

О МЕТОДИЧЕСКИХ ОШИБКАХ ОЦЕНИВАНИЯ НАЧАЛЬНЫХ СКОРОСТЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И СПОСОБАХ ИХ КОРРЕКЦИИ (НА ПРИМЕРЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ)

© 2023 г. А.Ю. Лянгузов*, #, Н.М. Малыгина*, **, Т.А. Петрова*

*Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

**Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева, 6, Санкт-Петербург, 194044, Россия

#E-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Представлен универсальный алгоритм расчета начальных скоростей ферментативных реакций в «нулевой» момент времени по кинетической кривой расхода субстрата или накопления продукта при проведении прямых кинетических измерений активности ферментов. Исследование выполнено на примере коммерческого препарата лактатдегидрогеназы и стандартного биохимического набора реагентов. Предлагаемый подход позволяет практически исключить систематическую ошибку измерений, с одинаковой точностью определять начальную скорость реакции независимо от уровня активности ферментов, сократить до одной минуты время выполнения анализов, а также расширить сферу применения стандартных наборов реагентов для исследования образцов ферментов разного происхождения при решении широкого круга задач. Алгоритм не может применяться при использовании в аналитической процедуре систем сопряженных ферментов, поскольку на кинетических кривых в этом случае имеется длительная начальная лаг-фаза.

Ключевые слова: стационарная ферментативная кинетика, начальная скорость реакции, «нулевой» момент времени, лактатдегидрогеназа.

DOI: 10.31857/S0006302923060029, EDN: ROBOAV

Проблема определения начальной скорости ферментативной реакции в момент, максимально близкий к точке перехода в стационарный режим, была сформулирована достаточно давно, но до сих пор не нашла адекватного решения. В практической энзимологии принято считать, что условия выполнения анализов подобраны так, что измерения проводятся на так называемом «линейном» участке кинетической кривой, обычно удаленном от момента запуска реакции на 30–60 с и продолжающемся не менее трех минут [1]. В реальности же ни один из участков кинетической кривой никогда не является линейным, и чем шире временной интервал наблюдений и выше концентрация или молекулярная активность фермента, тем больше отклонение от линейности.

Современная тенденция к автоматизации и стандартизации биохимических методов анализа

привела к массовому появлению на рынке готовых наборов реагентов для исследования ферментов и метаболитов. Поскольку основными потребителями таких наборов являются клинические диагностические лаборатории, то протоколы их использования и расчета показателей разрабатывались главным образом для клинической лабораторной практики. Тем не менее, в биологии, экологии, биотехнологии, пищевой промышленности, экспериментальной медицине, ветеринарии регулярно возникает необходимость определения активности ферментов для решения самых разных задач.

Цель настоящей работы – на примере лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) и стандартного набора реагентов для определения ее активности показать, как рутинные методы анализа вносят систематическую ошибку в результаты измерений и как можно ее скорректировать.

Сокращения: ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован коммерческий препарат лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из мышц кролика: тип II, 800–1200 ед/мг (Sigma-Aldrich, США) в разных разведениях и стандартный набор реагентов для определения активности ЛДГ кинетическим фотометрическим методом (LDH. Pyruvate. Kinetic UV. DGKC. Liquid; Spinreact, Испания) [1, 2].

ЛДГ катализирует реакцию превращения пирувата в лактат с NADH в качестве кофермента:

ЛДГ



Прямой фотометрический метод определения скорости ЛДГ-реакции основан на измерении убыли поглощения инкубационной смеси при 340 нм за счет уменьшения концентрации NADH в ходе ферментативного процесса.

Согласно стандартному протоколу, к 3 мл рабочего реагента при 37°C добавляют 50 мкл образца фермента, перемешивают и через 1 мин регистрируют значение поглощения инкубационной смеси. Затем поглощение измеряют еще трижды, т.е. всего четыре значения поглощения для каждой анализируемой пробы. В пределах второй-четвертой минут рассчитывают среднее значение изменения поглощения за одну минуту, которое затем используют для расчета активности фермента по приведенной в протоколе формуле.

