

УДК 577. 152. 121.

ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАДМОЛЕКУЛЯРНОГО КЛАСТЕРА «АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА–ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА» С МЕМБРАНОЙ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

Соловьева А.Г., Уланова А.А., **Зимин Ю.В.***ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»
Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: sannag5@mail.ru*

Биологическая роль различных ферментов митохондрий может в значительной степени определяться их способностью к связыванию с мембраной, приводя к существенным изменениям структурных и регуляторных особенностей энзимов клетки. Целью данной работы явилось изучение каталитических и кинетических свойств лактатдегидрогеназы (ЛДГ), алкогольдегидрогеназы (АДГ) и комплекса АДГ-ЛДГ митохондрий печени крыс, а также исследование сил электростатического взаимодействия ферментативного комплекса с мембраной митохондрий. В работе были использованы крысы самцы линии Wistar. Активность и кинетические свойства АДГ и ЛДГ определяли в митохондриальной фракции печени крыс. Митохондрии получали методом дифференциального центрифугирования. Для оценки взаимодействия ферментов с мембраной проводилась солиubilизация мембраносвязанных форм ЛДГ, АДГ путем суспендирования митохондрий в 0,15 М NaCl. Показано, что преобладающее количество общей суммарной активности ЛДГ, АДГпр, кластера ЛДГпр-АДГпр интактных животных приходится на лабильно связанную с мембраной форму фермента (солиubilизат). Для АДГобр, надмолекулярного комплекса ЛДГобр-АДГобр крыс выявлено преобладание прочно связанных с мембраной форм ферментов. До солиubilизации и в солиubilизате в составе кластера отмечено снижение удельной активности лактатдегидрогеназы как в прямой, так и в обратной реакциях, увеличение активности АДГпр и АДГобр по сравнению с односубстратными реакциями. Для односубстратных реакций ферментов и энзимов гетерогенной системы (АДГ-ЛДГ) выявлены изменения кинетических характеристик ЛДГ и АДГ, которые приводят к смещению направленности метаболизма митохондрий.

Ключевые слова: митохондрии, мембраны, печень, надмолекулярный кластер, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа

ASSESSMENT OF THE INTERACTION OF THE SUPRAMOLECULAR CLUSTER «ALCOHOLE-LACTATE DEHYDROGENASE» WITH THE MEMBRANE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

Soloveva A.G., Ulanova A.A., **Zimin Y.V.***Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedic Russian Ministry
of Health, Nizhny Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru*

The biological role of different mitochondrial enzymes may be largely determined by their ability to bind to the membrane, leading to significant changes in structural and regulatory features of the cell enzymes. The aim of this work was to study the catalytic and kinetic properties of lactate dehydrogenase (LDH), alcohol dehydrogenase (ADH) and the ADH-LDH complex of rat liver mitochondria, and the study of electrostatic interactions of the enzymatic complex with the membrane of the mitochondria. In male rats were used line Wistar. The activity and kinetic properties of ADH and LDH was determined in the mitochondrial fraction of rat liver. The mitochondria were obtained by differential centrifugation. To assess the interaction with the enzyme membrane solubilization of membrane-bound forms carried LDH ADH mitochondria by suspending in 0.15 M NaCl. It is shown that the vast amount of total of total activity LDH, ADHpr, cluster-LDHpr ADHpr intact animals account for loosely associated with the membrane form of the enzyme (solubilize). For ADHobr, supramolecular complex LDHobr-ADHobr rats revealed predominance firmly membrane-bound forms of the enzymes. Prior to solubilization and solubilize in the cluster decreased the specific activity of lactate dehydrogenase in both forward and reverse reactions, increased activity and ADHpr ADHobr compared with odnosubstratnymi reactions. For odnosubstratnyh reactions of enzymes and enzymes heterogeneous system (ADH-LDH) revealed changes in the kinetic characteristics of LDH and ADH, leading to a shift in focus of mitochondrial metabolism.

