

## РОЛЬ АНИОНОВ ФОСФАТА В АВТО- И ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ NADH

© 2021 г. О.Н. Бржевская\*, Е.Н. Дегтярев\*\*, С.Н. Холуйская\*\*

\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

\*\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: s\_n\_khol@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 22.07.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Методом ЭПР исследовано влияние моно- и двузамещенных фосфатов на реакцию фотолиза восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH) в замороженном (77 К) водном растворе. Установлена зависимость выхода парамагнитных интермедиатов реакции — катион-радикала  $\text{NADH}^+$  и атомарного водорода от концентрации фосфатов. Полученные результаты интерпретированы с точки зрения основности и электроноакцепторных свойств фосфатов. По данным электронной спектроскопии обнаружено значительное ускорение авто- и фотоиндуцированного окисления NADH в нормальных условиях (20°C, водная среда, фосфатный буфер, pH 6.3). Скорость темновой реакции прямо пропорциональна суммарной концентрации орто- и гидрофосфатов и нечувствительна к кислороду. На основании экспериментов с использованием нитроксильной ловушки сделан вывод о нерадикальной природе реакции.

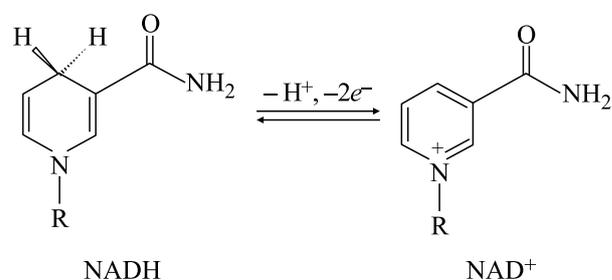
**Ключевые слова:** автоокисление NADH, фосфат, ЭПР-спектроскопия.

**DOI:** 10.31857/S0006302921030042

NADH и его окисленная форма  $\text{NAD}^+$  (рис. 1) — важные коферменты редокс-превращений в биохимическом синтезе. Изучению их действия посвящено огромное число исследований, например [1–5]. В контролируемых ферментами реакциях молекула NADH выступает либо как источник протона и двух электронов, либо как донор иона гидрида, который переносится на подходящий субстрат. Основную химическую роль в этих процессах играет фрагмент молекулы NADH — 1,4-дигидроникотинамид.

Окислительно-восстановительные превращения аналогов NADH, содержащих никотинамидный фрагмент, интенсивно изучаются в реакциях без участия ферментов, поскольку данные модельные реакции могут прояснить механизм действия NADH и, кроме того, представляют практический интерес. Так, на антипролиферативных и цитотоксических свойствах кофермента и его модельных соединений основаны разработки антиопухолевых фармацевтических препаратов [6,

7]; на изучении редокс-свойств — создание новых процессов органического синтеза, создание датчиков для определения загрязняющих примесей в воде [8] и т. д. Результатом многочисленных исследований стала гипотеза о двух механизмах трансформации кофермента NADH: первый механизм представляет собой одностадийный перенос гидридного иона. Второй — включает несколько стадий: две, когда последовательно происходит перенос электрона и атома водорода на

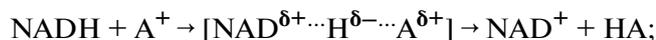


**Рис. 1.** NADH и его окисленная форма  $\text{NAD}^+$ ; R — фрагмент, включающий рибозу и аденин.

*Сокращения:* TEMPOL — 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил,  $\text{P}_i$  — моно- и двузамещенные фосфаты.

молекулу окислителя  $A^+$ , либо три – с постадийным переносом второго электрона и протона по следующей схеме:

*Одностадийный перенос:*

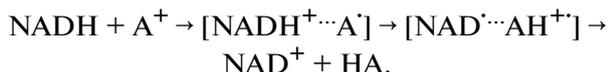


*Многостадийный перенос:*

(а) электрон – атом водорода ( $e^- - H^+$ )



(б) электрон – протон – электрон ( $e^- - H^+ - e^-$ )



Доказательством второго механизма служит регистрация различными физико-химическими методами промежуточных частиц – радикалов и ион-радикалов, в частности катион-радикала NADH. Примеров реализации второго механизма для NADH и его моделей немного, так как начальный перенос электрона – сильно эндотермическая реакция и для ее осуществления требуется дополнительная энергия, что достигается в условиях фотоиндуцирования или при введении катализаторов.

