

УДК 615.322:582.734.4:541.15

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ЭКСТРАКТАХ ИЗ КОРНЕВИЩА И КОРНЕЙ ХРЕНА И ЕЕ СТАБИЛЬНОСТИ К РАЗЛИЧНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Е.Ю. Александрова* , М.А. Орлова , П.Л. Нейман*

(кафедра радиохимии; e-mail: orlova.radiochem@mail.ru.)

Проведено определение пероксидазной активности в корневище и корнях хрена в зависимости от навески сырья и используемого экстрагента. Измерение пероксидазной активности проводили в водном и кальциевом экстракте с использованием гваякола и АВТС в качестве субстратов. Стабильность ферментативной активности изучали методом радиационной инактивации.

Корневище и корни хрена издавна используются в народной медицине как противовоспалительное, мочегонное, раздражающее, витаминное, отхаркивающее, фитонцидное, противоязвенное, противомикробное и противогрибковое средство [1, 2]. Известно [3], что полифенолы из хрена, добавленные в культуральную среду клеток *HeLa*, подавляют образование сульфоксид-радикалов в микросомах и митохондриях, выделяемых из этих клеток после жесткого УФ-облучения. Описано выделение гетероциклических веществ имидазольной и пирролидиновой природы из гомогенатов корневища и корней хрена [4]. Предположительно они являются метаболитами обмена нуклеотидов и обладают способностью уменьшать скорость свертывания крови *in vivo* за счет подавления активности протромбина. Из корней хрена была выделена фракция термостабильных веществ группы флавоноидов, которые служат основой для биосинтеза ФМН (фламин-моноклеотид) и ФАД-кофакторов (флавин-аденин-динуклеотид) и обладают автономной антиоксидантной активностью (АОА). Выделенные вещества были испытаны на АОА в системе, содержащей супероксиддисмутазу и изолированные митохондрии миокарда крыс (*in vitro*).

Следует отметить, что введение пероксидазы хрена (HRP) в пищевой рацион весьма полезно. Это обусловлено в частности (и особенно) наличием гема в структуре фермента. Хотя в литературе прямые сведения об использовании пероксидазы хрена как биологически-активной добавки встречаются редко, очевидно, что потребление пероксидаз растений человеком происходит достаточно активно.

Пероксидазы растений принадлежат к классу гемсодержащих оксидоредуктаз и используют пероксид водорода в качестве донора электронов. Важнейшие физиологические функции этих ферментов рассмот-

рены в многочисленных обзорах [5, 6], а классификация (основанная на высокой гомологии аминокислотных последовательностей [6]) приведена в работе [7].

Пероксидаза хрена является одним из наиболее изученных ферментов этого класса. В целом, стабильность пероксидаз растений может значительно различаться в зависимости от условий существования, т.е. от источника фермента. Так, например, следует отметить необычно высокую стабильность у пероксидазы из листьев африканской пальмы [8], а также у катионной пероксидазы арахиса и пероксидазы сои [9]. Пероксидаза хрена является менее устойчивой [8, 9].

Материалы и методы

Навеску корневища и корней хрена в количестве 0,25–2,00 г (свежее сырье) растирали в ступке с экстрагентом, в качестве которого применяли бидистиллированную воду или 5%-й раствор CaCl_2 ("х.ч."), разбавляли до 50 мл и настаивали в течение 30 мин. В полученных экстрактах после отделения от сырья определяли пероксидазную активность с использованием гваякола и АВТС [2,2-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) аммония] в качестве субстратов [10, 11]. Предварительно проводили электрофорез экстрактов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Линия пероксидазы хрена наблюдалась, но очень слабо.

Для определения пероксидазной активности использовали известные методики:

По АВТС. 0,05 мл раствора АВТС (15 мМ/л) и аликвоту фермента добавляли к 2 мл 0,1 М Na -ацетатного буфера (рН 5,0), реакцию инициировали добавлением 0,1 мл 0,5%-го раствора H_2O_2 . Коэффициент экстинкции при $\lambda = 405$ нм был принят равным 36800 л/моль см. Активность выражали в единицах E (мкМ/мин) на 1 мг белка [10].

*Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова.

Т а б л и ц а 1

Пероксидазная активность экстрактов в зависимости от навески сырья

Навеска, г	Водное извлечение					Кальциевое извлечение 5%				
	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
A(Е/мл) (ABTS)	0,283	0,495	0,991	1,345	2,194	1,592	3,184	6,016	8,421	8,845
A(Е/мл)(гваякол)	0,177	0,310	0,620	0,840	1,371	0,995	1,990	3,760	5,263	5,528
$\frac{A(ABTS)}{A(гваякол)}$	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6

Примечание. E – единица ферментативной активности, равная количеству фермента в мг, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

По гваяколу. Раствор гваякола в воде (0,15 мл, 1 мг/мл) и аликвоту фермента добавляли к 2 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0), реакцию инициировали добавлением 0,1 мл 0,5%-го раствора H₂O₂. Коэффициент экстинкции при $\lambda = 436$ нм составляет 25500 л/моль·см [11].

