

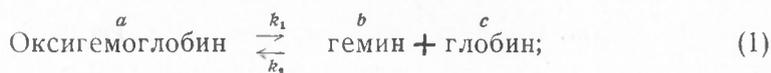
Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

КИНЕТИКА РЕАКЦИИ ТРАНСГЕМИРОВАНИЯ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 28 III 1951)

А. М. Чарный и Л. А. Блюменфельд (^{1,2}) обнаружили, что гем оксигемоглобина может пересаживаться на другие белки, в частности, на альбумин и желатину. Эта реакция была названа реакцией трансгемирования. В связи с тем, что изучение этой реакции может пролить свет как на структуру гемоглобина, так и на изменение его структуры при различных патологиях, представляет интерес исследовать кинетику процесса и попытаться несколько глубже проникнуть в его механизм.

Эксперимент показал (²), что относительная скорость реакции трансгемирования на желатину возрастает при увеличении концентрации желатины и падает при увеличении концентрации оксигемоглобина. Это дает основание предположить диссоциационный механизм реакции:



где a , b , c , d и e — концентрации соответствующих соединений и k_1 , k_2 и k_3 — константы скоростей соответствующих реакций. В этой схеме допущены следующие приближения. При диссоциации гемоглобина должен образовываться гем (восстановленная форма гемина). Предполагается, что окисление гема в гемин происходит практически мгновенно (см., например, (³)). Кроме того, не учитывается обратная реакция диссоциации гемижелатины. Последнее законно потому, что в опытах молярная концентрация желатины по крайней мере в 100 раз превышала концентрацию оксигемоглобина.

Принимая, как это обычно делается, что для промежуточного продукта, гемина, $db/dt = 0$, можно вывести следующее уравнение:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{k_1(a-x)}{\frac{k_2}{k_3d}x + 1}, \quad (3)$$

где x — концентрация распавшегося гемоглобина или, что то же, концентрация образующейся гемижелатины (концентрацией промежуточного продукта, гемина, в условиях опыта можно пренебречь). Обозначим $k_2/k_3d = K$.

Тогда, решая (3), получим:

$$Kx + (Ka + 1) \ln \left(1 - \frac{x}{a} \right) = -k_1 t. \quad (4)$$

Пусть для двух значений времени t_1 и t_2 найдено, соответственно, x_1 и x_2 . Тогда:

$$K = \frac{\frac{t_1}{t_2} \lg \left(1 - \frac{x_2}{a} \right) - \lg \left(1 - \frac{x_1}{a} \right)}{\frac{1}{2,3} \left(x_1 - \frac{t_1}{t_2} x_2 \right) + a \left[\lg \left(1 - \frac{x_1}{a} \right) - \frac{t_1}{t_2} \lg \left(1 - \frac{x_2}{a} \right) \right]}. \quad (5)$$

По уравнению (5) можно определить K и, подставив в (4), найти k_1 — константу скорости диссоциации оксигемоглобина.

Методика эксперимента. Оксигемоглобин получался из многократно промытых, гемолизированных и освобожденных от стромы

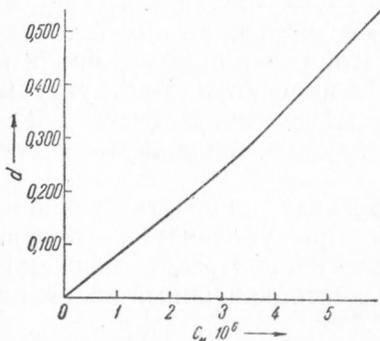


Рис. 1

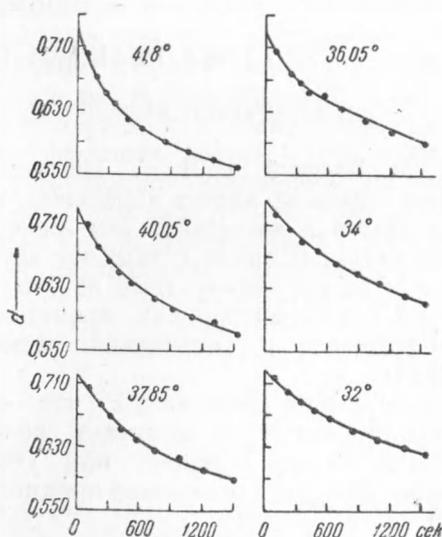


Рис. 2

эритроцитов собаки. Концентрация раствора определялась спектрофотометрически по оптической плотности при λ 576 м μ (E_m при 576 м μ равен $15,34 \cdot 10^3$ (4)). Начальные концентрации O_2Hb варьировались от 10^{-5} до 10^{-6} моля*. Концентрация желатина всегда равнялась 1,7%. Желатина была марки Tg-195. Реакция проводилась в термостатируемых сосудах при температурах от 32 до 42°. pH раствора равнялся 5,59 (фосфатный буфер). Скорость реакции измерялась спектрофотометрически по поглощению при λ 414 м μ .

Специально поставленные опыты показали, что коэффициент поглощения гемижелатина при λ 414 м μ слегка зависит от относительной концентрации гемижелатина в растворе. Возможно, это связано с различной степенью агрегации молекул гемижелатина. На рис. 1 показана зависимость между концентрацией гемижелатина в 1,7% желатине и оптической плотностью при λ 414 (pH 5,59, толщина слоя 1 см). Эта кривая была использована для расчета x по экспериментальным точкам.