С другой стороны, известно, что эффективность редокс-процессов повышается в присутствии посредников передачи электрона таких, как молекулярные анионы, а именно анионы фосфата. Фосфатные анионы участвуют во многих биохимических процессах, исследование их взаимодействия с гидратированным электроном стало предметом многочисленных публикаций [9–11].

Целью настоящей работы было исследование влияния анионов фосфата на процесс автоокисления NADH, в том числе фотоиндуцированного. В условиях фотоокисления методом ЭПР также изучены свободнорадикальные интермедиаты реакции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали (без дополнительной очистки) NADH фирмы Serva (Германия), соли  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $Na_2HPO_4$ , NaCl и KBr фирмы Panreac (Испания) и 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (TEMPO) фирмы Merck (Германия).

Кинетику автоокисления NADH изучали по изменению полосы поглощения его электронного спектра с  $\lambda_{max} = 339$  нм ( $\epsilon = 6200$   $M^{-1}cm^{-1}$ ). Спектры регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне 225–400 нм в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Кинетику фотоокисления NADH в воде и фосфатном буфере ( $C_0 = 0.5$  М, рН 6.3) исследовали при облуче-

нии монохромным светодиодом ( $\lambda = 365$  нм) при комнатной температуре в атмосфере аргона в кюветках специальной конструкции, позволяющих провести предварительный барботаж раствора инертным газом. Погрешность измерения оптической плотности составляет  $\pm 0.001$ , общая погрешность определения константы скорости не превышает 5%.

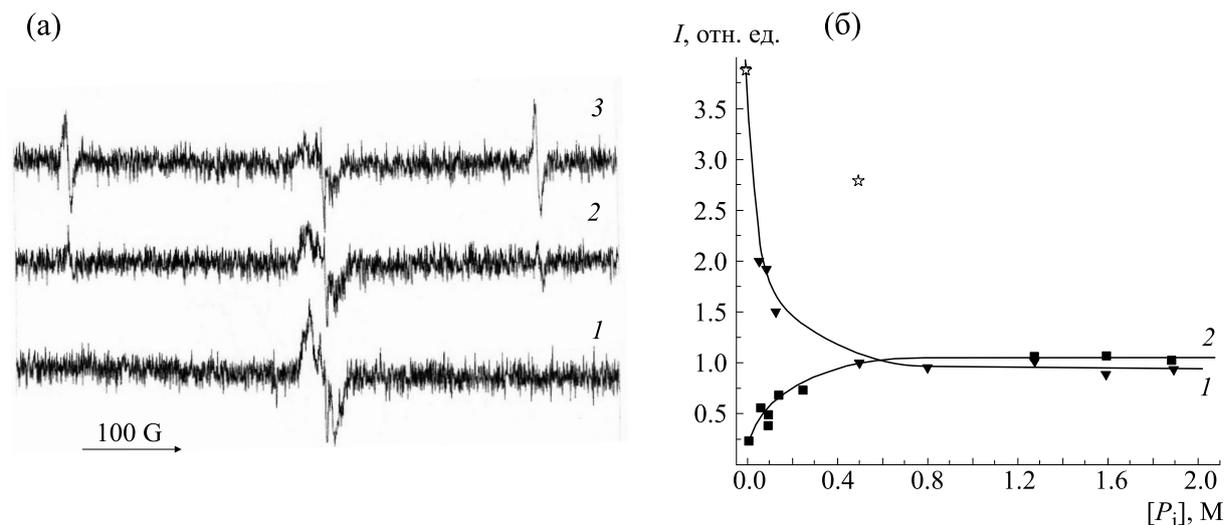
Фотоиндуцированное окисление NADH в замороженных жидким азотом образцах осуществляли при облучении лампой ДРШ-1000 с фильтром БС6 с пропусканием  $\lambda > 320$  нм. Растворенный кислород удаляли вакуумированием. Времена экспозиции варьировали от 8 до 40 мин. Регистрацию сигналов ЭПР проводили на спектрометре EMX (Bruker, США) в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН. Спектры атома водорода и катион-радикала NADH регистрировали соответственно при мощности микроволнового поля 2 мкВт (в отсутствие насыщения) и 200 мкВт, при 77 К и амплитуде модуляции 3 Гс. Двойное интегрирование сигнала, пропорциональное концентрации парамагнитных центров, проводили с помощью программы WinEPR (Bruker, США). Измерение интенсивности сигналов проводили трехкратно, различие в полученных значениях составляло  $< 10\%$ . Для построения графиков использовали усредненные значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а представлены ЭПР-спектры продуктов фотоиндуцированного окисления NADH. При 77 К зарегистрирован характерный пятикомпонентный сигнал, впервые описанный в работах [12, 13] и относящийся к парамагнитному интермедиату реакции – катион-радикалу  $NADH^+$ . Регистрация катион-радикала свидетельствует о многостадийном механизме окисления NADH, который, как правило, реализуется в условиях фотоиндуцированного процесса. Второй продукт, образующийся в одном элементарном акте с катион-радикалом – гидратированный электрон  $e_{aq}$  имеет время жизни около 120 нс и не обнаруживается методом ЭПР. Вместе с тем при фотоокислении NADH в фосфатном буфере в спектре ЭПР появляется сигнал атома водорода (дублет с расщеплением  $\sim 506$  Гс).