Keywords: mitochondria, membranes, liver, supramolecular cluster, alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase

Митохондрии являются важнейшими внутриклеточными структурами, определяющими функционирование клеток млекопитающих в норме и при патологии. Уникальная способность митохондрий к поддержанию гомеостаза обеспечивается рядом их свойств, среди которых матричность, эластичность, связанная с характерным только для мембран митохондрий специализированным белковым составом.

Согласно литературным данным, мембранные ферменты функционируют в со-

ставе биомембран в виде сложных надмолекулярных ансамблей, что может приводить к проявлению ими особых свойств, не реализующихся в гомогенных водных растворах. Многие ферменты плазматических мембран животных клеток способны переходить из мембраносвязанной формы в «растворимую». Функционирование мембранных ферментов зависит от локального окружения и определяется их взаимодействием с липидными и белковыми компонентами мембран [1]. Контролируемая ме-

таболитами обратимая адсорбция энзимов на мембранах органелл расширяет регуляторные возможности клетки [13]. Биологическая роль различных мембранных ферментов может в значительной степени определяться их способностью к связыванию с мембраной, приводя к существенным изменениям особенностей строения и функционирования энзимов.

Проводились эксперименты по включению одного из ключевых ферментов биотрансформации печени алкогольдегидрогеназы (АДГ) в искусственные мембраны. Показано, что увеличение количества АДГ, связанной на единицу массы носителя, сопровождается снижением её активности, причиной которого являются возникающие диффузионные затруднения, препятствующие доступу субстратов к активным центрам фермента [11]. Имеются доказательства тесной метаболической связи между обменами субстратов и продуктов алкогольдегидрогеназной и лактатдегидрогеназной реакций: этанол-ацетальдегид и лактат-пируват [5].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) как фермент гликолиза играет важную роль в регуляции энергетического обмена клетки и способна взаимодействовать с мембранами субклеточных органелл [9]. Существуют сведения о связи лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы в условиях *in vitro* [7; 14]. Однако в настоящее время отсутствуют какие-либо представления о роли функционального взаимодействия ЛДГ-АДГ в составе надмолекулярного кластера с мембранами митохондрий печени в эксперименте.

Целью данной работы явилось изучение каталитических и кинетических свойств ЛДГ, АДГ и комплекса АДГ-ЛДГ митохондрий печени крыс, а также исследование сил электростатического взаимодействия ферментативного комплекса с мембраной митохондрий.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на 15 крысах самца линии Wistar массой 180–200 г, содержащихся в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Исследование активности и кинетических свойств ЛДГ и АДГ проводили в митохондриальной фракции печени животных, которую получали методом дифференциального центрифугирования на центрифуге Multifuge 1 S-R [6]. Для оценки взаимодействия ферментов с мембраной проводилась солиubilизация мембраносвязанных форм ЛДГ, АДГ путем суспендирования митохондрий в 0,15 М NaCl, pH 6,0 [12].

Активность ЛДГ определяли с использованием в качестве субстрата молочной кислоты (прямая реакция, ЛДГпр) и пировиноградной кислоты (обратная реакция, ЛДГобр) [3]. Исследование активности АДГ осуществляли с использованием в качестве субстрата этилового спирта (прямая реакция, АДГпр) и ацетальдегида (обратная реакция, АДГобр) по M. Koivusalo

et al. (1989) [10]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури в модификации [8]. Оценку каталитических и кинетических свойств ферментов в надмолекулярной системе (АДГ-ЛДГ) проводили путем одновременного внесения в пробу субстратов для лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы.

Для определения кинетических констант АДГ и ЛДГ реакций использовали полную кривую накопления продуктов реакции (V от t). Используя математический метод, рассчитывали кинетические параметры ферментативной реакции (K_i , V_{max} , K_n , K_d , K_a) в гетерогенной системе, где K_i – время полупревращения субстрата (усл.ед.); V_{max} – максимальная скорость реакции (усл.ед.); K_a – коэффициент каталитической эффективности (усл.ед.); K_n – коэффициент кооперативности ферментативной реакции (усл.ед.); K_d – коэффициент структурных изменений фермента (усл.ед.) [2]. Характер ингибирования и активации ферментов определяли по В.И. Круляню (1990) [4].

