v_4 .
2. Другой реагент должен подавлять собственное образование. Это означает, что если накопление A вызывает увеличение v_1 или снижение v_2 , то накопление B должно вызывать соответственно уменьшение v_3 или увеличение v_4 и наоборот (пример — продуктное угнетение, приводящее к уменьшению скорости образования продукта).

3. Должны существовать перекрестные взаимодействия реагентов противоположного характера. Накопление B должно вызывать увеличение v_1 или снижение v_2 , а накопление A — снижение v_3 или увеличение v_4 и наоборот (пример — субстратное угнетение, уменьшающее скорость образования продукта). Ни одно из перечисленных требований, взятых в отдельности, не является необходимым для возникновения автоколебаний.

§ 4. Вероятностное описание переноса электрона в мультиферментном комплексе

Вероятностное рассмотрение позволило разработать математический аппарат для описания функционирования мультиферментного комплекса. Рассмотрим некий мультиферментный комплекс, в котором каждый из ферментов может находиться в нескольких различных (дискретных) состояниях. Состояния отдельных компонентов мультиферментного комплекса могут представлять собой свободный фермент, комплекс фермента с субстратом, продуктом, модификатором; это могут быть различные конформации фермента, его протонированные или депротонированные формы и др.

∇ Функциональное объединение ферментов в мультиферментный комплекс приводит к необходимости рассматривать вместо состояний отдельных ферментов всевозможные состояния такого мультиферментного комплекса, которые определяют как упорядоченный набор состояний отдельных ферментов, составляющих комплекс. Такая необходимость возникает, например, в том случае, когда значения констант скорости перехода между состояниями любого отдельного фермента зависят от того, в каком состоянии находятся другие ферменты данного комплекса. Учет состояний мультиферментного комплекса в целом необходим также и в том случае, если продукт одного из ферментов непосредственно передается другому, являясь для него субстратом. □

Элементарные переходы между отдельными состояниями мультиферментного комплекса носят стохастическую (вероятностную) природу. При этом в первом приближении можно считать, что процесс переходов между состояниями носит марковский характер, т. е. вероятности переходов между отдельными состояниями i и j мультиферментного комплекса в каждый момент времени можно характеризовать некоторыми числами k_{ij} , не зависящими от предыстории системы.

Обозначим состояния мультиферментного комплекса через S_1, S_2, \dots, S_n и введем вероятность того, что комплекс находится в состоянии S_i в момент времени t :

$$p(S_i, t) = p_i(t) \quad (i = 1, 2, \dots, n).$$

Определенные нами состояния мультиферментного комплекса, с одной стороны, несовместны, т. е. невозможна такая ситуация, когда мультиферментный комплекс находится сразу в двух состояниях, а с другой — комплекс обязательно находится в одном из введенных состояний. Поэтому для любого момента времени

$$\sum_{i=1}^n p_i(t) = 1. \quad (\text{III.4.1})$$

Предположим, что если комплекс находится в i -м состоянии в момент времени t , то вероятность перейти ему в j -е состояние за время Δt может быть выражена как $a_{ij}\Delta t$, $i \neq j$. Здесь a_{ij} — константа скорости перехода. Пусть, кроме того, вероятность того, что через время Δt комплекс останется в исходном состоянии, есть $1 - a_i\Delta t$.

Поскольку вероятности представляют собой неотрицательные величины, необходимо потребовать, чтобы

$$a_{ij} \geq 0, \quad i \neq j. \quad (\text{III.4.2})$$

Если в момент времени t система находилась в i -м состоянии, то в момент времени $(t + \Delta t)$ она либо останется в исходном состоянии (с вероятностью $1 - a_i\Delta t$), либо перейдет в одно из $n - 1$ остальных возможных состояний (с вероятностью $a_{ij}\Delta t$):

$$1 - a_i\Delta t + \sum_{j \neq i} a_{ij}\Delta t = 1. \quad (\text{III.4.3})$$

Отсюда следует, что величина a_i , удовлетворяет равенству

$$a_i = \sum_{j \neq i} a_{ij}$$

С учетом сделанных предположений уравнения, описывающие кинетическое поведение мультиферментного комплекса, можно записать в следующем виде:

$$p_i(t + \Delta t) = \Delta t \sum_{j \neq i} a_{ij}p_j(t) + (1 - a_i\Delta t)p_i(t).$$

Действительно, вероятность нахождения комплекса в момент времени $(t + \Delta t)$ в состоянии i складывается из вероятности того, что в предшествующий момент времени t он находился в одном из $n - 1$ других состояний и за время Δt перешел в i -е состояние, а также вероятности того, что исходно в момент времени t комплекс уже находился в этом состоянии и за время Δt остался в нем же.

