

УДК 576.343:546.26.001.57

АНАЛИЗ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ УГЛЕРОДА В РЕАКЦИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ПИРУВАТА

А. А. ИВЛЕВ, Д. А. КНЯЗЕВ

(Кафедра неорганической и аналитической химии)

Путем анализа формальной кинетической схемы реакции ферментативного декарбоксилирования пирувата получено выражение эффективного коэффициента разделения. Для случаев, соответствующих лимитированию скорости протекания реакции стадией фермент-субстратного связывания и стадией декарбоксилирования, даны оценки интервалов variability эффективных коэффициентов разделения. Показано, что значительные вариации изотопного эффекта по карбоксильному углеродному атому, наблюдавшиеся в опытах *in vitro*, являются результатом проявления скоростьопределяющей роли одной из двух названных стадий.

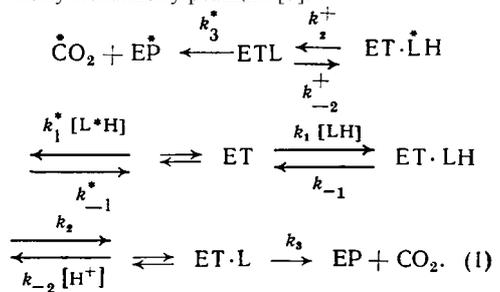
Изотопные эффекты углерода в реакции декарбоксилирования пирувата обуславливают неравномерное распределение изотопов углерода в живой клетке [5, 6]. Анализ изотопных эффектов углерода и оценка интервала их изменчивости необходимы для определения характера распределения изотопов и степени изотопной неоднородности молекул, участвующих в реакциях клетки.

В настоящей работе сделана попытка установить связь изотопных эффектов реакции ферментативного декарбоксилирования пирувата со стадийным механизмом ее протекания и на этой основе объяснить изменчивость значений изотопных эффектов, наблюдаемых в опытах *in vitro*. Дана численная оценка эффектов в частных случаях, отвечающих разным скоростьопределяющим элементарным стадиям, установлены границы их интервалов изменчивости и характер распределения изотопов углерода в продуктах реакции.

Молекула пирувата содержит три углеродных атома, изотопный состав которых может измениться в ходе декарбоксилирования. Изотопный эффект каждого из них может быть охарактеризован коэффициентом разделения α_e . Теоретические значения α_e сопоставлялись с экспериментальными (в опытах *in vitro*) по известному соотношению для кинетического изотопного эффекта [2].

Из-за простоты экспериментального выделения карбоксильного атома из молекулы пирувата изотопный эффект по нему изучен лучше. В результате исследований выявлен широкий спектр значений α_e — от 0,98 до 1,06 [13, 15, 16]. Данный интервал вари-

бельности существенно превышает значения возможных ошибок определения и указывает на вероятную связь α_e с различным вкладом элементарных стадий в общую скорость реакции. Чтобы выявить эту связь, рассмотрим общую последовательность элементарных стадий, соответствующую предполагаемому механизму реакции [7]:



Здесь ET — ферментсвязанный кофактор — тиаминпирофосфат (ТПФ); LH — пировиноградная кислота; L — пируват; EP — ферментсвязанный C_2 -фрагмент («активный» ацетальдегид).

На 1-й стадии, помеченной подстрочными индексами 1 и -1 , взаимодействуют пировиноградная кислота с ферментсвязанным ТПФ. На 2-й, помеченной подстрочными индексами 2 и -2 , происходит обратимое депротонирование связанной пировиноградной кислоты, при этом образуется пируват. Последний подвергается декарбоксилированию на 3-й стадии (подстрочные индексы 3 и -3), в этом случае образуются CO_2 и ферментсвязанный «активный» ацетальдегид.

Исходя из кинетической схемы (1), с помощью теории графов [1] получим следующий общий алгебраический вид эффективного коэффициента разделения изотопов:

$$\alpha_e = \frac{k_1 k_2 k_3^*}{k_1^* k_2^* k_3} \cdot \frac{k_2^* + k_{-1}^* k_{-2}^* [H^+]}{k_2 + k_{-1} k_{-2} [H^+]}, \quad (2)$$

который эквивалентен выражению

$$\alpha_e = \frac{k_1}{k_1^*} \cdot \frac{1 + \frac{k_{-1}^* [H^+]}{K_{II} k_3^*}}{1 + \frac{k_{-1} [H^+]}{K_{II} k_3}}, \quad (3)$$

где $K_{II} = \frac{k_2}{k_{-2}}$ — константа равновесия на 2-й стадии.

