

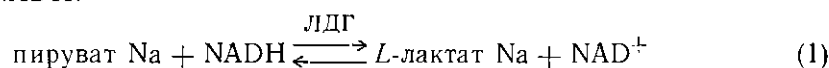
В. А. Мостовников, Г. Р. Мостовникова, В. Ю. Плавский,  
С. А. Третьяков

## ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ НАДН-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ

Установлен неизвестный ранее эффект — зависимость скорости ферментативной реакции превращения пировиноградной кислоты в молочную, катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в присутствии никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН) от концентрации растворенного в реакционной среде кислорода воздуха ( $O_2$ ). Показано, что этот эффект обусловлен образованием комплекса динуклеотида с молекулами  $O_2$ . Установлено, что удаление молекулярного кислорода из раствора кофермента приводит к изменению пространственной структуры молекул НАДН. Изменения, индуцируемые молекулярным кислородом, носят обратимый характер.

Для реакции превращения лактата в пируват, катализируемой ЛДГ в присутствии НАД окисленного ( $NAD^+$ ), зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации растворенного кислорода не наблюдается. Не происходит и комплексообразования окисленной формы кофермента с молекулами  $O_2$ .

**Введение.** При исследовании кинетики окислительно-восстановительной биохимической реакции превращения пирувата натрия в лактат, катализируемой ЛДГ (L-лактат,  $NAD^+$ -оксид редуктаза, КФ 1.1.1.27) в присутствии НАДН:



установлен неизвестный ранее эффект — зависимость скорости этой реакции от концентрации растворенного в реакционной среде кислорода воздуха.

Для реакции превращения лактата в пируват, катализируемой ЛДГ в присутствии  $NAD^+$



указанный эффект отсутствовал.

В связи с тем, что рассматриваемые биохимические реакции относятся к одним из важнейших звеньев обмена веществ в биологических системах, представляло интерес выяснить молекулярный механизм нарушенного эффекта.

Данная статья посвящена результатам упомянутых выше исследований.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали коммерческие препараты ЛДГ из сердца быка и пируват натрия фирмы «Serva» (ФРГ);  $NAD^+$  и  $\beta$ -НАДН фирмы «Reanal» (Венгрия); D, L-лактат — «Рехим» (СССР).

Начальную скорость реакций определяли по уменьшению (реакция 1) или увеличению (реакция 2) оптической плотности (за промежуток времени с 10-й по 20-ю с с момента смешивания компонентов) при длине волны  $\lambda=340$  нм, соответствующей максимуму длинноволновой полосы спектра поглощения НАДН. Реакцию превращения пирувата в лактат проводили в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,2; в реакции превращения лактата в пируват применяли 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,2, и 0,1 М глициновый буфер, pH 10,0 (точность контроля pH  $\pm 0,05$ ). Реакцию запускали в спектрофотометрических кварцевых кюветках объемом 3 мл (1×1×3 см).

Влияние молекулярного кислорода на скорость ферментативной реакции исследовали путем сравнения скоростей реакций при использовании кислородсодержащих и обескислороженных растворов фермент — кофермент. Для этого буферные растворы коферментов НАДН

и  $\text{NAD}^+$  освобождали от кислорода пропусканием инертного газа (в экспериментах использовали азот, аргон, гелий с содержанием посторонних газов не более 0,005 % или в результате вакуумирования). Затем к 100 мл кислородсодержащих (контрольный вариант) и обескислороженных (исследуемый вариант) растворов  $\text{NADH}$  (или  $\text{NAD}^+$ ) добавляли по 200 мкл кислородсодержащего раствора ЛДГ. Следует отметить, что добавление такого количества раствора ЛДГ в обескислороженные растворы  $\text{NADH}$  и  $\text{NAD}^+$  (объемом 100 мл) приводило к практически несущественному увеличению концентрации  $\text{O}_2$  в получен-