Протокол использования клинического набора реагентов для определения активности ЛДГ отличается от общепринятого метода при решении других задач лишь значением коэффициента пересчета на 1 литр сыворотки крови.

Далее в разделе «Результаты и обсуждение» будет описан оптимизированный нами протокол определения максимальной начальной стационарной скорости ЛДГ-реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оксидоредуктазы являются самым многочисленным из семи классов ферментов, в котором NAD(P)H-зависимые ферменты представлены несколькими сотнями наименований, относящихся к разным подклассам [3–5].

Несмотря на кажущуюся простоту стандартных прямых кинетических фотометрических определений скоростей реакций этих ферментов с регистрацией уменьшения поглощения при 340 нм за счет окисления NAD(P)H, остается методическая проблема точности оценивания начальной стационарной скорости, от которой зависит и правильность расчета активности ферментов.

Длительность эксперимента, исчисляемая минутами, особенно при высоких концентрациях или высокой молекулярной активности фермента, обязательно приводит к появлению систематической ошибки измерений. Скорость ферментативного процесса во времени постоянно снижается вследствие истощения субстрата, и, кроме того, может дополнительно тормозиться за счет накопления продукта реакции или изменения состава и pH инкубационной среды в ходе эксперимента. Все перечисленные обстоятельства приводят к занижению средней расчетной скорости реакции, а в итоге — недооценке реальной активности.

Как правило, эта проблема решается подбором оптимальной концентрации фермента в специальной серии экспериментов, когда отклонение от так называемой «линейности» накопления продукта или расхода субстрата во времени не слишком выражено — режим квазилинейности. Однако даже при такой стратегии систематическая ошибка измерений все равно остается, и скорректировать ее практически невозможно.

Лактатдегидрогеназа, использованная в настоящем исследовании как модельный объект, является одним из наиболее хорошо изученных из группы NAD(P)H-зависимых ферментов.

В нашей работе эксперименты проводили на спектрофотометре Lambda 35 (PerkinElmer, США) в кювете с перемешиванием и термостатированием. На рис. 1 представлены типичные кинетические кривые ЛДГ-реакции с разным количеством фермента в анализируемых образцах (рис. 1а) и соответствующие им кривые скорости реакции, которые являются первыми производными кинетических кривых по времени, рассчитанными методом численного дифференцирования (рис. 1б). Совершенно очевидно, что, даже при разумных пределах варьирования концентраций фермента, систематическая ошибка очень быстро может стать критической. Иногда достаточно нескольких секунд от начала реакции, чтобы при высокой активности фермента усредненная оценка скорости уже в первом минутном интервале существенно отклонилась от реальной начальной скорости (рис. 1б).

В отличие от стандартного протокола, рекомендуемого производителями наборов реагентов для определения активности ЛДГ, измерение поглощения инкубационной среды проводили ежесекундно через модуль TimeDrive компьютерной программы UV WinLab Software 6.0.4, предназначенной для выполнения кинетических экспериментов на спектрофотометре Lambda 35 [6]. Для этого субстратную смесь помещали в термостатируемую кювету с перемешиванием и выдерживали в течение 3 мин до достижения стабильной температуры 37°C. Регистрацию поглощения на-