Решение выражений (2) и (3) в общем виде невозможно из-за отсутствия полного набора данных по константам скоростей. Поэтому рассмотрим изотопные эффекты в некоторых предельных частных случаях и по степени соответствия теоретических и экспериментальных значений попытаемся установить их связь с элементарными стадиями реакции.

Рассмотрим сначала случай, когда скорость всей реакции лимитируется *i*-й стадией, т. е. $k_{-1} \ll k_2$ и $k_{-2} \ll k_3$. Эффективный коэффициент разделения равняется при этом кинетическому изотопному эффекту на *i*-й стадии

$$\alpha_e = \frac{k_1}{k_1^*} = \alpha_{киз, i} \quad (4)$$

В отличие от общего случая (3) в уравнении (4) эффективный коэффициент разделения не зависит от pH.

В рамках теории абсолютных скоростей реакций [9] кинетический изотопный эффект определяется уравнением

$$\alpha_{киз, i} = \frac{\beta_{LH}}{\beta^*}, \quad (5)$$

где β_{LH} — Р-фактор исходного соединения (пирувата) представляет собой отношение приведенных сумм по состояниям изотопных форм пирувата, характеризующее способность атомов в молекуле накапливать тяжелый изотоп и определяемое выражением [3]

$$\beta_{LH} = \prod_i^{3N-6} \left(\frac{\nu_i}{\nu_i^*} \cdot \frac{Sh \frac{h c \nu_i}{2kT}}{Sh \frac{h c \nu_i^*}{2kT}} \right)_{LH}, \quad (6)$$

ν_i и ν_i^* — изотопные колебательные частоты молекул; h — постоянная Планка; k — постоянная Больцмана; c — скорость света; T — абсолютная температура; N — число атомов в молекуле. β — β -фактор пере-

ходного комплекса, равный произведению двух сомножителей

$$\beta^* = \beta_L^* \cdot \beta_{-L}^* \quad (7)$$

β_{-L}^* — β -фактор переходного комплекса с исключенным отношением сумм по состояниям, соответствующим координате реакции. Он рассчитывается как β -фактор обычной молекулы (6), но из произведения сомножителей, учитывающих вклад различных частот колебаний комплекса, исключается сомножитель, отвечающий частоте аperiодического колебания вдоль координаты реакции (направления превращающейся связи). Под знаком произведения оказывается в этом случае $3N^* - 7$ сомножителей.

β_L^* — исключенный из β^* сомножитель, отвечающий координате реакции. Согласно [9], он определяется уравнением

$$\beta_L^* = \frac{\nu_L^{**}}{\nu_L^*} \sqrt{\frac{\frac{1}{M_1^*} + \frac{1}{M_2}}{\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2}}}, \quad (8)$$

где ν_L^{**} и ν_L^* — изотопные частоты аperiодического колебания вдоль координаты реакции переходного комплекса; M_1 и M_2 — массы фрагментов на концах, в данном случае синтезируемой связи — соответственно массам пирувата и ферментсвязанного ТПФ.

Оценим изотопный эффект 1-й стадии по каждому углеродному атому. Металльный углеродный атом пирувата не принимает непосредственного участия в связывании с ТПФ, поэтому аperiодическая частота вдоль координаты реакции ν_L^* не зависит от его изотопного замещения, т. е. $\beta_L^{(1)*} = 1$ (верхний надстрочный индекс здесь и в дальнейшем указывает номер углеродного атома). По той же причине частоты колебаний в выражении (6), определяющие $\beta_{LH}^{(1)}$, совпадают с частотами колебаний переходного комплекса, определяющими $\beta_{-L}^{(1)*}$, и отношение $\beta_{LH}^{(1)}/\beta_{-L}^{(1)*}$ равно 1. С учетом (5) и (7) получим $\alpha_{киз, i}^{(1)} = 1$.

Карбонильный углеродный атом на 1-й стадии реакции принимает непосредственное участие в связывании с ферментом [10], которое происходит (схема 1) вдоль образующейся углеродной связи между ацильным атомом пирувата и ТПФ, при этом ацильная связь атома заменяется связью углерода с кислородом гидроксильной группы.