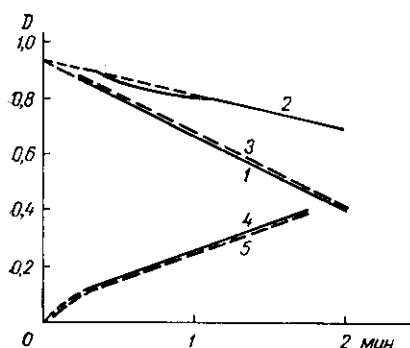


Рис. 1

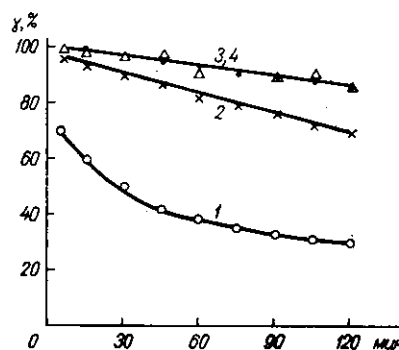


Рис. 2

ных бинарных растворах  $\text{NADH}$  — ЛДГ и  $\text{NAD}^+$  — ЛДГ по сравнению с исходными, прокаченными аргоном, растворами  $\text{NADH}$  и  $\text{NAD}^+$ . После смешивания компонентов указанные растворы до запуска реакции выдерживали (во всех случаях, если не оговорено специально) в течение 5 мин для образования комплекса фермент — кофермент.

Биохимическую реакцию превращения пирувата в лактат (реакция 1) запускали внесением 1 мл кислородсодержащего (контрольный вариант) или обескислороженного (исследуемый вариант) раствора  $\text{NADH}$  — ЛДГ к 1 мл кислородсодержащего раствора пирувата. В реакции превращения лактата в пируват (реакция 2) 1 мл кислородсодержащего (контрольный вариант) или обескислороженного (исследуемый вариант) раствора  $\text{NAD}^+$  — ЛДГ добавляли к 1 мл кислородсодержащего раствора лактата (лактат готовили в глициновом буфере,  $\text{pH}$  10,0). Таким образом, контрольные и исследуемые варианты реакций отличались только концентрацией молекулярного кислорода в бинарной смеси фермент — кофермент. Для исключения других артефактов контрольные и исследуемые эксперименты чередовали.

К моменту начала ферментативной реакции концентрации (М) используемых веществ были следующими. В реакции 1: ЛДГ —  $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $\text{NADH}$  —  $1,5 \cdot 10^{-4}$ , пируват —  $1,9 \cdot 10^{-4}$ ; в реакции 2: ЛДГ —  $1,0 \cdot 10^{-9}$ ,  $\text{NAD}^+$  —  $5,0 \cdot 10^{-3}$ , лактат —  $2,5 \cdot 10^{-3}$ .

О комплексообразовании молекулярного кислорода с молекулами кофермента судили по изменению спектров электронного поглощения буферных растворов  $\text{NADH}$  и  $\text{NAD}^+$  при увеличении парциального давления кислорода. Измерения проводили на спектрофотометре Specord M40 UV VIS («Carl Zeiss», ГДР) в специальных кюветах с базой 100 мм, позволяющих повышать давление газа над раствором до 150 атм.

Об изменении конформации молекул  $\text{NADH}$  при удалении из раствора молекулярного кислорода свидетельствуют данные спектров флуоресценции, возбуждения флуоресценции и поляризации флуоресценции по возбуждению. Указанные люминесцентные измерения осуществляли на спектрофлуориметре SLM-4800 (США).

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что использование обескислороженных растворов  $\text{NADH}$  — ЛДГ для запуска ферментативной реакции превращения пирувата в лактат приводит к

уменьшению ее скорости (по сравнению с контрольными кислородсодержащими растворами кофермента) на 30 %. На рис. 1 представлена кинетическая зависимость хода ферментативной реакции превращения пирувата в лактат (1—3) и лактата в пируват (4, 5) при использовании кислородсодержащих (1, 4), обескислороженных (2, 5) и насыщенных кислородом воздуха после предварительного деаэрирования (3) растворов фермент — кофермент. Как видно из рисунка, скорость исследуемого варианта реакции превращения пирувата в лактат значительно меньше, при этом кинетическая кривая хода ферментативной реакции отклоняется от линейной зависимости. Вероятно, отклонение от линейности связано с тем, что в ходе реакции происходит частичное насыщение деаэрированного раствора NADH — ЛДГ кислородом (как уже отмечалось, реакция запускается кислородсодержащим раствором пирувата натрия), приводящее к некоторому увеличению скорости реакции. Действительно, исследования показали, что если обескислороженный раствор NADH до смешивания с раствором ЛДГ повторно насыщался кислородом, то скорость реакции с участием этого реагента соответствовала (была равна) скорости реакции контрольного варианта (рис. 1, кривая 3). Данный факт позволяет сделать вывод о том, что изменения, индуцируемые удалением кислорода, носят обратимый характер.