Результаты исследований обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с помощью программы Statistica 6.0. При расчете t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом.

Результаты исследования и их обсуждение

Использование 0,15 М раствора NaCl с целью изменения сил электростатического взаимодействия ферментативного комплекса с мембраной митохондрий показало, что 65 % суммарной активности ЛДГпр интактных животных приходится на лабильно связанную с мембраной форму фермента (солюбилизат), тогда как 35 % суммарной активности ЛДГпр прочно связаны с мембранами митохондрий (после солиubilизации). Аналогичное распределение активности выявлено для АДГпр и комплекса ЛДГпр-АДГпр: преобладающее количество общей активности АДГпр (53 %), кластера ЛДГпр-АДГпр (63 %) отмечено в солиubilизате, 47 % АДГпр и 37 % комплекса – прочно связаны с мембранами (рис. 1). Согласно литературным данным, изменение способности белков к связыванию с мембраной может сопровождаться существенными преобразованиями в строении и в функционировании энзимов [1].

Выявлено, что у животных в обратной реакции преобладает лабильно связанная с мембраной форма лактатдегидрогеназы (57%). Иная картина характерна для АДГобр крыс, при которой подавляющее количество фермента находится в связанном с мембранами состоянии (78%), и лишь 22 % суммарной активности АДГобр приходится на лабильно связанную форму фермента. Для комплекса ЛДГобр-АДГобр интактных животных выявлено преобладание прочно связанных (57%) форм энзима над лабильными (43%) (рис. 1). Перерас-

пределение ферментов между «свободными» и связанными с мембранами формами в комплексе, вероятно, связано с модификацией структуры мембран.

Удельная активность ЛДГпр в митохондриальной фракции печени до солюбилизации в составе кластера АДГпр-ЛДГпр статистически значительно уменьшилась в 2,6 раза, удельная активность АДГпр, наоборот, увеличилась в 5,6 раза по сравнению с активностью ферментов в односубстратных реакциях (рис. 2). Изменение каталити-

ческих свойств ЛДГ в составе кластера до солюбилизации обусловлено изменением кинетических характеристик фермента: статистически значимо возросло K_t в 3,2 раза, отмечено снижение каталитической эффективности ЛДГпр надмолекулярного комплекса (табл. 1). Выявлен механизм, посредством которого происходит снижение активности ЛДГпр, – смешанное ингибирование. Повышение активности АДГпр в составе кластера обусловлено двухпараметрически рассогласованной активацией [4].