Учитывая, что $M_2 \gg M_1$, выражение (8) для $\beta_L^{(2)*}$ карбонильного атома можно записать

$$\beta_L^{(2)*} = \sqrt{\frac{M_1}{M_1^*}} = 0,995.$$

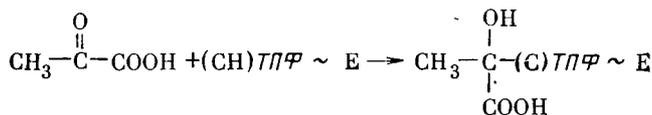


Схема 1.

Расчет отношения $\beta_{LH}^{(2)}/\beta_{-L}^{(2)*}$ для карбонильного атома возможен для двух предельных случаев.

Если переходный комплекс реагентоподобен, все множители, отвечающие частотам колебаний исходного соединения и переходного комплекса взаимно сокращаются и их отношение равно 1. Тогда значение $\alpha_{киз}^{(2)}$, $\alpha_{киз}^{(2)}$ определяется обратным значением $\beta_L^{(2)*}$ и соответственно равно 1,005.

Если переходный комплекс продуктоподобен, то значение в числителе рассматриваемого отношения будет соответствовать Р-фактору свободной пировиноградной кислоты, замещенной по ацильному атому, а соответствующее ему произведение, входящее в $\beta_{-L}^{(2)*}$ можно аппроксимировать β -фактором фрагмента переходного комплекса $CH_3-C(OH)-COOH$, причем множитель, соответствующий частоте образующейся связи C—C, в него не входит.

Р-фактор пировиноградной кислоты, замещенной по карбонильному атому, можно достаточно точно рассчитать, используя изотопные частоты [11]. Его величина оказалась равной 1,177. β -фактор фрагмента переходного комплекса из-за отсутствия необходимых спектральных данных можно рассчитать весьма приближенно, воспользовавшись инкрементным методом, предложенным в работе [4], приняв за опорное значение β -фактор пировиноградной кислоты.

Нетрудно убедиться, что значения $\beta_{-L}^{(2)*}$ и р-фактора фрагмента $CH_3C(OH)-COOH$ равны 1,136, а искомое отношение $\beta_{LH}^{(2)}/\beta_{-L}^{(2)*} = 1,036$. Разделив это отношение на β_L^* , получим, что в пределах погрешности метода расчета, которая в данном случае составляет $\pm 0,008$ от $|\beta-1$, кинетический изотопный эффект фермент-субстратного связывания по ацильному углеродному атому для продуктоподобного переходного комплекса $\alpha_{киз}^{(2)}$ характеризуется интервалом значений от 1,033 до 1,049. Тогда весь диапазон возможных значений $\alpha_{киз}^{(2)}$, $\alpha_{киз}^{(2)}$ составит от 1,005 до 1,049, что соответствует обогащению ацильного углерода образую-

¹ Все оценки здесь и в дальнейшем приводятся для малых степеней превращения пировата $F < 0,1$, когда изотопные различия между исходным субстратом и продуктом реакции максимальны [9].

щегося C_2 -фрагмента изотопом ^{14}C — от 5 до 49 ‰¹.

Карбоксильный атом углерода, по-видимому, принимает некоторое участие в связывании с ТПФ. В пользу этого свидетельствуют последующая депротонизация и отщепление карбоксильной группы, что требует предварительной ориентации и фиксации данной группы в поле фрагмента. Однако детальный механизм фермент-субстратного связывания пировата не изучен. В ориентированном в поле фермента фрагменте молекулы силовые постоянные и структура, определяющие изотопные сдвиги частот, будут иными, чем в свободной молекуле. Поэтому для карбоксильного атома можно ожидать появления в процессе связывания заметного вторичного кинетического изотопного эффекта. Однако способа оценки подобных эффектов пока нет, и в данном случае, приходится опираться на эмпирически установленный Бигеляйденем и Вольфбергом [11] диапазон значений вторичных изотопных эффектов по углероду — от 0,983 до 1,012, что не противоречит имеющимся экспериментальным данным [9].