Как показали результаты исследований, скорость окислительно-восстановительной реакции превращения лактата в пируват, катализируемой ЛДГ в присутствии NAD<sup>+</sup>, не зависит от концентрации растворенного кислорода (см. рис. 1, кривые 4, 5).

Установлено, что скорость реакции превращения пирувата в лактат во многом определяется условиями формирования комплекса NADH — ЛДГ и временем его инкубирования. Эксперимент проводили следующим образом. Готовили четыре раствора (по 100 мл) буфера. Два из них (исследуемые) прокачивали аргоном, а два находились при атмосферном давлении кислорода. Затем в один из сосудов с прокаченным буфером последовательно (с интервалом 30 мин) вносили по 100 мкл концентрированных растворов NADH и ЛДГ. В другой деаэрированный сосуд с буфером вносили 200 мкл раствора NADH — ЛДГ (комплекс NADH — ЛДГ формировался в кислородсодержащей среде). Аналогично прибавляли компоненты в сосуды с кислородсодержащим буфером (контрольные растворы). На рис. 2 представлена зависимость ферментативной активности ЛДГ от времени инкубирования комплекса NADH — ЛДГ в анаэробном (1, 2) и аэробном (3, 4) буферах: при последовательном внесении в буфер концентрированных растворов NADH и ЛДГ (1, 3) и концентрированного комплекса NADH — ЛДГ, формирование которого производилось в кислородсодержащих растворах (2, 4). Как следует из графика, уже после инкубирования раствора ЛДГ с NADH в течение 5 мин (времени, необходимого для образования комплекса NADH — ЛДГ) наблюдаются существенные различия в скорости ферментативной реакции при использовании кислородсодержащих и обескислороженных растворов. При этом наиболее низкое значение скорости ферментативной реакции наблюдается при использовании комплекса NADH — ЛДГ (рис. 2, кривая 1), формирование которого проводилось в анаэробных условиях, т. е. при последовательном внесении в обескислороженный буфер NADH и ЛДГ. Если же комплекс NADH — ЛДГ формировался в присутствии кислорода, а затем его вносили в обескислороженный буфер, то скорость реакции (рис. 2, кривая 2) мало отличалась от таковой при использовании контрольных растворов (кривые 3, 4). Необходимо отметить, что для кислородсодержащих растворов скорость реакции не зависела от того, вносили в буфер предварительно сформированный комплекс NADH — ЛДГ (кривая 3) или кофермент и фермент последовательно (кривая 4).

Увеличение времени инкубирования комплекса NADH — ЛДГ как в кислородсодержащем, так и обескислороженном буфере приводит к

потере ферментативной активности ЛДГ. Однако, если для кислородсодержащих растворов снижение ферментативной активности незначительно (остаточная ферментативная активность спустя 2 ч составляет  $\gamma=85\%$ ), то для деаэрированных растворов  $\gamma=70\%$  в случае формирования комплекса NADH — ЛДГ в кислородсодержащих условиях и  $\gamma=30\%$  при последовательном внесении в буфер NADH и ЛДГ. То есть с течением времени различия в остаточной ферментативной активности между кислородсодержащими и обескислороженными растворами становятся все более существенными.