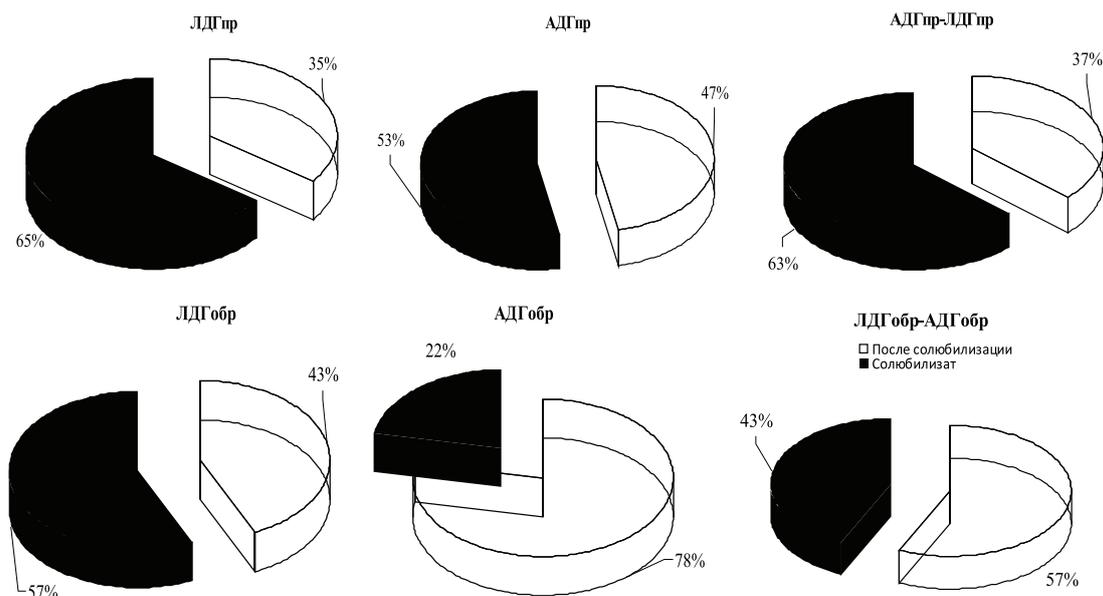


Рис. 1. Распределение общей активности (нмоль НАДН/мин) ЛДГ, АДГ и их комплексов в митохондриях печени крыс до и после солюбилизации

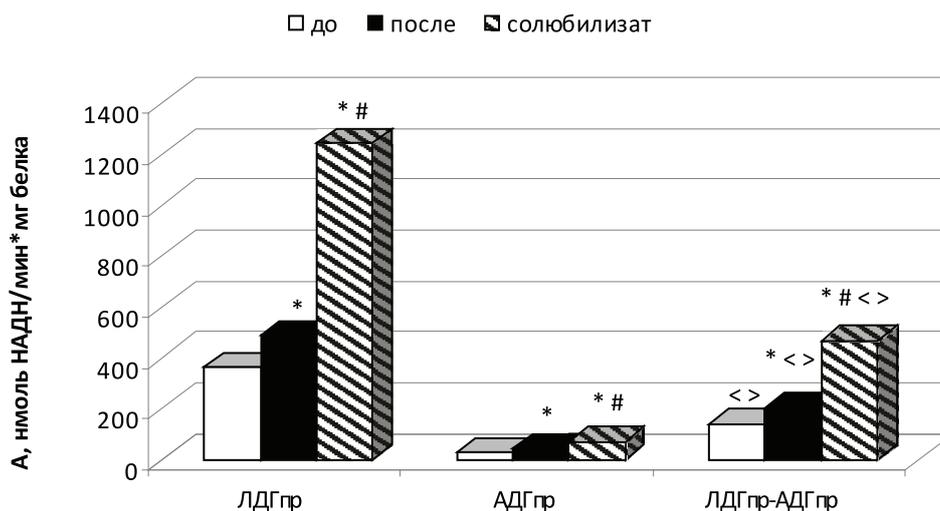


Рис. 2. Удельная активность лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы и комплекса ЛДГпр-АДГпр в митохондриальной фракции печени крыс до и после солюбилизации.

Примечания: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с активностью до солюбилизации; # – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с активностью после солюбилизации; <> – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к АДГпр; > – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к ЛДГпр

Полученные результаты показали, что удельная активность прочно связанных форм ЛДГпр в митохондриальной фракции печени (после солюбилизации) в составе кластера АДГпр-ЛДГпр статистически значимо уменьшилась в 2,4 раза, удельная активность АДГпр, наоборот, возросла в 4,6 раза по сравнению с активностью ферментов в односубстратных реакциях (рис. 2). Снижение активности ЛДГпр происходило по типу псевдоингибирования, повышение активнос-

сти АДГпр – по типу двухпараметрически рассогласованной активации. Выявлено понижение сродства и каталитической эффективности ЛДГпр кластера соответственно в 16 и 3,3 раза по сравнению с кинетическими характеристиками лактатдегидрогеназы в прямой реакции. Отмечено повышение коэффициента кооперативности и коэффициент структурных изменений АДГпр в составе ЛДГпр-АДГпр в 1,3 и 1,2 раза соответственно (таблица).

