

УДК 591.133:577.15:599.723.2

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЕЧЕНИ ЛОШАДИ ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА

Г.П. Лапина, Н.В. Золотарева

Тверской государственной университет

Изучены особенности ферментативной кинетики алкогольдегидрогеназы (АДГ) в присутствии фиксированной концентрации пирацетама, но при варьировании концентрации никотинамидадениндинуклеотида (НАД). На основе кинетических зависимостей рассчитаны и обсуждены важнейшие ферментативные показатели – максимальная скорость ферментативной химической реакции (V_{max}), константа Михаэлиса (K_m) и константа каталитическая ($K_{кат}$).

Ключевые слова: никотинамидадениндинуклеотид (НАД), алкогольдегидрогеназа (АДГ) печени лошади, каталитические параметры, константа Михаэлиса (K_m), константа каталитическая ($K_{кат}$), максимальная скорость (V_{max}), активация, эффектирование.

Алкогольдегидрогеназа – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующих процессы окисления никотинамидадениндинуклеотидом (НАД) первичных алифатических спиртов в соответствующие альдегиды. Имеющиеся в научной литературе данные об ингибиторах АДГ указывают на перспективность расширения круга соединений (особенно азотсодержащих органических веществ), способных действовать в качестве эффекторов фермента, а также разработки ферментативного метода определения их влияния на каталитические свойства фермента [1; 2; 9].

Наибольший интерес в последнее время вызывает фармакологический препарат пирацетам, оказывающий влияние на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы, но до конца не изученный. Фармакологические и физиологические характеристики ноотропного препарата пирацетам подробно описаны в [4; 7].

С целью выявления и создания оптимальных условий течения ферментативного процесса, катализируемого АДГ печени лошади, изучены особенности ферментативной кинетики в присутствии пирацетама при варьировании концентрации НАД. В [7] изучена аналогичная система, состоящая из пирацетама, этанола, АДГ и НАД, но лишь при одной концентрации НАД,

Цель работы – поиск оптимальных концентраций НАД для эффективного течения катализа АДГ печени лошади в системе, включающей пирацетам.

Методика. Для изучения каталитической реакции в спектрофотометрическую кювету помещали 0,1 мл пирацетама ($1,5 \cdot 10^{-2} M$),

0,1 мл раствора субстрата НАД ($0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $1,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $4,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$), 0,1 мл раствора субстрата этилового спирта ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$) 0,1 мл АДГ ($2,41 \cdot 10^{-4} \text{M}$). Содержимое кюветы быстро перемешивали и определяли оптическую плотность (D) при длине волны 345 нм в течение 5 мин через каждые 15 с на спектрометре «Specol». Контрольная кювета не содержала субстрата (субстрат заменяли бидистиллированной водой).

Ферментативная реакция сопровождается восстановлением НАД. Конечным продуктом ферментативной реакции является уксусный альдегид [3; 7; 11].

Объект исследования – фермент АДГ печени лошади – очищенный, гомогенный, коммерческий препарат фирмы «Reanal» (Венгрия).

Активность рассчитывали, исходя из данных изменения оптической плотности D во времени течения ферментативной реакции. Строили кинетические кривые (D – t) [6; 8; 10], на основе которых в рамках подхода Лайнуивера – Берка рассчитали ферментативные параметры: максимальную скорость ферментативной химической реакции (V_{max}), константу Михаэлиса (K_m) и константу каталитическую ($K_{\text{кат}}$).

Результаты и их обсуждение. Экспериментальная часть включала выполнение следующих этапов.

I этап. Определение кинетических параметров каталитической активности АДГ в системе сравнения, состоящей из АДГ ($2,41 \cdot 10^{-4} \text{M}$), НАД ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$) и $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$) в условиях pH 6,0 – **система 1**. Система 1 явилась системой контроля и подробно изучена и описана в [7].

II этап. Определение ферментативных параметров каталитической активности АДГ в системе, включающей фермент АДГ ($2,41 \cdot 10^{-4} \text{M}$), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$), парацетам ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$), при варьировании концентраций НАД ($0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $1,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, $4,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$) в условиях pH 6,0 – **система 2**.

Используя оценочный подход, подробно описанный в [7], получили первичные экспериментальные данные, а именно кривые D – t (рис. 1) при варьировании концентрации НАД, но при фиксированных концентрациях парацетама, АДГ, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

К полученным кинетическим кривым в области насыщения построена линия тренда. Это позволило провести экспериментальное определение одного из важнейших ферментативных показателей – максимальной скорости ферментативной химической реакции (V_{max}). Рассчитанные значения V_{max} и константы Михаэлиса (K_m) приведены в табл. 1.