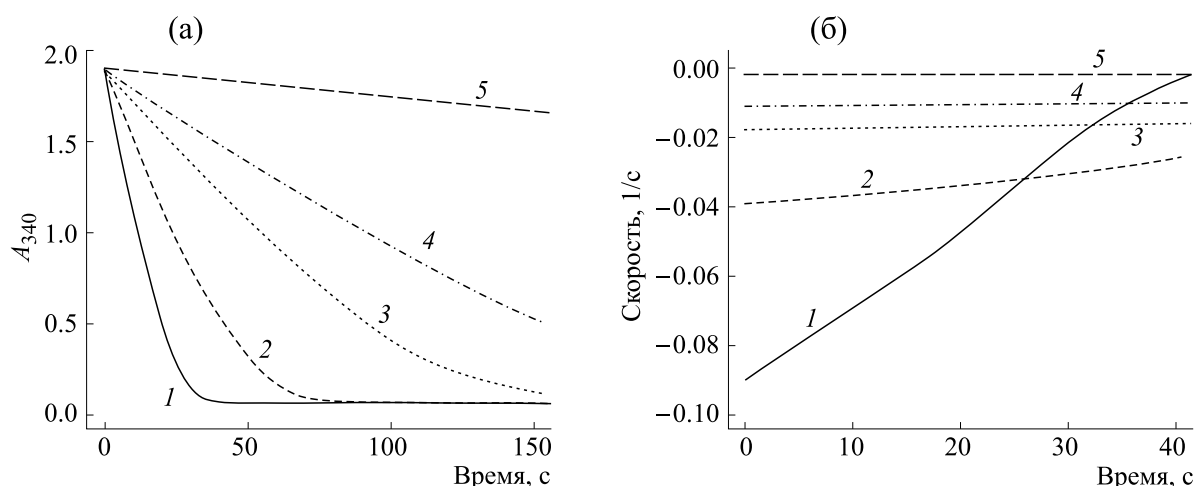


Рис. 1. Кинетические кривые ЛДГ-реакции с разным количеством фермента в образце (а) и соответствующие им кривые скорости реакции (б). Количество единиц активности ЛДГ в пробах: 1 – 5.74, 2 – 2.29, 3 – 1.15, 4 – 0.46, 5 – 0.12.

чинали за 15–20 с до момента внесения исследуемого образца фермента и не прерывали при добавлении анализируемой пробы. Результирующий график процесса имел сложную форму и состоял из трех областей (рис. 2): *a* – базовая линия (примерно 15–20 с), *б* – резкое падение поглощения в момент добавления образца фермента из-за открытой крышки кюветного отсека спектрофотометра (примерно 5–8 с) и *в* – собственно кинетическая кривая реакции.

Основная проблема заключается в том, что исследователя в первую очередь должна интересовать начальная стационарная скорость реакции в

максимально близкий к нулевому момент времени (назовем его «нулевое» время), который приходится на второй интервал (зона *б*, рис. 2), но по первичным данным установить точное время начала реакции практически невозможно. Именно задачу нахождения максимальной начальной скорости реакции в «нулевой» момент времени и решает предлагаемый нами метод. Следует особо отметить, что о предстационарной кинетике в настоящей работе речь не идет.

Результаты экспериментов сохраняли в формате ASCII и далее анализировали с использованием разработанного нами оригинального скрипта на открытом языке программирования R [7].

Алгоритм обработки данных рассматривает базовую линию (зона *a*, рис. 2) как прямую, а начальный участок реальной кинетической кривой (зона *в*, рис. 2) как ветвь параболы – кривую второй степени вида $y = a + bx + cx^2$, где x – регистрируемое время. Для аппроксимации квадратным уравнением использовали отрезок кинетической кривой в диапазоне примерно с десятой по тридцатую-сороковую секунды от момента добавления образца фермента. Точное «нулевое» время начала реакции устанавливали по пересечению аппроксимированной кинетической кривой с базовой линией (зона *б*, рис. 2).

Скорость реакции определяется уравнением $y' = b + 2cx$ как первая производная аппроксимированной кривой по времени. Экстраполяция значения скорости на момент старта реакции (скорректированное значение x) представляет собой искомую начальную скорость реакции в «нулевой» момент времени, точнее всего характеризующую активность фермента в пробе. На графиче-