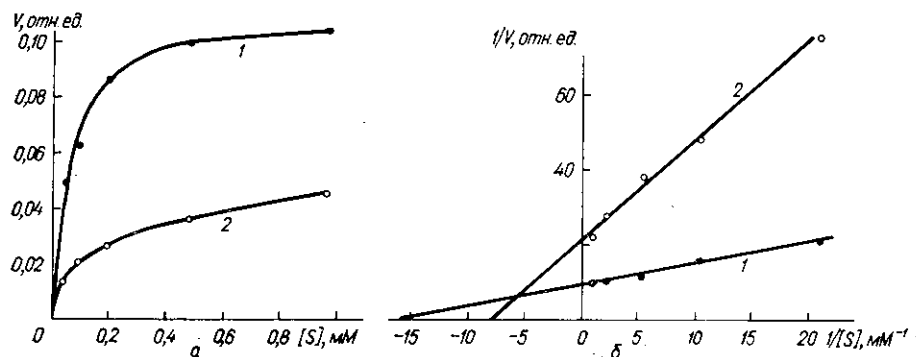


Рис. 3

Следует отметить, что если после насыщения молекулярным кислородом растворов NADH — ЛДГ, предварительно инкубированных в течение 5 мин в анаэробных условиях, наблюдается практически полное восстановление активности фермента, то насыщение кислородом растворов, инкубированных в анаэробных условиях в течение 2 ч, приводит лишь к частичному восстановлению ферментативной активности ЛДГ.

Определенную информацию о механизме ингибирования активности фермента можно получить из анализа зависимости скорости ( $V$ ) ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов ( $[S]$ ) в отсутствие и присутствии ингибитора [1]. Однако нахождение зависимости  $V=f[S]$  в условиях данного эксперимента сопряжено со значительными трудностями вследствие изменения во времени активности фермента в анаэробных условиях. Для исключения указанного артефакта измерения проводили через 2 ч после добавления ЛДГ к NADH, когда ферментативная активность уже практически не изменяется во времени (см. рис. 2, кривая 1). На рис. 3, а, представлена зависимость начальной скорости ферментативной реакции превращения пирувата в лактат от концентрации пирувата (график Михаэлиса — Ментен) при использовании кислородсодержащих (кривая 1) и обескислороженных (кривая 2) растворов ЛДГ. Как видно, какой бы высокой ни была концентрация пирувата, максимальная скорость окислительно-восстановительной реакции при использовании деаэрированных растворов NADH — ЛДГ значительно ниже, чем кислородсодержащих. Из линейной анаморфозы уравнения Михаэлиса — Ментен — зависимости Лайнуивера — Берка  $1/V=f(1/[S])$ , представленной на рис. 3, б, следует также, что замена кислородсодержащего раствора NADH — ЛДГ на обескислороженный приводит к увеличению константы Михаэлиса, т. е. к снижению степени сродства пирувата к субстратсвязывающему центру ЛДГ.

Так как концентрация используемых реагентов, pH и температура кислородсодержащего и обескислороженного растворов оставались во время всего эксперимента постоянными, можно предположить, что изменение скорости ферментативной реакции при удалении из раствора молекулярного кислорода обусловлено либо участием  $O_2$  в каталитическом переносе электронов [2, 3], либо изменением структуры компонентов биохимической реакции при удалении из раствора молекуляр-

ного кислорода. Не отрицая возможной роли кислорода как переносчика электрона в механизме окислительно-восстановительной реакции (что является предметом многочисленных дискуссий [2, 3]), мы попытались проверить, не связаны ли наблюдаемые эффекты с различием в пространственной структуре молекул NADH в присутствии и отсутствии молекулярного кислорода.

Основанием для вывода об отличиях пространственной структуры молекул NADH в аэробных условиях являются наблюдаемые различия в: 1) спектрах возбуждения флюоресценции; 2) поляризационных спектрах флюоресценции по возбуждению; 3) интенсивности и спектральном расположении спектров флюоресценции растворов кофермента.

Прежде чем представить результаты исследований, свидетельствующих об изменении пространственной структуры NADH при удалении молекулярного кислорода, кратко остановимся на структурных и спектрально-люминесцентных характеристиках кофермента.