Превращение мобильного электрона в атом водорода в присутствии фосфатов обнаружено достаточно давно [13]. Впервые эта реакция наблюдалась при  $\gamma$ -радиолизе замороженных растворов ортофосфатов. Оказалось, что взаимодействие  $e_{aq}$  с анионами ортофосфата приводит к образованию атомарного водорода, стабилизированного полем оксианиона (реакция 1).





**Рис. 2.** (а) – Спектры ЭПР парамагнитных продуктов фотолиза NADH (77 К,  $[\text{NADH}]_0 = 5.0$  мМ, время облучения 8 мин, вакуум): 1 – спектр катион-радикала  $\text{NADH}^+$ , 2 и 3 – спектры катион-радикала  $\text{NADH}^+$  и атомарного водорода, полученные в присутствии фосфатов (рН 6,3) в концентрации 0.125 М (2) и 0.5 М (3). (б) – Зависимости интенсивностей сигналов ЭПР катион-радикала  $\text{NADH}^+$  (1) и атомарного водорода (2) от концентрации фосфатов. Звездочками обозначен относительный выход гидратированных электронов по данным наносекундного лазерного фотолиза [15].

Впоследствии захват и стабилизация  $e_{\text{aq}}$  фосфатами обнаружены для электронов с низкой энергией  $< 4.5$  эВ в условиях, исключающих появление продуктов радиолитического распада воды. Свободные электроны генерировали путем фотоионизации различных соединений (триптофан, пирен, фенотиазин, хлорофилл и другие) при облучении с длинами волн  $240 \text{ нм} < \lambda < 700 \text{ нм}$ , т. е., в том числе, видимым светом. Предполагается, что при взаимодействии  $e_{\text{aq}}$  с фосфатом в замороженном водном растворе образуется молекулярный анион – аддукт электрона, метастабильная частица, способная передавать электрон акцептору при его наличии ( $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), либо распадаться, причем характерным продуктом фрагментации является атом водорода. Прекурсором атома  $\text{H}^\bullet$  выступает протон фосфата, что однозначно доказано по появлению спектра ЭПР атомарного дейтерия в экспериментах с  $\text{D}_2\text{PO}_4^-$  [11].