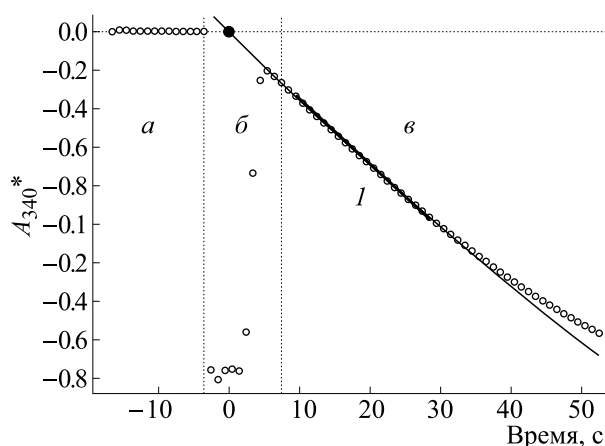


Рис. 2. Расчет координат точки начала реакции: аппроксимация полиномом второй степени начального участка кинетической кривой: зона *a* – базовая линия, зона *б* – резкое падение поглощения в момент добавления образца фермента, зона *в* – кинетическая кривая реакции. A_{340}^* – поглощение инкубационной среды за вычетом поглощения базовой линии, *1* – аппроксимированный участок кинетической кривой.

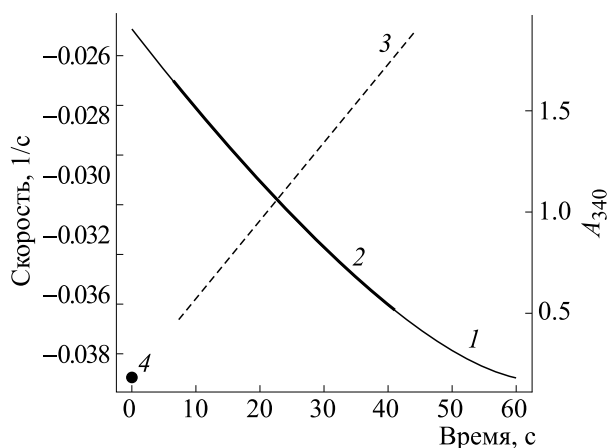


Рис. 3. Расчет начальной скорости ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени: 1 — изменение поглощения в ходе реакции, 2 — аппроксимированный квадратным уравнением участок кинетической кривой, 3 — скорость реакции в этом интервале (первая производная скорректированной кинетической кривой), 4 — оценка значения начальной стационарной скорости реакции в «нулевой» момент времени.

ке это — жирная точка в левом нижнем углу (рис. 3).

При высоких уровнях активности фермента стандартные интервальные оценки скорости реакции могут отличаться от максимальной начальной скорости в «нулевой» момент времени практически на порядок. В табл. 1 приведены значения скоростей ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени и значения скоростей, измеренные стандартным методом.

Описываемый подход в отличие от стандартного протокола позволяет оценить «истинную» максимальную начальную стационарную скорость реакции в «нулевой» момент времени, что

практически исключает систематическую ошибку измерений.

В ЛДГ-реакции кофермент NADH фактически исполняет роль второго субстрата, и наблюдения ведутся по убыли его концентрации. Ранее на примере альфа-амилазы слюны аналогичным образом нами была исследована кинетика накопления продукта реакции [8]. Как и в случае ЛДГ, значения усредненной скорости амилазной реакции могли отличаться от максимальной начальной скорости в «нулевой» момент времени почти на порядок.

Для обработки экспериментальных данных для обоих вариантов нами разработан оригинальный текст скрипта на открытом языке программирования R. Скрипт решает следующие задачи: считывает полученные в экспериментах значения поглощения реакционной смеси во времени, устанавливает момент начала реакции («нулевое» время), оценивает скорректированные значения поглощения и значения скорости реакции в начале ферментативного процесса, вычисляет начальную скорость реакции в «нулевой» момент времени и представляет результаты в графическом формате.

Код скрипта для расчета максимальной начальной скорости реакции не включен в текст статьи и может быть выслан по запросу.

Таким образом, представленная нами новая стратегия расчета начальной скорости ферментативной реакции в «нулевой» момент времени по кинетической кривой расхода субстрата или накопления продукта является практически универсальной и пригодна для анализа кинетики разных ферментов при прямых измерениях их активности (например, кислой и щелочной фосфатаз, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, γ -глутамилтрансферазы и др.) [9].