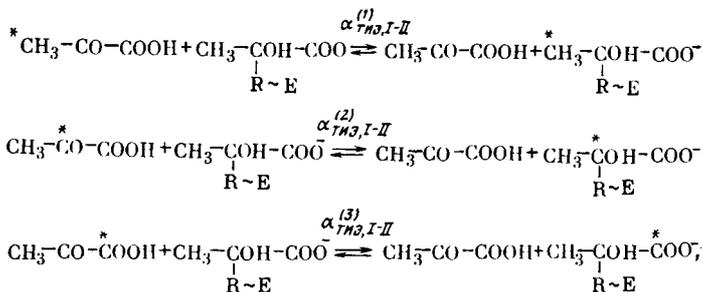
Итак, если скорость ферментативной реакции лимитируется стадией фермент-субстратного связывания, то возникающий при этом кинетический изотопный эффект приводит к обогащению карбонильного атома в образующемся C_2 -фрагменте («активном» ацетальдегиде) легким изотопом — в пределах от 5 до 49 ‰. Изотопный состав метильного атома практически не изменяется. В пределах погрешности оценки эффекта для карбоксильного атома пировата изотопный состав образующейся CO_2 может оказаться в пределах от +17 до —12 ‰.

Рассмотрим другой предельный случай, когда скорость ферментативной реакции контролируется стадией декарбоксилирования, а на стадиях фермент-субстратного связывания и депротонизации ферментсвязанного пировата устанавливается равновесие. т. е. $k_{-1} \gg k_3$ и $k_{-2}[H^+] \gg k_2$. Выражение для эффективного коэффициента разделения (2) в этом случае приводится к виду

$$\alpha_e = \frac{K_I}{K_I^*} \cdot \frac{K_{II}}{K_{II}^*} \cdot \frac{k_3}{k_3^*}, \quad (9)$$

$$\text{где } K_I = \frac{k_1}{k_{-1}}, \quad K_{II} = \frac{k_2}{k_{-2}},$$

$$\text{а } K_I^* = \frac{k_1^*}{k_{-1}^*}, \quad K_{II}^* = \frac{k_2^*}{k_{-2}^*}$$



где $R \sim E$ — ферментсвязанный ТПФ

Схема 2.

Отношение изотопных констант равновесия равно термодинамическому эффекту в реакциях межмолекулярного изотопного обмена между соответствующими атомами исходного и связанного с ТПФ пирувата (схема 2).

Выражение (9) можно представить в виде отношения кинетического коэффициента разделения изотопов на стадии декарбоксилирования (III) к термодинамическому коэффициенту, описывающему изотопный эффект на предшествующих стадиях (I—II)

$$\alpha_e = \frac{\alpha_{киз, III}}{\alpha_{тис, I-II}} \quad (10)$$

Оценим термодинамический изотопный эффект на первых двух стадиях по каждому из обменивающихся атомов.

Термодинамический коэффициент разделения $\alpha_{тис, I-II}^{(1)}$ для метильного углеродного атома равен 1, поскольку в процессе фермент-субстратного связывания и ионизации силовое поле метильной группы и ее структура, от которых зависят изотопные сдвиги частот, не затрагиваются.

Влиянием ионизации карбоксильной группы на α -фактор карбонильного атома можно пренебречь, поэтому в пирувате он будет таким же, как и в пировиноградной кислоте = 1,177). В ферментсвязанном пирувате β -фактор 2-го атома рассчитывается уже упоминавшимся инкрементным методом — $\beta^{(2)} = 1,182$. Тогда $\alpha_{тис, I-II}^{(2)}$ окажется равным 1,005, что находится в пределах погрешности расчета.

Термодинамический изотопный эффект по карбоксильному углеродному атому также складывается из равновесного эффекта фермент-субстратного связывания и эффекта ионизации карбоксильной группы. Последний, как следует из теоретических и экспериментальных данных, мал и приводит к незначительному обогащению углеродного атома в карбоксилат-ионе легким изотопом [13]. Эффект ионизации муравьиной кислоты ($\beta_{НСООН} = 1,175$, $\beta_{НСОО-} = 1,173$) составляет 2,3%. Незначительный изотопный эффект (2%) обнаружен при экспериментальном изучении ионизации бензойной кислоты [8]. Без большой погрешности эффект 2‰ можно принять и для ионизации пировиноградной кислоты.