Кинетические свойства лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и кластера АДГ-ЛДГ в митохондриальной фракции печени крыс до и после солюбилизации

Показатели, (усл.ед.)	Условия эксперимента	ЛДГ		АДГ		АДГ-ЛДГ	
		ЛДГпр	ЛДГобр	АДГпр	АДГобр	АДГпр-ЛДГпр	АДГобр-ЛДГобр
V _{max}	Досолюбилизации	11,04 ± 0,58	12,02 ± 0,05	1,62 ± 0,09	3,75 ± 0,19	9,67 ± 0,51&^	50,75 ± 2,68&^
	После солюбилизации	10,53 ± 0,56	8,48 ± 0,45	1,22 ± 0,07	7,74 ± 0,41	51,22 ± 2,70&^	25,56 ± 1,35&^
	Солюбилизат.	22,53 ± 1,19*#	5,63 ± 0,29*#	2,32 ± 0,12*#	2,58 ± 0,14*#	8,37 ± 0,44&^*#	11,21 ± 0,59&^*#
K _a	До солюбилизации	8,55 ± 0,45	9,65 ± 0,51	0,54 ± 0,029	4,27 ± 0,23	2,34 ± 0,12&^	6,20 ± 0,33 &^
	После солюбилизации	5,89 ± 0,32	5,32 ± 0,28	0,49 ± 0,03	2,36 ± 0,12	1,77 ± 0,09&^	5,87 ± 0,31^
	Солюбилизат	10,22 ± 0,54*#	12,2 ± 0,64*#	0,37 ± 0,02*#	0,83 ± 0,04*#	3,84 ± 0,20&^*#	5,03 ± 0,27&^*#
K _n	До солюбилизации	0,78 ± 0,05	0,78 ± 0,05	0,87 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,90 ± 0,05&	0,95 ± 0,05&^
	После солюбилизации	0,82 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,86 ± 0,05	1,22 ± 0,06	0,98 ± 0,05&^	0,91 ± 0,05&^
	Солюбилизат	0,84 ± 0,05	0,66 ± 0,03*#	1,09 ± 0,06*#	1,24 ± 0,07*	0,84 ± 0,05^#	0,85 ± 0,05&^*
K _d	До солюбилизации	1,56 ± 0,08	1,54 ± 0,09	1,75 ± 0,09	1,47 ± 0,08	1,81 ± 0,09&	1,89 ± 0,10&^
	После солюбилизации	1,64 ± 0,09	1,61 ± 0,08	1,71 ± 0,09	2,44 ± 0,13	1,97 ± 0,10&^	1,81 ± 0,10&^
	Солюбилизат	1,69 ± 0,09	1,32 ± 0,07*#	2,19 ± 0,12*#	2,47 ± 0,13*	1,69 ± 0,09^*	1,69 ± 0,08&^*
K _t	До солюбилизации	1,29 ± 0,07	1,25 ± 0,07	2,99 ± 0,16	0,88 ± 0,05	4,14 ± 0,22&^	8,18 ± 0,43&^
	После солюбилизации	1,79 ± 0,09	1,59 ± 0,09	2,50 ± 0,13	3,29 ± 0,17	29,0 ± 1,53 &^	4,35 ± 0,23&^
	Солюбилизат	2,20 ± 0,12*#	0,46 ± 0,03*#	6,31 ± 0,33*#	3,12 ± 0,16*	2,18 ± 0,11^*#	2,23 ± 0,12&^*#

Примечания: & – статистически значимые различия при p < 0,05 по отношению к группе ЛДГ; ^ – статистически значимые различия при p < 0,05 по отношению к группе АДГ; * – статистически значимые различия при p < 0,05 по отношению к группе ЛДГ, АДГ и ЛДГ-АДГ до солюбилизации; # – статистически значимые различия при p < 0,05 по отношению к группе АДГ, ЛДГ и ЛДГ-АДГ после солюбилизации.