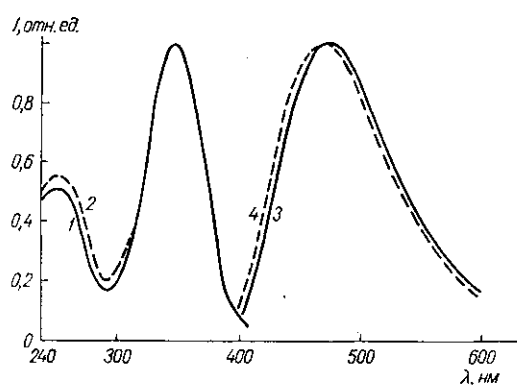


Рис. 4

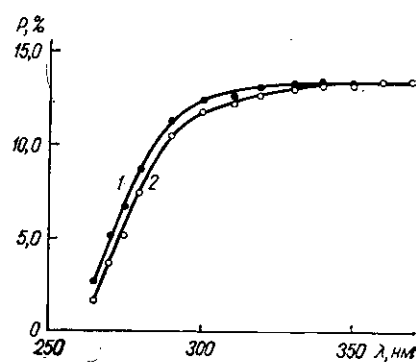


Рис. 5

Как известно [3, 4], NAD образован двумя нуклеотидами, соединенными пирофосфатной связью. В качестве оснований в одном нуклеотиде выступает аденин, во втором — дигидроникотинамид (пиридиновый нуклеотид). В растворе молекула NADH, как и ее окисленный аналог  $NAD^+$ , существует в двух основных конформациях: вытянутой, в которой основания аденина и никотинамида удалены друг от друга примерно на 1,2 нм, и компактной, в которой два гетероцикла располагаются параллельно друг под другом на расстоянии 0,34 нм [4]. Все эти конформации переходят одна в другую. Количественное соотношение между ними зависит от условий и свойств среды, в которой находится кофермент.

Спектр поглощения буферного раствора NADH характеризуется наличием максимумов в области 260 нм (основной вклад вносит адениновое основание) и 340 нм (определяется никотинамидным хромофором) [4, 8]. Флюоресцентные свойства динуклеотида обусловлены основанием дигидроникотинамида (максимум спектра флюоресценции расположен в области 470 нм). В пользу этого свидетельствует тот факт, что флюоресценция аденина расположена в области 390 нм, характеризуется очень низким квантовым выходом ( $\sim 10^{-5}$ ) и в спектрах пиридиновых нуклеотидов не наблюдается [8]. Кроме того, в спектре возбуждения флюоресценции NADH присутствует полоса с максимумом в области 340 нм, соответствующая поглощению дигидроникотинамида.

Следует отметить, что при наличии в растворе значительного количества молекул NADH в компактной конформации в спектре возбуждения флюоресценции кофермента ( $\lambda_{\text{пер}} = 470$  нм) регистрируется полоса с максимумом в области 260 нм. Как показывают многочисленные исследования [8—11], наличие указанной полосы обусловлено миграцией энергии от электронно-возбужденного аденина к дигидронико-

тинамиду. Одним из доказательств внутримолекулярного переноса энергии является тот факт, что после обработки динуклеотида пиррофосфатазой максимум в области 260 нм исчезает [9]. Учитывая, что эффективность переноса энергии электронного возбуждения существенно зависит от расстояния между донором и акцептором, по изменению соотношения интенсивностей на длине волны 260 и 340 нм в спектре возбуждения флюоресценции NADH можно судить о степени разворотности молекул динуклеотида [10]. Указанный факт и использовался нами как одно из доказательств изменения пространственной структуры кофермента при удалении из раствора молекулярного кислорода. На рис. 4 представлены нормированные спектры возбуждения (1, 2) ( $\lambda_{\text{рег}}=470$  нм) и флюоресценции (3, 4) ( $\lambda_{\text{возб}}=340$  нм) буферного раствора NADH в аэробном (1, 3) и анаэробном (2, 4) буферах. Как видно из рисунка, снижение концентрации растворенного кислорода в растворе кофермента приводит к возрастанию интенсивности коротковолновой полосы (при  $\lambda=260$  нм) в спектре возбуждения NADH, что прямо указывает на изменение пространственной структуры последнего.

Правомомерность этого заключения подтверждается данными по зависимости степени поляризационных спектров флюоресценции ( $\lambda_{\text{рег}}=470$  нм) от длины волны возбуждения для кислородсодержащего (1) и обескислороженного (2) растворов NADH, представленными на рис. 5. Как следует из рисунка, степень поляризации флюоресценции кофермента ( $t=20^\circ\text{C}$ ) при возбуждении в длинноволновой области спектра практически не отличается от кислородсодержащего и обескислороженного растворов кофермента и составляет  $P=11\%$ . Со смещением длины волны возбуждения в коротковолновую область наблюдается снижение степени поляризации [12], обусловленное миграцией энергии от аденина к никотинамиду. (Метод измерения поляризации флюоресценции при внутримолекулярном переносе энергии неоднократно использовался для исследования структурных перестроек белков, дипептидов и т. п. [13].) При этом деполяризация флюоресценции для деаэрированного раствора NADH (рис. 5, кривая 2) выражена в большей степени, чем для кислородсодержащего (кривая 1). Учитывая, что перенос энергии в молекуле NADH обусловлен внутримолекулярными диполь-дипольными взаимодействиями [9], наблюдаемое на графике увеличение эффективности переноса энергии при удалении из раствора кислорода может быть связано либо с уменьшением расстояния донор — акцептор, либо с изменением угла между диполем донора и акцептора.