Видно, что значение K_m определяется концентрацией НАД. Наибольшее значение выявлено при концентрации НАД, составляющей $0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$; наименьшее – при $4,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$. Характер изменений значений K_m – плавно убывающий с возрастанием концентрации НАД от $0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ до $4,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$.

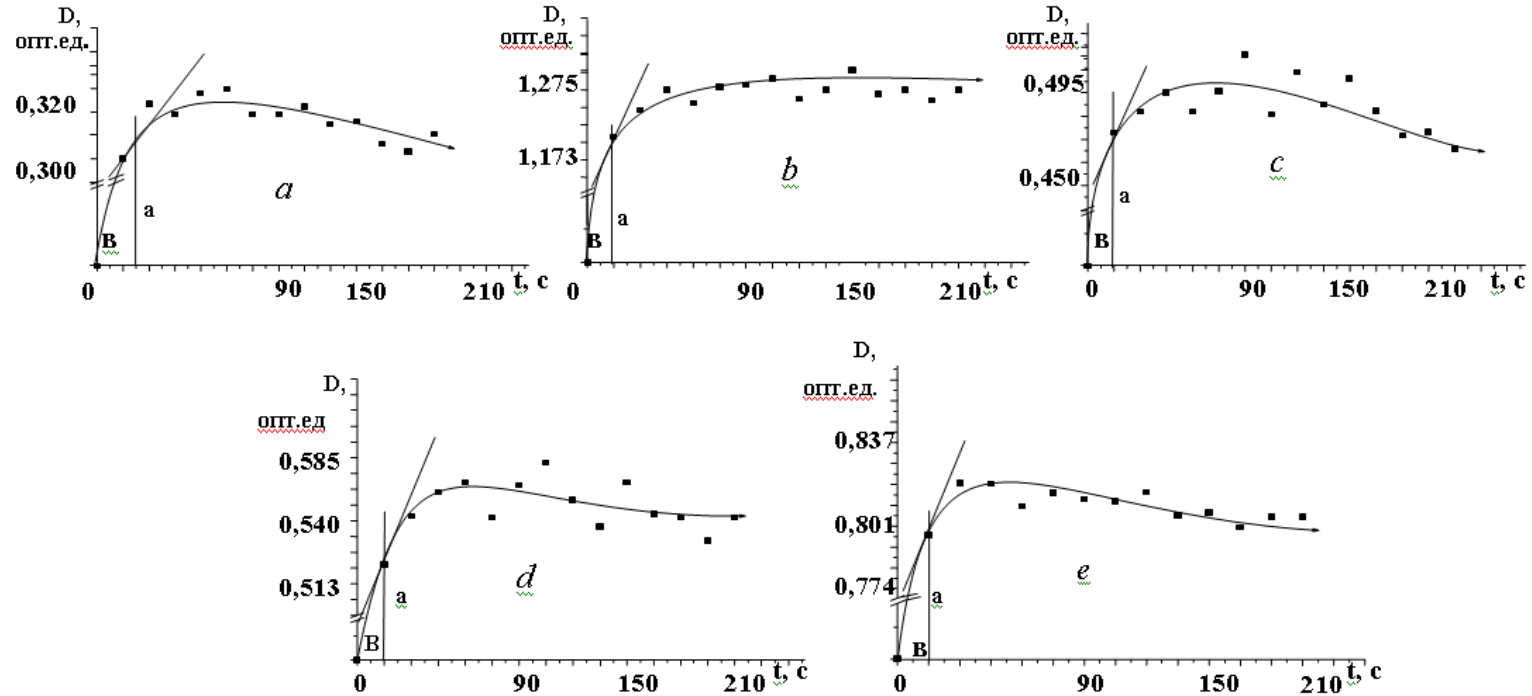


Рис.1. Зависимость оптической плотности (D) во времени (t) системы, содержащей АДГ ($2,41 \cdot 10^{-4} \text{M}$), пирацетам ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$) и НАД различных концентраций: а – $0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, б – $1,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$, в – $1,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, д – $2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, е – $4,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$, pH 6,0

Таблица 1

Важнейшие ферментативные параметры (V_{max} и K_m) системы, содержащей АДГ печени лошади ($2,41 \cdot 10^{-4}M$), парацетам ($1,5 \cdot 10^{-2}M$), C_2H_5OH ($1,5 \cdot 10^{-2}M$) с добавлением НАД различных концентраций, pH 6,0