Строгая оценка термодинамического изотопного эффекта фермент-субстратного связывания для карбоксильного атома пировиноградной кислоты, ориентированной в поле фермента, как и в случае кинетического изотопного эффекта, пока недоступна. Однако термодинамический изотопный эффект определяет предельные значения первичного и вторичного кинетических изотопных эффектов, соответствующие случаю продуктоподобного переходного комплекса. Так как предельные значения вторичного кинетического эффекта, приближенно оцененные в [11], составляют от 0,983 до 1,012, можно ожидать, что и значение термодинамического изотопного эффекта окажется в этих же пределах. Откуда с учетом изотопного эффекта ионизации термодинамический изотопный эффект по карбоксильному атому на 1-й и 2-й стадиях $\alpha_{тис, I-II}^{(3)}$ окажется в пределах от 0,985 до 1,014.

Оценим входящий в выражение (9) кинетический изотопный эффект на стадии собственно декарбоксилирования. Поскольку метильная группа участия в декарбоксилировании не принимает, $\alpha_{киз, III}^{(1)} = 1$.

Кинетический изотопный эффект по карбонильному и карбоксильному атомам пирувата является первичным и определяется согласно выражению

$$\alpha_{киз, III}^{(1)} = \frac{\beta_{ETL}^{(2,3)}}{\beta_L^{(2,3)} \cdot \beta_{-L}^{(2,3)*}} \quad (11)$$

где $\beta_{ETL}^{(2,3)}$ — β -фактор карбонильного или карбоксильного углеродного атома в ферментсвязанном пирувате. В знаменатель в соответствии с (7) входят множители, определяющие β -фактор переходного комплекса по карбонильному и карбоксильному углероду. $\beta_L^{(2,3)*}$ и $\beta_{-L}^{(2,3)*}$ имеют тот же смысл, что и раньше.

Так как карбонильный и карбоксильный углеродные атомы находятся на концах разрываемой связи и массы отщепляемых фрагментов различны, $\beta_L^{(2)*} = 1$, а $\beta_L^{(3)*} =$

$$= \sqrt{\frac{M_{1,2CO_2}}{M_{1,3CO_2}}} = 0,989.$$

Отношения $\frac{\beta_{ETL}^{(2)}}{\beta_{-L}^{(2)*}}$ и $\frac{\beta_{ETL}^{(3)}}{\beta_{-L}^{(3)*}}$ рассчитыва-

ли с использованием выражения (7). Предварительно были определены множители, входящие в (7) и отвечающие частотам колебаний исходной молекулы, которые сохраняются в числителе после сокращения одинаковых членов в β_{ETL} и β_{-L}^* . Для этого реагирующая молекула и фрагменты, на которые она распадается, были представлены в виде, изображенном на рис. 1 и 2. Если принять неизменяемые части реагирующей молекулы за точечные массы и обозначить их R_1 , R_2 и R_3 , то число ее колебаний будет равно $3N - 6 = 18$ ($N = 8$), а число колебаний двух образовавшихся после деструкции фрагментов — $2(3N - 6) = 12$ ($N = 4$). Следовательно, при деструкции исчезает 6 частот и соответственно 6 множителей остается в β_{ETL} . после сокращения — это частота, отвечающая валентному колебанию связи $C - C - v_Q$; частоты, отвечающие деформационным колебаниям углов $C - C - R_1 - v_\beta$; частота, отвечающая деформационному колебанию углов $C - C - O - v_\gamma$; частота крутильного колебания вокруг связи $C - C - v_\tau$ и частота выхода из плоскости угла $CCO - v_p$.

Поскольку изотопные частоты ферментсвязанной молекулы пирувата неизвестны, для определения отношения β_{ETL}/β_{-L}^* аппроксимировались аналогичными частотами из рассчитанного ранее спектра уксусной кислоты [7]. При этом углеродный атом, связанный с гидроксильной группой, и карбоксильный атом ферментсвязанного пирувата заменялись соответственно метильным и карбоксильным атомами уксусной кислоты. Замена фрагментов $R_1(CH_3)$, $R_2(OH)$ и $R_3(ТПФ-E)$ атомами водорода должна привести к искажению абсолютных значений рассматриваемых частот, главным об-

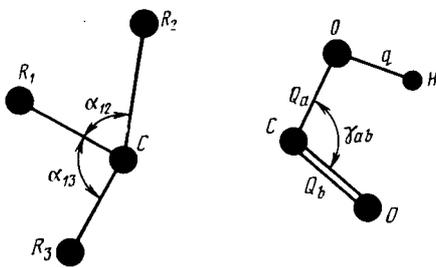


Рис. 1. Условное изображение реагирующей молекулы ферментсвязанного пирувата. R_1 — OH, R_2 — CH_3 , R_3 — ТПФ Е (смысл обозначений внутренних координат молекулы, характеризующих изменения валентных связей, углов и поворот вокруг C—C связи, ясен из рисунка).