Удельная активность и каталитическая эффективность лабильно связанных форм ЛДГпр в митохондриальной фракции печени (солюбилизат) у интактных животных в составе кластера АДГпр-ЛДГпр статистически значимо уменьшились в 2,7 раза, удельная активность АДГпр, наоборот, увеличилась в 6,9 раза по сравнению с активностью ферментов в односубстратных реакциях. Возросли также показатели K_n, K_d АДГпр надмолекулярного кластера АДГпр-ЛДГпр в 1,3 раза. Установлен механизм, посредством которого происходит снижение активности ЛДГпр, – неконкурентное

ингибирование. Повышение активности алкогольдегидрогеназы в прямой реакции в составе кластера обусловлено двухпараметрически согласованной активацией [4].

Показано, что использование 0,15 М раствора NaCl вызывает статистически значимое повышение удельной активности односубстратной ЛДГпр, АДГпр в солюбилизате в 3,4 и 2,8 раза соответственно по сравнению с активностью ферментов до солюбилизации. Удельная активность ЛДГпр, АДГпр митохондрий после солюбилизации возросла в 1,3 и 1,8 раза по сравнению с активностью энзимов до солюбилизации. Вы-

явлены статистически значимые отличия активности между прочно и лабильно связанными формами ЛДГ пр и АДГ пр. Удельная активность ЛДГ пр, АДГ пр солюбилизата выше в 2,5 и 1,5 раза соответственно по сравнению с активностью прочно связанных с мембраной ферментов.

Активность надмолекулярного кластера ЛДГ пр-АДГ пр в солюбилизате, во фракции митохондрий после солюбилизации статистически значимо повысилась в 3,4 и 1,5 раза по сравнению с активностью комплекса до солюбилизации. Удельная активность лабильно связанной формы кластера ЛДГ пр-АДГ пр выше активности прочно связанного с мембраной комплекса ферментов в 2,3 раза.

Выявлено, что удельная активность ЛДГобр в митохондриальной фракции печени до солюбилизации у интактных жи-

вотных в составе кластера АДГобр-ЛДГобр статистически значимо не отличается от активности односубстратной реакции ЛДГобр. Удельная активность, каталитическая эффективность, значения коэффициентов K_m , K_d АДГобр статистически значимо увеличились в 2,4; 1,5; 1,3; 1,3 раза по сравнению с каталитическими и кинетическими свойствами фермента в односубстратной реакции (рис. 3; таблица). Повышение активности АДГобр обусловлено двухпараметрически рассогласованной активацией.

После солюбилизации удельная активность ЛДГобр и АДГобр в митохондриальной фракции печени крыс в составе кластера АДГобр-ЛДГобр статистически значимо увеличилась соответственно в 1,4 и 1,6 раза по сравнению с активностью ферментов в односубстратных реакциях по типу двухпараметрически рассогласованной активации.

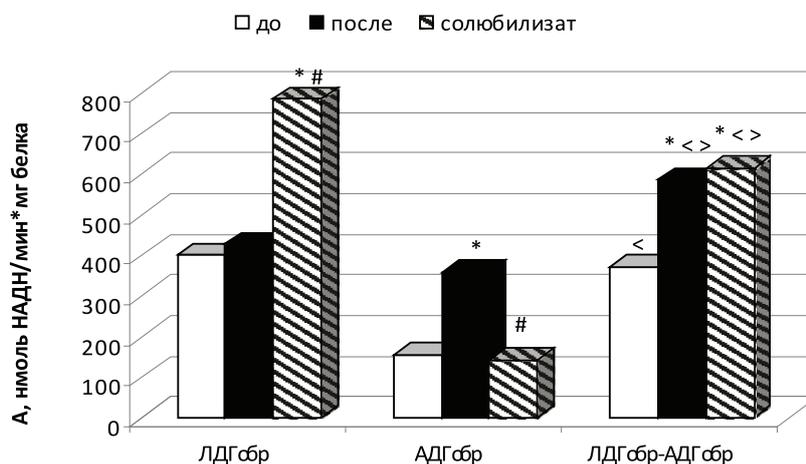


Рис. 3. Удельная активность лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы и комплекса ЛДГобр-АДГобр в митохондриальной фракции печени крыс до и после солюбилизации. Примечания: * – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с активностью до солюбилизации; # – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по сравнению с активностью после солюбилизации; < – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к АДГобр; > – статистически значимые различия при $p < 0,05$ по отношению к ЛДГобр