Концентрация НАД, $\cdot 10^{-2}M$	D (при $t=15$ с)	D(при $t=135$ с)	ΔD	Δt , с	$\Delta D/\Delta t=V_{max}$, $\cdot 10^{-5}$ у.е.	K_m (при $V_{max}/2$), $\cdot 10^{-5}$ моль/л	$K_{m_{ср}}$, $\cdot 10^{-5}$ моль/л
0,5	0,3798	0,4067	0,0269	135	19,94	9,97	5,89 $\pm 0,00$
1,0	0,4445	0,4685	0,024	135	17,6	8,8	
1,5	0,4795	0,4904	0,0109	135	8,1	4,05	
2,5	0,5429	0,5626	0,0097	135	7,16	3,58	
4,5	0,7971	0,8055	0,0084	135	6,18	3,09	

Итак, оптимальное взаимодействие фермента с субстратом наблюдается для концентрации НАД, составляющей $4,5 \cdot 10^{-2}M$. Однако V_{max} достигает наибольшего значения для концентрации НАД, равной $0,5 \cdot 10^{-2}M$: концентрация НАД возрастает, а значения K_m и V_{max} равномерно уменьшаются.

Для большей детализации условий эффективного функционирования изучаемой ферментативной системы применили второй подход, подробно описанный в [7].

Обработка экспериментальных данных с использованием подхода, предложенного Лайнуивером – Берком, успешно применена в [7]. Полученные значения начальных скоростей (V_0) представлены в табл. 2.

Таблица 2

Рассчитанные значения начальных скоростей (V_0) ферментативных реакций для различных концентраций НАД в системе, содержащей АДГ печени лошади, парацетам, C_2H_5OH и НАД различных концентраций, pH 6,0

	Концентрация НАД, $\cdot 10^{-2}M$	V_0 , $\cdot 10^{-5}$ опт.ед./с
Система 1	0,5	5,98
	1,0	8,35
	1,5	10,9
	2,5	9,19
	4,5	11,33

Далее экспериментальные данные представили в координатах двойных обратных величин, откладывая по оси Y – $1/V_0$, а по оси X – $1/[S]$ (рис. 2).

На продолжении оси абсцисс прямая отсекает отрезок – $1/K_m$, численно равный $19,3 \cdot 10^3 M^{-1}$, а на оси ординат – отрезок $1/V_{max}$, численно равный $8,33 \cdot 10^3 M^{-1} \text{мин}$. Константу каталитическую ($K_{кат}$) вычисляли по формуле

$$K_{кат} = V_{max}/[E_0].$$

Рассчитали следующие значения K_m , $K_{кат}$, V_{max} в ферментативной системе 2 (рН 6,0), содержащей АДГ печени лошади ($2,41 \cdot 10^{-4}M$), пирацетам ($1,5 \cdot 10^{-2}M$), C_2H_5OH ($1,5 \cdot 10^{-2}M$) и НАД различных концентрации:

$$K_m = 5,01 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л};$$

$$V_{max} = 12 \cdot 10^{-5} \text{ опт.ед./с};$$

$$K_{кат} = 4,97 \cdot 10^{-1} \text{ с}^{-1}.$$

Обнаружена корреляция ферментативных параметров K_m и V_{max} , определенных по 1-му и 2-му подходам, а именно среднее значение K_m (моль/л), рассчитанное с использованием первого подхода, составило $5,89 \cdot 10^{-5} \pm 0,00$, второго подхода $5,01 \cdot 10^{-5} \pm 0,00$.

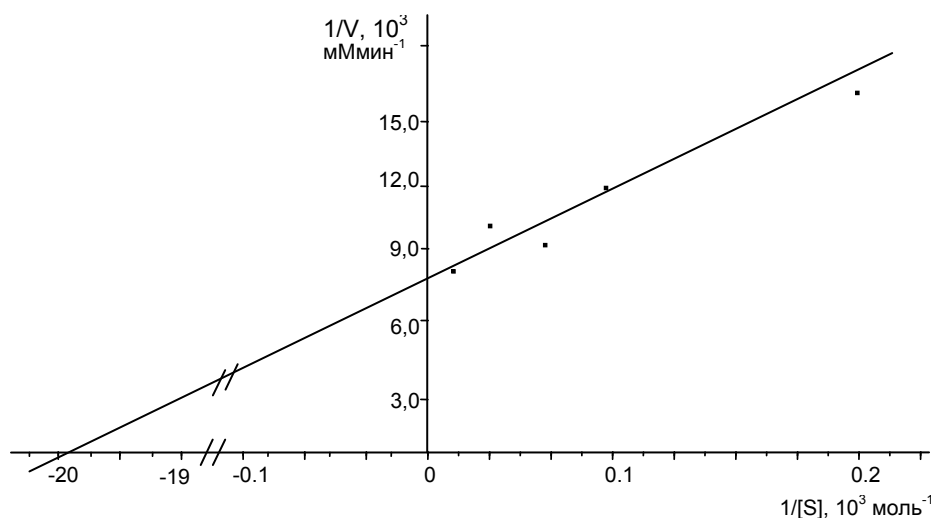


Рис. 2. Зависимость обратных величин начальных скоростей от обратных величин концентрации НАД для водного раствора АДГ ($2,41 \cdot 10^{-4}M$), рН 6,0