Полученные нами результаты также указывают на определяющую роль моно- и двузамещенных фосфатов ( $\text{P}_i$ ) в образовании атома водорода. Действительно, мы наблюдали сигнал  $\text{H}^\bullet$  исключительно в присутствии фосфатного буфера, причем интенсивность сигнала коррелировала с концентрацией фосфатов (рис. 2б). Суммарную концентрацию  $\text{P}_i$  изменяли от 1 мМ до 1.5 М – значения, близкого к предельной растворимости ортофосфата натрия. Соотношение моно- и двузамещенных фосфатов подбиралось таким образом, чтобы рН растворов имел постоянное значение (рН 6.3). Зависимость интенсивности сигнала

атомов водорода от концентрации буфера представляет собой кривую с насыщением (кривая 1 на рис. 2б), наибольшая интенсивность сигнала  $\text{H}^\bullet$  достигается при концентрации  $[\text{P}_i] \geq 0.5$  М, и плато на экспериментальной кривой соответствует условиям, когда все свободные электроны взаимодействуют с фосфатом.

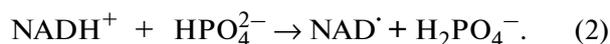
Напротив, максимальное образование первичного продукта фоторазделения зарядов – катион-радикала  $\text{NADH}^+$  – происходит в отсутствие фосфатов (кривая 2 на рис. 2б). В фосфатном буфере с ростом концентрации  $[\text{P}_i]$  интенсивность сигнала  $\text{NADH}^+$  снижается и стремится к постоянному значению, которое устанавливается также при концентрации  $[\text{P}_i] \geq 0.5$  М (рис. 2б), т. е. зависимости интенсивностей сигналов  $\text{NADH}^+$  и  $\text{H}^\bullet$  от концентрации  $\text{P}_i$  антибатны. Существует несколько причин, способных вызвать снижение интенсивности сигнала катион-радикала. Во-первых, эффективность реакции фотолиза может понизиться в результате увеличения ионной силы раствора, приводящей к изменению поляризации связей в молекуле NADH. Однако мы не обнаружили влияния соли  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  на выход катион-радикала при ее введении в концентрации 1.0 М в раствор NADH.

Во-вторых, авторами работы [2] была выдвинута гипотеза об образовании комплекса с переносом заряда между NADH и анионом фосфата  $[\text{NADH} \dots \text{P}_i]$ . У молекулы NADH в таком комплексе могут изменяться поляризуемость, дипольный момент, магнитные свойства. В работе

[2] было высказано предположение об увеличении реакционной способности координированного фосфатом NADH в условиях термической реакции. Однако при фотолизе NADH мы наблюдали обратное: в присутствии фосфатов не только снижается концентрация катион-радикала, но, как было показано ранее [11] методом наносекундного лазерного фотолиза, снижается также выход гидратированных электронов, т. е. эффективность (квантовый выход) реакции падает.

Рис. 2б дополнен данными нашей работы [15]: двумя звездочками обозначены относительные величины выхода  $e_{aq}$  в отсутствие фосфатов и при  $[P_i] = 0.5$  М. Видно, что выходы  $e_{aq}$  и катион-радикала для  $[P_i] = 0.5$  М не совпадают, хотя обе частицы образуются эквимолекулярно в одном элементарном акте. Значительно меньшая концентрация катион-радикала говорит о существовании канала его расходования. Следовательно, действие фосфата на фотоокисление NADH носит двойственный характер: с одной стороны, снижает квантовый выход реакции, с другой — стимулирует вторичные превращения ее продуктов,  $e_{aq}$  и катион-радикала  $NADH^+$ .