Результаты эксперимента приведены на рис. 2 (для исходной концентрации оксигемоглобина $a = 5,8 \cdot 10^{-6}$ M) и рис. 3 ($a = 2,9 \cdot 10^{-6}$ M). По оси ординат отложены оптические плотности при λ 414 м μ , по оси абсцисс — время в секундах.

* Из расчета на гем.

По расчету по формуле (5) оказалось, что величина K не меняется с температурой и равняется приблизительно $5 \cdot 10^5$ мол.⁻¹ *. Точность определения K невелика, так как весьма незначительные ошибки в определении исходной концентрации и промежуточных концентра-

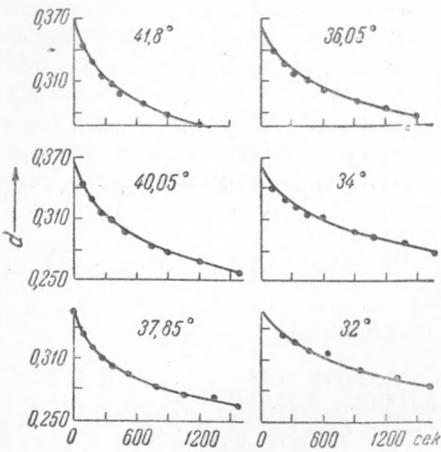


Рис. 3

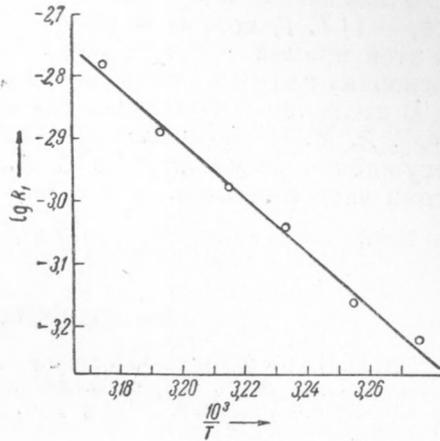


Рис. 4

ций резко сказываются на значениях K , рассчитанных по формуле (5) (в знаменателе формулы (5) стоит разность двух близких величин). Однако было показано, что даже изменение K в 2 раза практически не влияет на вычисляемую энергию активации диссоциации оксигемоглобина на гемин и глобин.

В табл. 1 приводятся значения k_1 , вычисленные по опытам с $a = 5,8 \cdot 10^{-6}$ M (результаты опытов с другими концентрациями практически не отличаются).

Таблица 1

Значения $k_1 \cdot 10^3$

Т-ра в °	t, сек.							
	100	200	300	400	500	600	700	
41,8	1,54	1,60	1,69	1,69	1,67	1,71	1,68	
40,05	1,23	1,25	1,24	1,27	1,26	1,28	1,30	
37,85	1,03	1,07	1,06	1,08	1,09	1,08	1,08	
36,05	0,88	0,93	0,97	0,93	0,92	0,91	0,91	
34	0,81	0,78	0,78	0,76	0,72	0,73	0,73	
32,02	0,68	0,64	0,60	0,60	0,59	0,59	0,60	
	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500
41,8	1,67	1,67	1,67	1,67	1,68	1,70	1,69	1,71
40,05	1,32	1,33	1,35	1,35	1,33	1,33	1,33	1,34
37,85	1,08	1,07	1,06	1,06	1,04	1,04	1,03	1,03
36,05	0,92	0,91	0,91	0,90	0,90	0,90	0,89	0,89
34	0,73	0,72	0,72	0,73	0,72	0,72	0,73	0,73
32,02	0,60	0,59	0,60	0,59	0,59	0,58	0,57	0,58

* Это означает, что энергия активации реакций гемина с глобином и гемина с желатиной приблизительно равны.

Вполне удовлетворительно постоянство k_1 при одной температуре указывает на то, что предполагаемая схема реакции в основных чертах близка к истинной. Истинный механизм, по всей вероятности, более сложен. Не исключено, что сам отрыв гема от глобина происходит не без участия молекул желатины.

Откладывая полученные средние значения k_1 в координатах $\lg k_1 - 1/T$, получаем прямую, изображенную на рис. 4. Вычисленная по этой прямой эффективная энергия активации диссоциации оксигемоглобина на гем и глобин в условиях опыта равняется $19\,500 \pm 500$ кал.

В заключение пользуюсь случаем выразить глубокую благодарность проф. А. М. Чарному за постоянный интерес к работе и помощь при обсуждении результатов и С. Э. Красовицкой за помощь при проведении экспериментов.

Центральный институт усовершенствования врачей

Поступило
10 II 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. М. Чарный и Л. А. Блюменфельд, ДАН, **73**, 1001 (1950). ² Л. А. Блюменфельд и А. М. Чарный, ДАН, **75**, 873 (1950). ³ H. Fischer u. H. Orth, Die Chemie des Pyrrols, **2**, Leipzig, 1937. ⁴ D. L. Drabkin, Journ. Biol. Chem., **185**, 231 (1950).