Устремляя Δt к нулю, приходим к следующей системе линейных дифференциальных уравнений:

$$dp_i/dt = -a_i p_i + \sum_{j \neq i} a_{ij} p_j, \quad p_i(0) = c_i \geq 0, \quad \sum_{i=1} c_i = 1. \quad (\text{III.4.4})$$

Полученная система дифференциальных уравнений и есть класс дифференциальных уравнений, описывающих переходы между состояниями мультиферментного комплекса. Относительно коэффициентов этих уравнений всегда можно считать выполненными соотношения (III.4.2), (III.4.3). \square

Вероятностное описание мультиферментного комплекса оказалось особенно продуктивным при математическом моделировании переноса электрона в комплексах молекул-переносчиков, локализованных в энергосопреженных мембранах

митохондрий и фотосинтезирующих органелл — хлоропластов растений и хроматофоров фотосинтезирующих бактерий. На примере описания переноса электрона в фотосинтетических комплексах молекул — компонентов электрон-транспортной цепи — будут рассмотрены основные особенности вероятностного описания мультиферментного комплекса.

▽ Процессы трансформации энергии при дыхании и фотосинтезе включают в себя в качестве необходимого элемента перенос электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), образованной встроенными в мембрану окислительно-восстановительными ферментами. ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров фотосинтезирующих бактерий имеют большое сходство как на уровне отдельных переносчиков электронов, так и на уровне отдельных комплексов молекул-переносчиков. Одна полная цепь переноса электрона состоит из нескольких отдельных комплексов. Эти комплексы — естественные субъединицы цепи, в полной мере способные осуществлять перенос электрона. Кроме того, в ЭТЦ имеются участки, на которых перенос электрона происходит с помощью отдельных переносчиков. Соответственно при математическом описании процессов следует учитывать различия в организации отдельных участков электронного транспорта. □

В том случае, когда переносчики электронов достаточно подвижны для того, чтобы взаимодействовать друг с другом посредством соударений, окислительно-восстановительные состояния отдельных переносчиков можно считать независимыми и кинетика переноса электрона может быть описана исходя из закона действующих масс (см. § 1 настоящей главы).

В соответствии с законом действующих масс для реакции переноса электрона между двумя одноэлектронными переносчиками C_1 и C_2 , взаимодействующими по схеме



кинетические уравнения, описывающие рассматриваемые окислительно-восстановительные реакции, могут быть записаны в виде

$$\begin{aligned} d[C_1^1]/dt &= k'[D^1][C_1^0] - k'[C_1^1][C_2^0], \\ d[C_2^1]/dt &= k'[C_1^1][C_2^0] - k'_3[C_2^1][A^0]. \end{aligned} \quad (\text{III.4.5})$$

Здесь $[D^1]$, $[C_1^1]$, $[C_2^1]$ — концентрации восстановленной формы экзогенного донора D и переносчиков электронов C_1 и C_2 ; $[C_1^0]$, $[C_2^0]$ — концентрации окисленной формы переносчиков C_1 , C_2 и экзогенного акцептора A ; k_1 , k_2 , k_3 — бимолекулярные константы скоростей соответствующих реакций. Пусть теперь переносчики электронов находятся в структурных комплексах, внутри которых задана строгая последовательность взаимодействия переносчиков электрона друг с другом. В отличие от случая окислительно-восстановительных реакций в растворе, когда каждая восстановленная молекула переносчика C_1 могла отдать электрон любой окисленной молекуле C_2 , в комплексе восстановленный переносчик C_1 может взаимодействовать только с тем окисленным переносчиком C_2 , который находится с C_1 в одном комплексе. Таким образом, события, характеризующие окисленность и восстановленность переносчиков C_1 и C_2 , не являются независимыми.

⌋ Перенос электронов в комплексе — мономолекулярный процесс, поскольку в едином акте происходит как окисление C_1 , так и восстановление C_2 . В силу этого перенос электрона невозможен, когда оба входящие в комплекс переносчика одновременно окислены или восстановлены. Таким образом, следует рассматривать состояния сразу комплекса двух переносчиков, участвующих в процессе. Скорость переноса электрона между C_1 и C_2 в рассматриваемом случае пропорциональна концентрации комплексов, находящихся в состоянии $[C_1^1 C_2^0]$, когда переносчик C_1 восстановлен, а переносчик C_2 окислен:

$$v = k_2 [C_1^1 C_2^0]. \quad \square$$

Для той же скорости окислительно-восстановительной реакции в растворе существовало выражение

$$v = k_2 [C_1^1] [C_2^0],$$

где $[C_1^1]$, $[C_2^0]$ — общие концентрации молекул C_1 и C_2 в восстановленной и окисленной форме соответственно.