Известно, что катион-радикал  $NADH^+$  вследствие более кислого характера в сравнении с исходной молекулой обладает высокой реакционной способностью и легко депротонируется, переходя в нейтральный радикал  $NAD^{\cdot}$  [16, 17], причем эта реакция практически необратима. Несмотря на высокие значения константы скорости реакции депротонирования  $NADH^+$  при нормальных ( $20^\circ\text{C}$ ) условиях  $k \approx 10^6 \text{ c}^{-1}$  [18], при 77 К катион-радикал устойчив (спектр 1 на рис. 2а), что, очевидно, обусловлено довольно большой энергией активации, которая составляет около 60 кДж/моль [19]. Однако ситуация изменяется в присутствии акцептора протона (спектры 2 и 3 на рис. 2а). Так, по оценке, сделанной в работе [17], взаимодействие  $NADH^+$  с гидроксильным анионом увеличивает скорость депротонирования по сравнению с молекулой  $\text{H}_2\text{O}$  на два порядка; значения констант составляют  $2.9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и  $3.5 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$  соответственно. В нашей системе наиболее вероятной частицей, связывающей протон, выступает гидрофосфат  $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $pK_a = 7.21$ ) и превращение катион-радикала происходит по реакции (2):



Полученные данные также хорошо согласуются с результатами исследований [16, 20], где обнаружено, что акцепторы протона и атома водорода повышают выход конечного продукта реакции —

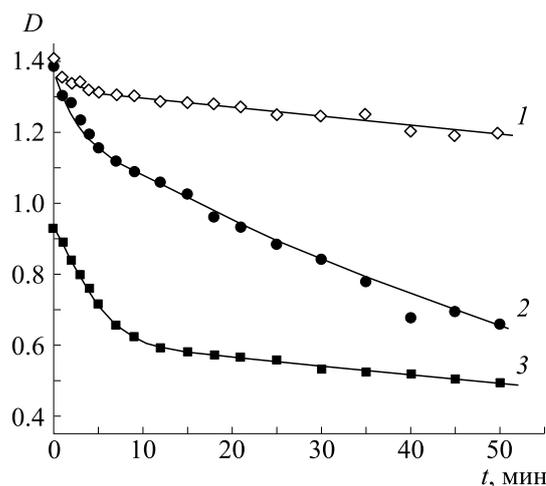
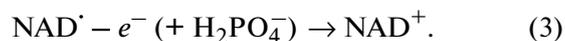


Рис. 3. Кинетика фотоокисления NADH при облучении с  $\lambda = 365$  нм в водном растворе ( $20^\circ\text{C}$ ): 1 — в аргоне, 2 — в аргоне в присутствии фосфатов в концентрации 0.5 М (рН 6.3), 3 — на воздухе.

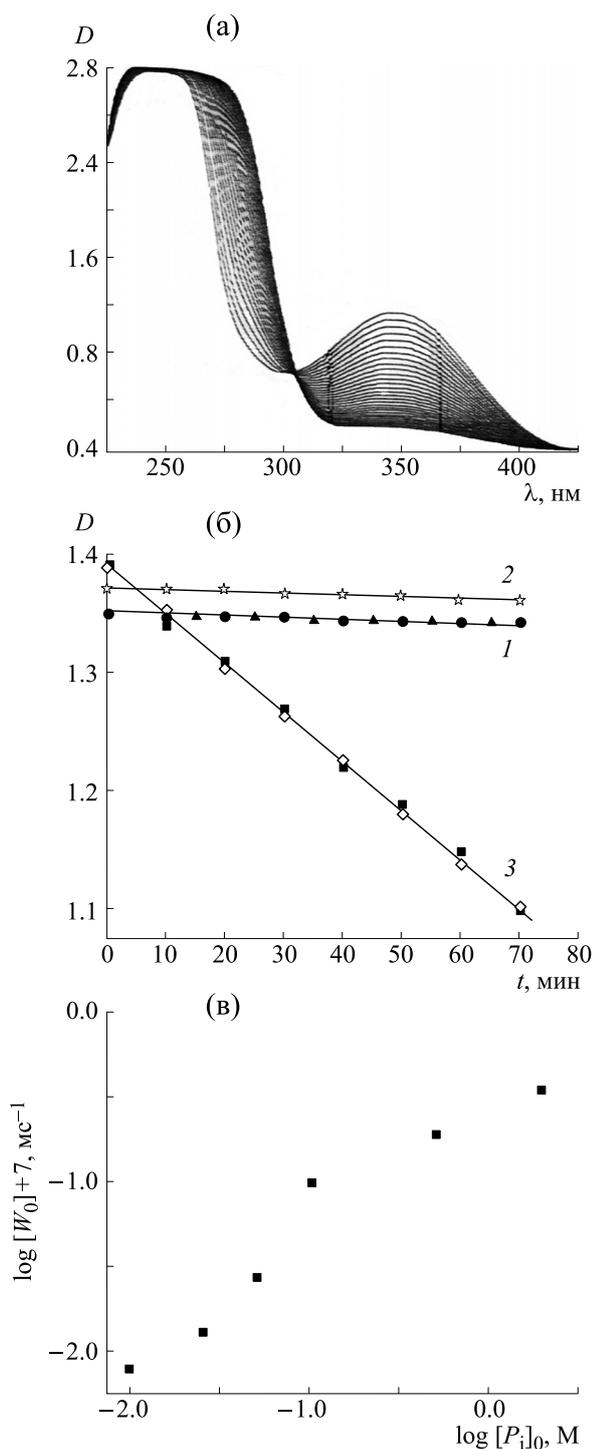
окисленной формы  $\text{NAD}^+$  — и в целом увеличивают общую скорость фотолиза.