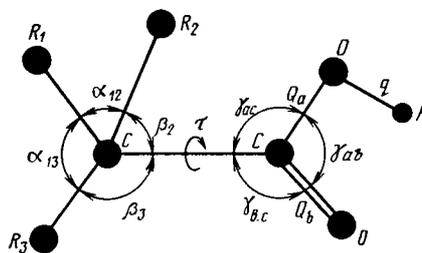


Рис. 2. Фрагменты реагирующей молекулы после деструкции. Обозначения те же, что на рис. 1.

разом деформационных ν_b . В то же время, как известно из практики расчетов [8], такая замена в гораздо меньшей степени скажется на относительных изотопных сдвигах частот, от которых в первую очередь зависят сомножители, определяющие β -фактор. Поэтому оценка искомых отношений β_{ETL}/β^*_{-L} несмотря на приближенность, должна быть верной.

С учетом сказанного по формам колебаний в спектре $\text{CH}_3\text{—COOH}$ были выделены соответствующие частоты и рассчитаны изотопные их сдвиги при замещении по метальному и карбоксильному атомам (таблица). По этим данным с помощью выражения (6) определены искомые отношения β_{ETL}/β^*_{-L} для каждого атома.

Для продуктоподобного состояния переходного комплекса, отвечающего максимальным значениям кинетического изотопного эффекта, значения β_{ETL}/β^*_{-L} составили 1,047 для карбонильного атома, 1,031 — для карбоксильного. Учитывая, что при упомянутой замене тяжелых фрагментов легкими водородными атомами абсолютные значения деформационных частот возрастают на 40—50 % и соответственно на 15—20 % увели-

чивается их вклад в рассчитываемое отношение (при тех же изотопных сдвигах частот), интервал вероятных значений

β_{ETL}/β^*_{-L} для карбонильного атома можно принять равным от 1,035 до 1,047, а для карбоксильного атома — от 1,025 до 1,031. Тогда, если учесть значения нижней граница кинетического изотопного эффекта для карбонильного атома $\alpha_{\text{киз}}^{(2)}$, III соот-

ветствующая реагентоподобному переходному комплексу, составит ~ 1 , а верхняя, соответствующая продуктоподобному комплексу, будет варьировать от 1,030 до 1,042. Для карбоксильного атома нижняя граница эффекта $\alpha_{\text{киз}}^{(3)}$, III составит $\sim 1,011$ (обратная величина $\beta_L^{(3)*}$), а верхняя будет варьировать от 1,036 до 1,042.

Эффективный коэффициент разделения реакции ферментативного декарбоксилирования пирувата, контролируемой стадией декарбоксилирования, с учетом полученных выше оценок $\alpha_{\text{тиз}}^{(2,3)}$ — II и $\alpha_{\text{киз}}^{(2,3)}$, III окажется в следующих пределах: для карбонильного атома нижняя граница эффекта будет находиться в интервале от 0,995 до 1, верхняя — от 1,030 до 1,042, для карбоксильного атома — соответственно от 0,996 до 1,025 и от 1,020 до 1,056.

Несмотря на большую погрешность в оценке $\alpha_e^{(2,3)}$ можно с достаточной определенностью утверждать, что в рамках рассмотренной кинетической схемы, если скорость реакции контролируется стадией декарбоксилирования, изотопные эффекты приводят к значительному обогащению легким изотопом карбонильного атома C_2 -фрагмента и образующейся CO_2 .