⌋ В общем случае для описания переноса электрона в комплексе необходимо рассматривать все состояния, в которых может находиться этот комплекс. Состояния комплекса могут быть определены как упорядоченная совокупность состояний переносчиков, составляющих комплекс. При этом каждый из переносчиков, входящих в комплекс, может находиться в окисленной и восстановленной форме, в протонированном или депротонированном состоянии и т. д. \square

Обозначим состояния комплекса через S_1, S_2, \dots, S_n и введем вероятность того, что комплекс переносчиков находится в состоянии S_i , в момент времени t : $p(S_i, t) = p_i(t)$. События S_1, S_2, \dots, S_n несовместны и образуют полную группу событий, поэтому выполняется условие нормировки

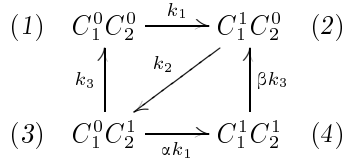
$$p_1(t) + p_2(t) + \dots + p_n(t) = 1.$$

Будем рассматривать переходы между состояниями S_i , комплекса переносчиков как марковский процесс с конечным числом состояний и непрерывным временем. В этом случае переходы комплекса из одного состояния в другое описываются системой линейных обыкновенных дифференциальных уравнений относительно вероятностей:

$$dp_i/dt = \sum_{j=1}^n (p_j k_{ji} - p_i k_{ij}), \quad p_i(0) = b_i \quad (i = 1, \dots, n) \quad (\text{III.4.6})$$

Здесь b_i — начальные значения вероятностей соответствующих состояний.

При рассмотрении конкретных ЭТЦ удобно представлять состояния комплекса в виде размеченного графа, в вершинах которого стоят состояния комплекса, а стрелки указывают возможные переходы между состояниями. В частности, для переноса электронов в комплексе из двух переносчиков размеченный граф состояний будет иметь следующий вид:



Здесь верхние индексы 0 и 1 означают отсутствие или наличие электрона на соответствующем переносчике. Цифры в скобках указывают номер состояния комплекса, k_i — константы скоростей соответствующих переходов, указанных на схеме 1. В общем случае константы скоростей перехода между состояниями комплекса могут зависеть от состояний переносчиков, не принимающих непосредственного участия в реакции (эффект кооперативности). Параметры α и β характеризуют степень кооперативности. Например, скорость притока электронов от внешнего донора на переносчик C_1 может быть различной в зависимости от редокс-состояния переносчика C_2 (α). Рассмотрение конкретных фотосинтезирующих объектов (см. § 5 гл. XXVIII) показало плодотворность такого способа описания кооперативности для объяснения механизмов регуляции электронных потоков (свойство кооперативности не может быть, естественно, учтено при описании переноса электрона с помощью закона действующих масс).

Система дифференциальных уравнений для вероятностей состояний комплекса $C_1 C_2$, описывающая его функционирование согласно схеме 2, при $\alpha = \beta = 1$ имеет вид

$$\begin{aligned}
 dp_1/dt &= k_3 p_2 - k_1 p_1, \\
 dp_2/dt &= k_2 p_3 - (k_1 + k_3) p_2, \\
 dp_3/dt &= k_1 p_1 + k_3 p_4 - k_2 p_3, \\
 dp_4/dt &= k_1 p_2 - k_3 p_4,
 \end{aligned}
 \quad p_i(0) = b_i. \quad (\text{III.4.7})$$

Решив систему уравнений (III.4.7) относительно вероятностей состояния комплекса p_i , легко найти и вероятности определенных состояний отдельных переносчиков. Для этого необходимо просуммировать вероятности всех тех состояний комплекса, которые содержат рассматриваемый переносчик в данном состоянии. Например, вероятность того, что первый переносчик находится в окисленном состоянии, равна сумме вероятностей первого и второго состояний (см. схему 2):

$$p(C_1^0) = p(C_1^0 C_2^0) + p(C_1^0 C_2^1) = p_1 + p_2 = 1 - p(C_1^1). \quad (\text{III.4.8})$$

В общем виде

$$p(C_i^0, t) = \sum_{S_q \in C_i^0} p(S, t), \quad p(C_i^1, t) = 1 - p(C_i^0, t), \quad (\text{III.4.9})$$

или $p(B) = \sum_{s_q \in B} p(S_q, t)$, где суммирование производится по всем тем элементарным событиям, которые составляют событие B .

Для большого числа одинаковых не взаимодействующих между собой комплексов переносчиков введенные выше вероятности $p(S_i, t)$ и $p(C_i^0, t)$, согласно закону

больших чисел, приближенно равны соответственно доле комплексов, находящихся в состоянии S_i , и доле молекул переносчиков C_1 , которые находятся в соответствующем редокс-состоянии.

Легко видеть, что уравнения, описывающие переходы между состояниями мультиферментного комплекса, линейны. Система таких уравнений может быть решена аналитически или с помощью ЭВМ. Число этих уравнений быстро увеличивается с ростом количества переносчиков. Например, для комплекса из n переносчиков, каждый из которых может быть окисленным или восстановленным, число состояний равно 2^n . Однако иерархия характерных времен переходов между состояниями позволяет сильно упростить систему и установить аналитически некоторые качественные свойства системы.