Удельная активность лабильно связанных форм ЛДГобр в митохондриальной фракции печени (солюбилизат) у интактных животных в составе кластера АДГобр-ЛДГобр статистически значимо уменьшилась в 1,3 раза, удельная активность АДГобр, наоборот, увеличилась в 4,4 раза по сравнению с активностью ферментов в односубстратных реакциях (рис. 2). Отмечено снижение каталитической эффективности и сродства ЛДГобр кластера ЛДГобр-АДГобр в 2,4 и 4,8 раза соответственно. Каталитическая эффективность АДГобр комплекса и сродство фермента к субстрату возросли в 6,03 и 1,4 раза (таблица). Выявлен механизм, посредством

которого происходит снижение активности ЛДГобр, – псевдоингибирование. Повышение активности алкогольдегидрогеназы в обратной реакции в составе кластера обусловлено двухпараметрически согласованной активацией [4].

Полученные результаты показали, что после солюбилизации происходит повышение удельной активности односубстратной лабильно связанной ЛДГобр в 1,9 раза по сравнению с активностью фермента до солюбилизации. Выявлены статистически значимые отличия активности между прочно и лабильно связанными формами ЛДГобр: удельная активность ЛДГобр солюбилизата выше в 1,8 раза.

Удельная активность АДГобр митохондрий после солюбилизации возросла в 2,3 раза по сравнению с активностью энзима до солюбилизации. Полученные результаты показали, что удельная активность прочно связанной односубстратной АДГобр статистически значимо выше в 2,5 раза по сравнению с лабильно связанной формой АДГобр.

После солюбилизации активность прочно и лабильно связанных фракций надмолекулярного комплекса ЛДГобр-АДГобр также возросла в 1,6 и 1,7 раза по сравнению с активностью кластера до солюбилизации (рис. 3).

Таким образом, использование 0,15 М раствора NaCl показало, что преобладающее количество общей суммарной активности ЛДГпр, АДГпр, ЛДГобр, кластера ЛДГпр-АДГпр интактных животных приходится на лабильно связанную с мембраной форму фермента (солюбилизат). Для АДГобр, надмолекулярного комплекса ЛДГобр-АДГобр крыс выявлено преобладание прочно связанных с мембраной форм энзимов.

До солюбилизации и в солюбилизате в составе кластера отмечено снижение удельной активности лактатдегидрогеназы как в прямой, так и в обратной реакциях, увеличение активности АДГпр и АДГобр по сравнению с односубстратными реакциями.

Показано, что после солюбилизации мембранносвязанных ферментов удельная активность ЛДГ, АДГ и их комплексов во фракциях прочно и лабильно связанных с мембранами ферментов возрастает по сравнению с активностью до солюбилизации. Для односубстратных реакций ферментов и энзимов гетерогенной системы (АДГ-ЛДГ) выявлены изменения кинетических характеристик лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы, которые приводят к смещению направленности метаболизма клетки.

Т.о., в условиях внутриклеточного окружения ЛДГ и АДГ образуют кластерный надмолекулярный комплекс, в различной степени связанный с мембранами митохондрий. Каталитически активная конформация ферментов может в значительной степени формироваться мембраной. При связывании ЛДГ и АДГ с мембраной формируется оптимальное микроокружение, обеспечивающее нативную конформацию и каталитическую активность ферментов.

Список литературы

1. Гринштейн С.В., Кост О.А. Структурно-функциональные особенности мембранных белков // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 77–104.
2. Зимин Ю.В., Соловьева А.Г., Уланова А.А. Оценка кинетических параметров ферментов в гетерогенной надмолекулярной системе // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 2. – С. 68–71.
3. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
4. Крупянко В.И. Векторный метод представления ферментативных реакций. – М.: Наука, 1990. – 146 с.