Еще одним свидетельством конформационных превращений дигидроникотинамидадениндинуклеотида восстановленного является увеличение (на 6 %) интенсивности и смещение в коротковолновую область спектра флюоресценции NADH при снижении парциального давления кислорода. Нормированные спектры кислородсодержащих и деаэрированных растворов NADH представлены на рис. 4 (кривые 3 и 4 соответственно). Можно было бы предположить, что увеличение квантового выхода флюоресценции при деаэрировании раствора NADH связано с уменьшением влияния кислорода как тушителя возбужденного состояния молекул кофермента. Однако при тушении флюоресценции должен наблюдаться коротковолновый сдвиг спектра флюоресценции [14], т. е. эффект, обратный наблюдаемому нами.

Таким образом, совокупность представленных данных позволяет сделать вывод о том, что молекулярный кислород стабилизирует определенную ориентацию основания и углеводного кольца, которая обеспечивает эффективное протекание окислительно-восстановительной реакции превращения пирувата в лактат.

Установлено, что причиной различий пространственной структуры NADH в аэробных и анаэробных условиях является образование равновесных комплексов динуклеотида с молекулами  $\text{O}_2$ . Об образовании комплекса молекулярного кислорода с NADH свидетельствует измене-

ние спектра электронного поглощения буферного раствора кофермента при повышении парциального давления кислорода. Для примера на рис. 6 представлены спектры поглощения раствора NADH при концентрациях кислорода, соответствующих (по закону Генри) атмосферной (кривая 1) и  $P=90$  атм (кривая 2). Как видно из рисунка, при повышении парциального давления кислорода интенсивность полосы электронного поглощения ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) раствора NADH сильно возрастает. Следует отметить, что возрастание коэффициента экстинкции буферного раствора при увеличении концентрации растворенного кислорода обусловлено двумя составляющими: а) за счет образования комплекса растворенного кислорода с буфером; б) вследствие связывания  $O_2$

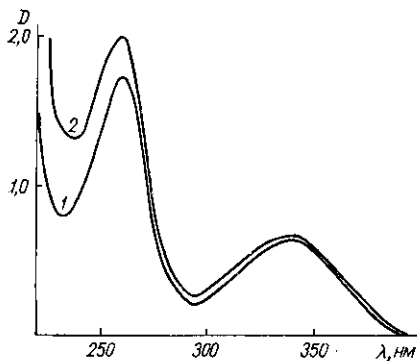


Рис. 6

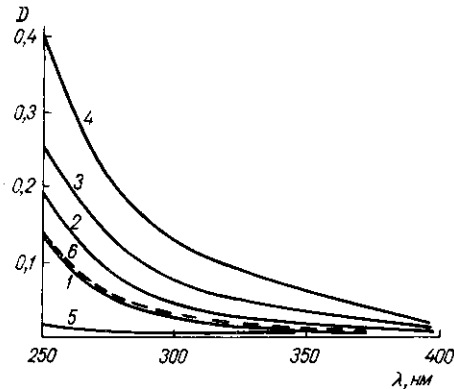


Рис. 7

с молекулами NADH. Вклад в общее увеличение интенсивности поглощения составляющей, обусловленной комплексообразованием  $O_2$  — буфер, можно оценить из дифференциального спектра (рис. 7: дифференциальный спектр поглощения буфера (1), буферных растворов NADH