Итак, нами установлено, что для концентрации НАД, равной $5,01 \cdot 10^{-5}M$, достигаются оптимальные условия течения ферментативной реакции. Найдены эффективные соотношения концентрации всех компонентов в системе, содержащей АДГ печени лошади ($2,41 \cdot 10^{-4}M$), C_2H_5OH ($1,5 \cdot 10^{-2}M$), пирацетам, C_2H_5OH ($1,5 \cdot 10^{-2}M$), НАД ($5,01 \cdot 10^{-5}M$). Каталитические параметры в этой же ферментативной системе также оптимальны: $K_m = 5,01 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $V_{max} = 12 \cdot 10^{-5}$ опт.ед./с, при рН 6,0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилова Т.В., Егорова О.А., Новикова Т.В. Условия биосинтеза, выделение и свойства НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы // Биохимия. 2001. Т. 51, вып.10. С. 1673 – 1681.
2. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М., 1995.
3. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1994.

4. Лапина Г.П., Сметанникова Н.В. Регуляция активности алкогольдегидрогеназы печени лошади пирацетамом // Тез. докл. I Междунар. конф. «Состояние воды в биологических и модельных системах» / Гос. мед. академия. Тверь, 2007. С. 173.
5. Лапина Г.П., Золотарева Н.В. Регуляция активности алкогольдегидрогеназы печени лошади с использованием молекулярно-кинетических механизмов // Тез. докл. VII науч. конф. аспирантов и студентов хим. ф-та. Тверь, 2008. С. 45.
6. Лапина Г.П., Золотарева Н.В. Субстратная специфичность алкогольдегидрогеназы // Тез. докл. XVII Рос. молодеж. науч. конф., посвящен. 90-летию со дня рождения проф. В.А. Кузнецова. Екатеринбург, 2008. С. 165.
7. Лапина Г.П., Золотарева Н.В. Пирацетам – регулятор каталитической активности алкогольдегидрогеназы печени лошади. // Вестник ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2009. Вып. 11, №2. С. 56 – 62.
8. Рогожин В.В., Говорова Т.П. Очистка и некоторые свойства алкогольдегидрогеназы растений // Этанол и его метаболизм в высших организмах / Якут. ин-т биол. Якутск, 1995. С. 14 – 19.
9. Родионова Г.Е., Сметанникова Н.В. Изучение ферментативных параметров алкогольдегидрогеназы // Тез. докл. XVI Рос. молодеж. науч. конф. «Проблемы теоретической и экспериментальной химии», посвящ. 85-летию со дня рождения проф. В.П. Кочергина / Урал. гос. ун-т. Екатеринбург, 2006. С. 64.
10. Родионова Г.Е., Сметанникова Н.В. Ферментативные характеристики алкогольдегидрогеназы // Тез. докл. V науч. конф. аспирантов и студентов хим. ф-та, посвящ. 35-летию Твер. гос. ун-та. Тверь, 2006. С. 30.
11. Щорс Е.С., Либинзон Р.Е. Биохимические аспекты алкоголизма // Хим.-фарм. журн. 2003. №6. С. 3 – 13.

**OPTIMIZATION OF CURRENT FERMENTATIVNOY OF REACTION
WITH PARTICIPATION ALKOGOLDEGIDROGENASE A LIVER
OF A HORSE AT THE VARIATION OF CONCENTRATION
NIKOTINAMIDADENINDINUKLEONID**

G.P. Lapina, N.V. Zolotareva

The Tver State University

Are studied classical approach fermentative kinetics, as follows, are received and studied kinetic dependencies of the change to absorbances D at time t (had a standard type crooked with saturation) for system, including ADG, НАД and piracetam. In the field of saturation kinetic crooked is built lines trend and is calculated the most most important fermentativs to factors - a maximum velocities fermentative to chemical reaction (V_{max}), constants Mihaelisa (K_m) and constants catalytic (K_{kat}). They Are Found optimum for operating ADG condition of the using piracetam, which can serve the practical recommendation at treatment by sick chronic alcoholism.