Обратимся к экспериментальным данным. Как отмечалось, наиболее изучен изотопный эффект по карбоксильному атому $\alpha_e^{(3)}$. В работе [13] рассматривалось декарбоксилирование пирувата, катализируемое тиаминном. По ряду соображений энергия активации деструкции комплекса в этом случае значительно выше, чем декарбоксилирования [13], т. е. стадия фермент-субстратного связывания является лимитирующей. Образующаяся при декарбоксилировании CO_2 обогащена ^{13}C , а рассчитанные значения $\alpha_e^{(3)}$ находятся в пределах от 0,989 до 0,995. Как следует из проведенного выше анализа, знак и значение эффектов полностью соответствуют теоретическим для данного механизма протекания реакции. От-

Частоты колебаний CH_3COOH , связанные с координатой разложения при декарбоксилировании и исчезающие в переходном комплексе при деструкции углеродной связи, и их изотопные смещения

Частота, см^{-1}	$\Delta\nu$ — смещение частоты при изотопном замещении атома	
	метильного	карбоксильного
$\gamma_Q^{A_1} = 824$	4,1	1,6
$\gamma_B^{A_1} = 1003$	8,7	1,1
$\gamma_B^{A_2} = 1009$	8,6	11,6
$\gamma_V^{A_1} = 561$	3,6	1,5
$\gamma_T^{A_2} = 94$	0	0
$\gamma_P^{A_1} = 637$	9,1	0,5

существование зависимости между изотопным эффектом и рН в изученной области значений (от 6,5 до 8,6) подтверждает тот факт, что реакция лимитируется фермент-субстратным связыванием.

При ферментативном декарбокслировании оксалосукцината на изоцитратдегидрогеназе с участием в качестве кофактора Mg^{2+} [17], где, как и в предыдущем случае, полагалось, что стадия фермент-субстратного связывания является лимитирующей, был обнаружен аналогичный изотопный эффект $\alpha_c^{(3)} = 0,988$. При изменении природы металла-кофактора знак эффекта менялся. Авторы объяснили это влиянием стадии декарбокслирования.

Противоположными по знаку и значительными по величине оказались изотопные эффекты по карбоксильному атому $\alpha_c^{(3)}$, возникающие при другом механизме протекания реакции, когда лимитирующей скоростью стадией являлось собственно декарбокслирование [13]. При декарбокслировании сложного соединения — хлористого 2 (1-карбоксии-1-гидроксиэтил)-3,4-диметилазолия, моделирующего комплекс пирувата с коферментом, обнаружено значительное обогащение образующейся CO_2 изотопом ^{12}C . Рассчитанный по экспериментальным данным $\alpha_c^{(3)}$ равнялся 1,052. Поскольку в силу условий эксперимента реакция была одностадийной, кинетический изотопный эффект декарбокслирования проявлялся в «чистом» виде. Аналогичные эффекты декарбокслирования ($\alpha_c^{(3)} = 1,056 \div 1,060$) установлены в опытах по ферментативному декарбокслированию оксалоацетата, катализируемого катионами трехвалентных металлов, в которых стадия декарбокслирования также была лимитирующей [17]. Полученные значения $\alpha_c^{(3)}$ находились в диапазоне от 1,050 до 1,060, который соответствовал теоретическому для данного механизма протекания реакции. Кроме того, в рассмотренных опытах, как и следует из теории, изотопный эффект не зависел от рН [13, 17].

Однако в большинстве работ, где изучалось ферментативное декарбокслирование, изотопные эффекты по карбоксильному углероду оказались в диапазоне от 1,002 до

1,015 [17, 19]. Значения эффектов свидетельствуют о том, что механизм декарбокслирования является промежуточным между двумя рассмотренными предельными случаями, он ближе к механизму, когда скорость лимитируется связыванием субстрата с коферментом. Об этом можно судить и по зависимости между эффектом и рН. При изменении рН от 5,0 до 7,5 эффекты снижались от 1,011 до 1,003 [13].

Как показали результаты определения изотопного состава металлического и карбоксильного атомов углерода в уксусной кислоте и CO_2 при разных степенях превращения пирувата [12], углерод CO_2 и карбонильный углеродный атом C_2 -фрагмента обогащены легким изотопом, при этом коэффициенты разделения составляли соответственно 1,0065 и 1,0140. Изотопный состав металлического углеродного атома C_2 -фрагмента практически не менялся. Небольшие значения эффективных коэффициентов разделения свидетельствуют о том, что стадия декарбокслирования лишь частично контролирует скорость реакции. На значительный вклад в общую скорость реакции стадии фермент-субстратного связывания указывает, как следует из приведенного анализа изотопных эффектов реакции, протекающей по первому механизму, и большая обогащенность карбонильного атома C_2 -фрагмента легким изотопом ($\alpha_c^{(2)'} = 1,0140$) по сравнению с углеродом CO_2 ($\alpha_c^{(3)} = 1,0065$).