Образующийся после депротонирования радикал  $\text{NAD}^{\cdot}$  также нестабилен. Его гибель происходит в основном по двум направлениям — в результате быстрой димеризации [21] и экзотермической реакции одноэлектронного окисления [22]. Нельзя исключить влияние ортофосфата на окисление  $\text{NAD}^{\cdot}$  как частицы, обладающей электронакцепторными свойствами:



Описанный механизм фотоокисления NADH включает обратимые стадии, в частности, авторы работы [23] методами флуоресценции исследовали рекомбинацию катион-радикала  $\text{NADH}^+$  с гидратированным электроном. Катион-радикал  $\text{NADH}^+$  и  $e_{aq}$  — первичные продукты разделения зарядов, и наблюдаемое нами акцептирование электрона ортофосфатом предотвращает их рекомбинацию и смещает равновесие реакции в сторону образования  $\text{NAD}^+$ . Отсюда можно предположить увеличение общей скорости окисления NADH, даже несмотря на незначительное уменьшение квантового выхода фотолиза, отмеченное выше.

На рис. 3 представлены результаты экспериментов по фотоиндуцированному окислению NADH в нормальных условиях с добавками фосфатов и в их отсутствие. Кинетические кривые на рис. 3 показывают сильное ускоряющее действие  $P_i$  на реакцию. В этом отношении влияние фосфатов подобно действию кислорода, который, как показано в работе [24], выступает в качестве



**Рис. 4.** (а) – Изменение во времени электронного спектра поглощения NADH ( $C_0 = 0.25 \text{ мМ}$ ) в присутствии фосфатного буфера ( $C_0 = 1.0 \text{ М}$ , pH 6.43), Ar, 23°C. (б) – Кинетические кривые автоокисления NADH ( $C_0 = 0.25 \text{ мМ}$ , 23°C): 1 – в инертной атмосфере аргона (кружки) и на воздухе (треугольники); 2 – с добавкой NaCl ( $C_0 = 2.0 \text{ М}$ , в аргоне); 3 – в присутствии фосфатного буфера ( $C_0 = 0.5 \text{ М}$ , pH 6.43) в аргоне (квадраты) и на воздухе (ромбы). (в) – Зависимость начальной скорости  $W_0$  автоокисления NADH ( $C_0 = 0.25 \text{ мМ}$ ) от концентрации  $P_i$  фосфатного буфера.

медиатора передачи электронов, образующихся при фотолизе NADH. Однако эндотермическая реакция присоединения к кислороду реализуется только при достаточной энергии электронов, например, в условиях фотогенерации. Поэтому мы исследовали влияние фосфатов и кислорода на автоокисление NADH без инициирования облучением.