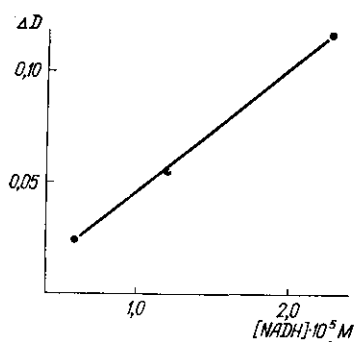


Рис. 8

(2—5) и  $NAD^+$  (6) при давлении газа ( $O_2$  (1—4, 6) и  $Ar$  (5)) над раствором  $P=90$  атм. Концентрация NADH:  $0,6 \cdot 10^{-5}$  (2);  $1,9 \cdot 10^{-5}$  (3);  $2,28 \cdot 10^{-5}$  (4, 5);  $NAD^+$  —  $0,6 \cdot 10^{-5}$  М (6)). Как видно из рис. 7, возрастание интенсивности поглощения при насыщении раствора кислородом в присутствии молекул NADH более значительное, чем для буфера, и наблюдается по всему спектру поглощения кофермента, монотонно падая со смещением в длинноволновую область. При этом прирост поглощения (по отношению к буферу) прямо пропорционален концентрации кофермента (рис. 8: зависимость прироста (по отношению к буферу)

оптической плотности при длине волны 290 нм в дифференциальном спектре поглощения NADH и давлении кислорода  $P=90$  атм от концентрации кофермента).

Установлено, что наблюдаемые спектральные изменения не обусловлены окислением молекул NADH растворенным кислородом. Об этом свидетельствует исчезновение полосы поглощения в дифференциальном спектре раствора NADH при удалении (путем пропускания аргона) из него молекулярного кислорода. Окислительные же процессы становятся спектрально регистрируемыми в случае хранения растворов NADH при повышенном давлении кислорода ( $P \sim 90$  атм) в течение нескольких часов. В таких условиях наблюдается снижение интенсивности поглощения в длинноволновом максимуме ( $\lambda=340$  нм) и прирост поглощения в области  $\lambda=260$  нм.

Таким образом, представленные данные являются прямым доказательством образования комплекса растворенного кислорода с моле-

кулами NADH. Восстановление спектральных характеристик кофермента при удалении из его раствора избытка кислорода свидетельствует о лабильности такого комплексообразования.

В отличие от представленных результатов взаимодействие с кислородом окисленной формы кофермента (NAD<sup>+</sup>) не приводит к образованию комплекса O<sub>2</sub> — NAD<sup>+</sup>. Об этом, в частности, свидетельствует отсутствие различий в дифференциальных спектрах поглощения буфера (см. рис. 7, кривая 1) и буферного раствора NAD<sup>+</sup> (кривая 6) при одинаковом давлении (P=90 атм) кислорода. То есть появление полосы поглощения в буферном растворе NAD<sup>+</sup> при повышении давления кислорода обусловлено только образованием комплекса молекулярного кислорода с буфером, и растворение в нем NAD<sup>+</sup> не приводит к дополнительному связыванию кислорода. Заслуживает внимания и тот факт, что в отличие от результатов, полученных с кислородом, повышение парциального давления аргона, азота или гелия в буфере или буферном растворе NADH практически не приводит к изменению их спектров поглощения и, значит, к появлению полосы поглощения в дифференциальных спектрах. Для примера на рис. 7 (кривая 5) показан дифференциальный спектр поглощения раствора NADH при давлении аргона 90 атм.

Представленные данные также позволяют заключить, что изменение спектров поглощения NADH при повышении концентрации растворенного кислорода является не артефактом, а отражает результат комплексообразования кофермент — молекулярный кислород.

Следует отметить, что косвенные данные о повышенном сродстве молекулярного кислорода к молекулам NADH содержатся в работах [15, 16]. Образование комплекса молекул O<sub>2</sub> с моделями NADH постулируется в исследованиях [3, 17].

Авторы признательны С. В. Коневу (Институт фотобиологии АН БССР) за плодотворное обсуждение работы.

#### Резюме

Встановлено невідомий раніше ефект — залежність швидкості ферментативної реакції перетворення пірвіноградної кислоти в молочну, що каталізується лактатдегідрогеназою (ЛДГ) в присутності нікотинамідаденіндинуклеотиду відтвореного (NADH) від концентрації розчиненого в реакційному середовищі кисню повітря (O<sub>2</sub>). Показано, що цей ефект обумовлений утворенням комплексу динуклеотиду з молекулами O<sub>2</sub>. Встановлено, що видалення молекулярного кисню із розчину коферменту призводить до змін простірної структури молекул NADH. Зміни, викликані молекулярним киснем, мають зворотній характер.