Таким образом, результаты теоретического анализа, несмотря на приближенность оценок, согласуются с имеющимися экспериментальными данными о ферментативном декарбокслировании пирувата. Наблюдаемая широкая изменчивость изотопных эффектов в опытах *in vitro* является результатом проявления двух различных случаев лимитирования реакции. Близость предельно достижимых значений изотопных эффектов по карбоксильному атому свидетельствует о том, что границы интервалов варибельности изотопных эффектов по каждому атому определены приблизительно верно и могут быть использованы при проведении параметрических расчетов для изучения характера распределения изотопов в продуктах реакции при анализе изотопной неоднородности в метаболитах клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., К лесов А. А. Практический курс ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 2. Бродский А. И. Химия изотопов. — М.: АН СССР, 1957. — 3. Варшавский Я. М., Вайсберг С. Э. Термодинамические и кинетические особенности реакций изотопного обмена. — Успехи химии, 1957, т. 26, с. 1434—1457. — 4. Галимов Э. М. Природа биологического фракционирования изотопов. — М.: Наука, 1981. — 5. Ивлев А. А. Динамическая модель фракционирования изотопов углерода в живой клетке. — Биофизика, 1984, т. 29, с. 1018—1033. — 6. Ивлев А. А. Теоретический анализ связей состояний клетки и путей фракционирования изотопов углерода в процессах метаболизма. — Биофизика, 1985, т. 30, с. 88—92. — 7. Ивлев А. А., Королева М. Я., Галимов Э. М.

Термодинамические изотопные эффекты органических соединений. VI. Уксусная кислота, ацетальдегид, метиламин, метиловый спирт. — Журн. физ. химии, 1974, т. 48, с. 225—227. — 8. Ивлев А. А., Королева М. Я., Дементьев В. А. О связи точности расчета статистических сумм многоатомных молекул с точностью определения силовых постоянных. — Журн. физ. химии, 1974, т. 48, с. 2426—2429. — 9. Меландер Л., Соундерс У. Скорости реакций изотопных молекул. — М.: Мир, 1983. — 10. Пюльман Б., Пюльман А. Квантовая биохимия. — М.: Мир, 1965. — 11. Bigeleisen J., Wolfsberg M. — Adv. Chem. Phys., 1958, vol. I, p. 16—74. — 12. De Niro M., Epstein S. — Sci., 1977, vol. 197, p. 261—267. — 13. Jordan F., Kuo D. J., Monse E. U. — J. Am. Chem. Soc., 1978, vol. 100,

- p. 2872—2878. — **14.** H o l l e n s t e i n H., Akerman F., Quanthard Hs. H. — Spectrochimica Acta, 1978, vol. 34A, p. 1041—1063. — **15.** O'Leary M. H. — Biochim. Biophys. Res. Comm., 1976, vol. 73, p. 614—620. — **16.** O'Leary M. N. — Phytochemistry, 1981, vol. 73, p. 553—567. — **17.** O'Leary M. N., Limberg J. A. — Biochemistry, 1977, vol. 16, p. 1129—1135. — **18.** O'Leary M. N., P i a z z G. G. — Biochemistry, 1981, vol. 20, p. 2743—2748. — **19.** O'Leary M. N., Richards D. T., Hendrickson D. N. — J. Am. Chem. Soc., 1970, vol. 92, p.4435—4440.

Статья поступила 11 июня 1986 г.

SUMMARY

By analysing formal kinetic scheme of pyruvat fermentative decarboxylation reaction the expression of effective separation coefficient is obtained. For the cases which correspond to limiting the rate of the reaction by its ferment-substrate binding stage and by decarboxylation stage, the variability intervals of efficient separation coefficients were estimated. It is shown that considerable variations in isotopic effect by carboxyl carbon atom which were observed in experiments in vitro are the result of the rate-determining role of one of the two stages mentioned above. In each case the nature of carbon isotopes distribution in products of the reaction — C₂-fragments (active-acetaldehyde) and CO₂ — was analysed.