5. Сатановская В.И. Система обмена этанола и ацетальдегида печени крыс при развитии толерантности к этанолу // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1990. – Т. С1Х, № 2. – С. 161–162.
6. Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы: пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
7. Chaubey A., Gerard M., Singh V.S., Malhotra B.D. Immobilization of lactate dehydrogenase on tetraethylorthosilicate-derived sol-gel films for application to lactate biosensor // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2001. – Vol. 96, № 1–3. – P. 293–301.
8. Dawson J.M., Heatlic P.L. Lowry method of protein quantification Evidence for Photosensitivity // Anal. Biochem. – 1984. – Vol. 140, № 2. – P. 391–393.
9. De Bari L., Chieppa G., Marra E., Passarella S. L-lactate metabolism can occur in normal and cancer prostate cells via the novel mitochondrial L-lactate dehydrogenase // Int. J. Oncol. – 2010. – Vol. 37, № 6. – P. 1607–1620.
10. Koivusalo M., Baumann L. V. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase // FEBS Lett. – 1989. – Vol. 257, № 1. – P. 105–109.
11. Nicolau E., Míndez J., Fonseca J.J., Griebenow K., Cabrera C.R. Bioelectrochemistry of non-covalent immobilized alcohol dehydrogenase on oxidized diamond nanoparticles // Bioelectrochemistry. – 2012. – Vol. 85. – P. 1–6.
12. Sagrista M.L., Bozal J. Lactate dehydrogenase activity in the mitochondrial fraction of chichen liver: enzyme binding and kinetic behavior of soluble and bound enzyme // Biochim. – 1987. – Vol. 69, № 3. – P. 205–214.
13. Trivedi A., Heinemann M., Spiess A.C., Dausmann T., Bäch J. Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases // J. Biosci. Bioeng. – 2005. – V. 99, № 4. – P. 340–347.
14. Tsai Y.-C., Chen S.-Y., Liaw H.-W. Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2007. – Vol. 2. – P. 474–481.

References

1. Grinshteyn S.V., Kost O.A., Success of biological chemistry, 2001, Vol. 41, pp. 77–104.
2. Zimin Yu.V., Soloveva A.G., Ulanova A.A., Fundamental research, 2013, no. 2, pp. C. 68–71.
3. Kochetov G.A. Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii [A practical guide to Enzymology]. Moscow, Higher school, 1980. 272 p.
4. Krupyanko V.I. Vektorniy metod predstavleniy fermentativnykh reaksii [Vector method of presentation of enzymatic reactions]. Moscow, Science, 1990. 146 p.
5. Satanovskaya V.I., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1990, Vol. 109, no. 2, pp. 161–162.
6. Findley Dzh., Evanz U. Biologicheskie membrany. Metody [Biological membranes. Methods]. Moscow, Peace, 1990. 424 p.
7. Chaubey A., Gerard M., Singh V.S., Malhotra B.D., Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, Vol. 96, no. 1–3, pp. 293–301.
8. Dawson J.M., Heatlic P.L., Anal. Biochem., 1984, Vol. 140, no. 2, pp. 391–393.
9. De Bari L., Chieppa G., Marra E., Passarella S., Int. J. Oncol., 2010, Vol. 37, no. 6, pp. 1607–1620.
10. Koivusalo M., Baumann L. V., FEBS Lett., 1989, Vol. 257, no. 1, pp. 105–109.
11. Nicolau E., Míndez J., Fonseca J.J., Griebenow K., Cabrera C.R., Bioelectrochemistry, 2012, Vol. 85, pp. 1–6.
12. Sagrista M.L., Bozal J., Biochim., 1987, Vol. 69, no. 3, pp. 205–214.
13. Trivedi A., Heinemann M., Spiess A.C., Dausmann T., Bäch J., J. Biosci. Bioeng., 2005, Vol. 99, no. 4, pp. 340–347.
14. Tsai Y.-C., Chen S.-Y., Liaw H.-W., Sensors and Actuators B: Chemical., 2007, Vol. 2, pp. 474–481.

Рецензенты:

Корягин А.С., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных, ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;
Веселов А.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии растений, декан биологического факультета, ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Н. Новгород.

Работа поступила в редакцию 12.07.2013.