Для реакції перетворення лактату в піруват, що каталізується ЛДГ в присутності NAD окисленого (NAD<sup>+</sup>), залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації розчиненого кисню не спостерігається. Не відбувається і комплексоутворення окисленої форми коферменту з молекулами O<sub>2</sub>.

#### Summary

A new effect, the dependence of the rate of the enzymatic biochemical reaction of pyruvate transformation to lactate catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH) in the presence of reduced nicotinamide dinucleotide (NADH) on the concentration of air oxygen (O<sub>2</sub>) dissolved in the reaction medium, are reported. It is shown that this effect is due to the dinucleotide with molecules O<sub>2</sub> complex formation. It is found that the molecular oxygen removal from the coenzyme solution lead to the NADH spatial structure change. Changes, induced by molecular oxygen, are reversible.

The dependence of the rate enzymatic biochemical reaction on concentration of dissolved oxygen has not been observed in the case of lactate-pyruvate transformation reaction catalysed by LDH in the presence of nicotinamide dinucleotide (NAD<sup>+</sup>). There have not been observed the NAD<sup>+</sup> with O<sub>2</sub> molecules complexes formation.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики.— М.: Изд-во МГУ, 1976.— 320 с.
2. Зеленин С. Е., Хидекель М. Л. Каталитический перенос электронов // Успехи химии.— 1970.— 39, № 2.— С. 209—234.
3. Ясников А. А., Пономаренко С. П. Механизм реакций окисления моделей NADH и фенилглиоксаля перекисью водорода. Гипотеза о раздельном переносе атома водорода и электрона в некоторых ферментативных реакциях с участием NADH и NADPH // Биохимия.— 1976.— 41, № 5.— С. 891—897.
4. Мальцев Н. И. Взаимодействие никотинамидадениндинуклеотидов с апоферментами дегидрогеназ // Коферменты.— М.: Медицина, 1973.— С. 13—67.
5. Jacobus J. Conformation of pyridine dinucleotides in solution // Biochemistry.— 1971.— 10, N 1.— P. 161—164.
6. Conformation of NAD<sup>+</sup> in solution, in holoenzymes and in the crystalline Li<sup>+</sup>-complex / W. Saenger, B. S. Reddy, K. Muhleger, G. Weimann // Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases / Ed. H. Sund.— New York, 1977.— P. 222—236.
7. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1987.— С. 212—215.
8. Юденфренд С. Флюоресцентный анализ в биологии и медицине.— М.: Мир, 1965.— 484 с.
9. Weber G. Intramolecular transfer of electronic energy in dihydrodiphosphopyridine nucleotide // Nature.— 1957.— 180, N 12.— P. 1409.
10. Freed S., Neyfakh E. A., Tumerman L. A. Influence of solvents on the intramolecular energy transfer in NADH and NADPH // Biochim. et biophys. acta.— 1967.— 143, N 2.— P. 432—434.
11. Shifrin S., Kaplan N. O. Structure of dihydrodiphosphopyridine nucleotide // Nature.— 1959.— 183, N 4674.— P. 1529.
12. Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, and simplified synthetic models / T. S. Scott, R. D. Spencer, N. J. Leonard, G. Weber // J. Amer. Chem. Soc.— 1970.— 92, N 3.— P. 687—695.
13. Конев С. В. Электронно-возбужденное состояние биополимеров.— Минск: Изд-во Бел. ун-та, 1965.— 346 с.
14. Лакович Дж. Основы флюоресцентной спектроскопии.— М.: Мир, 1986.— 496 с.
15. Bernofsky C., Wanda S.-Y. C. Formation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide peroxide // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 12.— P. 6809—6817.
16. Умрихина А. В., Луганская А. Н., Красковский А. А. Светоиндуцированные сигналы ЭПР в водных растворах NADH и NADPH // Докл. АН СССР.— 1989.— 304, № 6.— С. 1485—1489.
17. Фотосинтез. Химические модели и механизмы / А. А. Ясников, А. И. Вовк, А. Б. Узиско и др.— Киев: Наук. думка, 1989.— С. 114—128.

Ин-т физики им. Б. И. Степанова АН БССР, Минск

Получено 01.11.90