Темновой процесс автоокисления NADH изучали по изменению электронного спектра кофермента в нормальных условиях (20°C). При отсутствии добавок спектр NADH практически стабилен в атмосфере аргона и воздуха, введение  $P_i$  значительно ускоряет реакцию (рис. 4б). В спектре не проявляются признаки образования комплексов кофермента с фосфатами: трансформация NADH в окисленную форму происходит с четко выраженной изобестической точкой (рис. 4а), что говорит о существовании только двух форм кофермента. Ускорение реакции не связано с изменением ионной силы раствора. Так, введение добавок солей (NaCl, KBr) в концентрациях, соответствующих ионной силе фосфатного буфера, не влияет на реакцию (рис. 4б). Автоокисление NADH – pH-зависимая реакция, при смещении в более щелочную область от значения pH 6.4 процесс сильно замедляется и при pH  $\geq 8$  практически останавливается. Начальные участки кинетических кривых расходования NADH линейны (зависимость 3 на рис. 4б), скорость реакции постоянна, оценка значения эффективной константы скорости дает величину  $k_{\text{эф}} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  ( $[P_i] = 0.5 \text{ М}$ ). Зависимость скорости окисления NADH от  $[P_i]$  имеет сложный характер (рис. 3в): она прямо пропорциональна суммарной концентрации  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в диапазоне концентраций  $[P_i] \leq 0.5 \text{ М}$ , с приближением к пределу растворимости  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  скорость падает.

Следует отметить отсутствие влияния кислорода на реакцию, что косвенно может свидетельствовать о нерадикальном процессе. Для идентификации природы реакции использовали радикальную ловушку – водорастворимый нитроксильный радикал TEMPOL. Нитроксильный радикал в концентрации 0.2 мМ вводили в раствор с концентрацией реагентов  $[\text{NADH}]_0 = 1.0 \text{ мМ}$ ;  $[P_i] = 0.5 \text{ М}$  (pH 6.43). Выяснилось, что вне зависимости от наличия кислорода TEMPOL не оказывает действия на реакцию: скорость автоокисления не изменяется, значение эффективной константы скорости практически совпадает с величиной, определенной без ловушки, наконец, ЭПР-спектр радикала TEMPOL в реакционной смеси стабилен во времени. Таким образом, не было получено аргументов в пользу радикального

процесса при автоокислении NADH в присутствии фосфатов. Данный факт легко объясняется в рамках одностадийного механизма переноса гидридных анионов, который более характерен для темновых процессов. Стимулирование фосфатами темновой реакции может быть вызвано активацией NADH при его координации фосфатом. В данном случае, вероятно, имеет место нековалентное взаимодействие, поскольку мы не обнаружили в электронном спектре NADH изменений, характерных для образования комплекса. В настоящий момент нами проводятся исследования комплексообразования методом ЯМР, поскольку он позволяет выявить слабые нековалентные взаимодействия по изменению времен спин-решеточной релаксации атомов молекулы NADH.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неорганические фосфаты оказывают двойное действие на фотоиндуцированное окисление NADH. С одной стороны, незначительно снижают выход первичных продуктов разделения зарядов — электрона и катион-радикала  $\text{NADH}^+$ , с другой — вступают с ними во вторичные реакции, предотвращая рекомбинацию и повышая общую скорость фотолиза NADH. Ускоряющее действие фосфатов обусловлено их свойствами — основностью и сродством к электрону; первое приводит к увеличению скорости депротонирования  $\text{NADH}^+$  под действием гидрофосфата, второе имеет своим следствием акцептирование гидратированного электрона ортофосфатом с образованием атомарного водорода.