Таблица 1. Значения скоростей ЛДГ-реакции в «нулевой» момент времени и значения, измеренные стандартным методом, и их соотношения в зависимости от уровня активности фермента в пробе

Уровень активности ЛДГ в пробе	Скорость, 100 с^{-1}		Соотношение скоростей «начальная/средняя»
	Максимальная начальная	*Средняя в пределах 60–240 с	
Высокий	–9.55	–1.00	9.6
Средний	–3.90	–0.99	3.9
Малый	–0.61	–0.52	1.2

Примечание. * — По стандартному протоколу измерения начинают через 60 с после запуска реакции.

В результате предлагаемый нами новый подход к расчету начальных скоростей ферментативных реакций в «нулевой» момент времени позволяет практически исключить систематическую ошибку измерений, с одинаковой точностью определять начальную скорость реакции независимо от уровня активности ферментов, сократить до одной минуты время выполнения анализов, а также расширить сферу применения стандартных наборов реагентов для исследования образцов ферментов разного происхождения при решении широкого круга задач.

Предлагаемый алгоритм нельзя использовать, если в аналитическую систему включены сопряженные системы ферментов, поскольку на кинетических кривых наблюдается длительная начальная лаг-фаза [10, 11].

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования и расходных материалов Ресурсно-го центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка СПбГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spinreact*, <https://www.spinreact.com>. Дата обращения: 10.05.2023.
2. M. Meerkin, in *Tietz clinical guide to laboratory tests*, Ed. by A. H. B. Wu (W.B. Saunders Company, Danvers, 2006), pp. 648–650.
3. A. Chang, L. Jeske, S. Ulbrich, et al., *Nucl. Acids Res.*, **49**, D498 (2021).
4. *Enzyme Nomenclature*, <http://www.enzyme-database.org/contents.php>. Дата обращения: 10.05.2023.
5. L. S. Vidal, C. L. Kelly, P. M. Mordaka, and J. T. Heap, *Biochim. Biophys. Acta: Proteins Proteomics*, **1866**, 327 (2018).
6. *UV WinLab Software 6.0.4 (PerkinElmer Lambda 35)*, <http://www.perkinelmer.com>. Дата обращения: 10.05.2023.
7. *R Project*, <https://www.r-project.org>. Дата обращения: 10.05.2023.
8. N. M. Malygina, T. A. Petrova, A. Yu. Lianguzov, and A. M. Ivanov, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **488**, 311 (2019).
9. Products/Clinical Biochemistry/Enzymes, <https://www.spinreact.com/en/products-list/clinical-biochemistry/enzymes.html>. Дата обращения: 10.05.2023.
10. W. W. Cleland, *Anal. Biochem.*, **99**, 142 (1979).
11. A. Yu. Lyangusov, T. A. Petrova, and V. E. Stefanov, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **424**, 49 (2009).

On Methodological Errors in Estimating the Initial Velocities of Enzyme-Catalyzed Reactions and on Approaches to Their Correction (A Case Study with Lactate Dehydrogenase)

A.Yu. Lianguzov*, N.M. Malygina*, **, and T.A. Petrova*

*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

**Kirov Military Medical Academy, Akademika Lebedeva ul., 6, St. Petersburg, 194044 Russia

A universal algorithm is proposed to compute the initial velocities of enzyme-catalyzed reactions at “zero time” from the kinetic curve for substrate consumption or product accumulation determined by direct measurements of changes in enzyme activities. The research is illustrated with a commercial lactate dehydrogenase sample and a standard biochemical test kit. The proposed approach makes it possible to virtually eliminate systematic errors in measurements, determine the initial velocity with the same accuracy regardless of the levels of enzyme activities, reduce time spent on analysis to one minute, and expand the scope of application of standard test kits for studying enzymes isolated from different sources when solving a wide range of problems. The algorithm cannot be applied to analyses of coupled enzyme reactions because there is a long initial lag phase in respective kinetic curves.

Key words: steady-state enzyme kinetics, initial reaction velocity, “zero time”, lactate dehydrogenase