Темновая реакция автоокисления NADH ускоряется фосфатами и предположительно происходит по одностадийному механизму гидридного переноса, поскольку в экспериментах с использованием радикальных ловушек (молекулярный  $\text{O}_2$ , TEMPOL) не обнаружено признаков радикальной природы реакции.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при бюджетном финансировании (№ темы ФАНО: 0082-2014-0009, № гос. регистрации: АААА-А17-117040610309-0).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. U. Eisner and J. Kuthan, *Chem. Rev.* **72**, 1 (1972).
2. S. G. A. Alivisatos, F. Ungar, and G. Abraham, *Nature* **203**, 973 (1964).
3. D. M. Stout and A. I. Meyers, *Chem. Rev.* **82**, 223 (1982).
4. D. G. Nicholls and S. J. Ferguson, *Bioenergetics* (Academic Press, 2002).
5. T. Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* (Blackwell Publishing Ltd., 2004).
6. S. Boulton, S. Kyle, and D. W. Durkacz, *Br. J. Cancer* **76**, 845 (1997).
7. E. Ciesielska, K. Studzian, E. Zyner, et al., *Cell. Mol. Biol. Lett.* **5**, 441 (2000).
8. M. Zhang, Y. Zhang, L. Zhengwen, et al., *J. Environ. Manag.* **232**, 197 (2019).
9. П. П. Левин, О. Н. Бржевская и О. С. Неделина, *Изв. РАН. Сер. хим.* **56** (7), 1277 (2007).
10. О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев, Т. С. Журавлева и др., *Докл. РАН* **420** (3), 1 (2008).
11. О. С. Неделина, О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев и др., *Докл. РАН* **428** (4), 474 (2009).
12. А. А. Красновский и Г. П. Брин, *Докл. АН СССР* **158** (1), 225 (1964).
13. А. В. Умрихина, А. Н. Луганская и А. А. Красновский, *Докл. АН СССР* **304** (6), 1485 (1989).
14. J. Jortner, M. Ottolenghi, J. Rabani, et al., *J. Chem. Phys.* **37**, 2488 (1962).
15. О. Н. Бржевская, Е. Н. Дегтярев, П. П. Левин и др., *Докл. РАН* **405** (2), 259 (2008).
16. A. Anne, P. Napiot, J. Moiroux, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4694 (1992).
17. J. Zielonka, A. Marcinek, J. Adamus, et al., *J. Phys. Chem. A* **107** (46), 9860 (2003).
18. B. Czochralska and L. Lindquist, *Chem. Phys. Lett.* **101**, 297 (1983).
19. J. Moiroux and P. Elving, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6533 (1980).
20. J. Gebicki, A. Marcinek, and J. Zielonka, *Acc. Chem. Res.* **37**(6), 379 (2004).
21. C. O. Schmakel, K. S. V. Santhanam, and P. J. Elving, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 5083 (1975).
22. P. J. Elving, W. T. Bresnahan, J. Moiroux, et al., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **9**, 365 (1982).
23. J. Tornmalm, E. Sandberg, M. Rabasovic, et al., *Sci. Rep.* **9**, 15070 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-51526-w
24. B. Czochralska, W. Kawczynski, D. Bartosz, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **801** (3), 40

## The Role of Phosphate Anions in Photoinduced Auto-Oxidation of NADH

O.N. Brzevskaya\*, E.N. Degtyarev\*\*, and S.N. Kholuiskaya\*\*

\*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

\*\*Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The EPR technique was used to study the effect of mono- and disubstituted phosphates on photolysis of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in frozen aqueous solution at 77°K. The dependence of the yield of paramagnetic reaction intermediates – cation radical of NADH<sup>•+</sup> and hydrogen atom on phosphate concentration was determined. The results obtained have been interpreted in terms of basicity and electron-withdrawing properties of phosphates. According to electron spectroscopy, a significant acceleration of photoinduced auto-oxidation of NADH was detected under normal conditions (20°C, aqueous solution, phosphate buffer, pH 6.3). The speed of the dark reaction is directly proportional to the total concentration of ortho- and hydrophosphates, it is insensitive to oxygen. Experiments with nitroxyl trapping led to the conclusion that the reaction proceeds through the non-radical mechanism.

*Keywords: NADH auto-oxidation, phosphate, EPR spectroscopy*