Облучение экстрактов для определения стабильности проводили на источнике γ -400 (¹³⁷Cs) с мощностью дозы $P_\gamma = 0,05$ Гр/с. Мощность дозы определяли ферросульфатным методом с помощью твердофазных дозиметров. Стабильность изучали на экстрактах, полученных с навеской сырья 1,5 г.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения пероксидазной активности из экстрактов корневища и корней хрена представлены в табл. 1 и на рис. 1. Как видно, в водном экстракте увеличение пероксидазной активности при

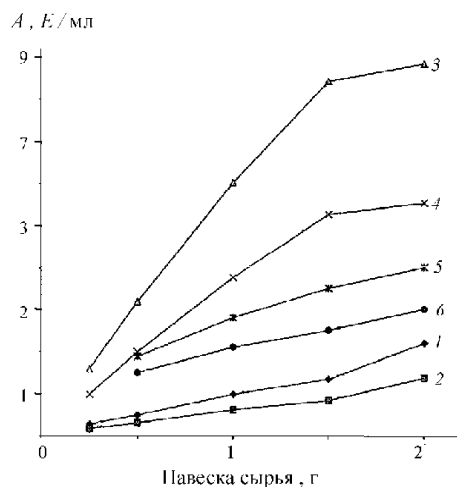


Рис. 1. Зависимость ферментативной активности пероксидазы хрена от исходной навески для получения экстракта: 1 – водного по ABTS; 2 – водного по гваяколу; 3 – хлоридом кальция по ABTS; 4 – хлоридом кальция по гваяколу; 5 – хлоридом кальция по гваяколу, спустя месяц в холодильнике; 6 – хлоридом кальция по ABTS, спустя месяц в холодильнике

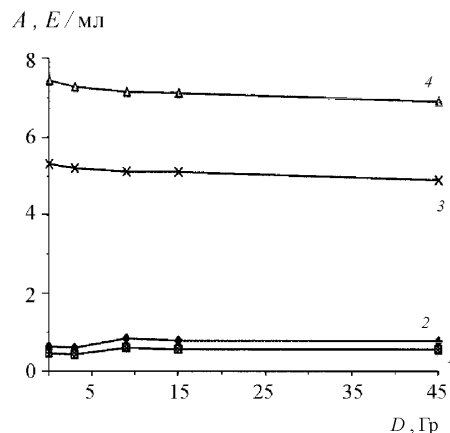


Рис. 2. Дозовая зависимость пероксидазной активности в водном и кальциевом экстрактах из сырья хрена (масса навески 1,5 г). Экстракт: 1 – водный по гваяколу; 2 – водный по ABTS; 3 – хлоридом кальция по гваяколу; 4 – хлоридом кальция по ABTS

росте навески по обоим субстратам происходит значительно медленнее, чем в присутствии CaCl₂, а в случае кальциевого экстракта пероксидазная активность значительно выше. Это неудивительно, так как в солевых растворах повышается коэффициент экстракции, кроме того, ион кальция входит в состав молекулы HRP [8]. Для металл-содержащих ферментов в этом случае иногда наблюдается повышение эффективности катализа. По отношению к ABTS активность выше по сравнению с гваяколом примерно в 1,5 раза (кальциевый экстракт), что говорит о влиянии появления ионов кальция на конформационное состояние фермента (конформационное состояние в данном случае – набор исходных допустимых конформационных состояний [8, 12]).

Для изучения стабильности пероксидазной активности в образцах была использована радиационная инактивация. Этот метод может служить моделью любого физико-химического воздействия на фермент (белок), так как радиация способна успешно моделировать радикалообразующие процессы. Результаты радиационной стабильности приведены на

Т а б л и ц а 2

Стабильность водного (I) и кальциевого (II) экстрактов из корневища и корней хрена (масса навески 1,5 г) по отношению к γ -облучению (метод радиационной инактивации)

Доза облучения, Гр	Пероксидазная активность А (Е/мл)					
	Экстракт I			Экстракт II		
	ABTS	Гваякол	ABTS / гваякол	ABTS	Гваякол	ABTS / гваякол
0	0,64	0,46	1,39	7,44	5,31	1,40
3	0,60	0,43	1,39	7,28	5,2	1,40
9	0,84	0,60	1,40	7,15	5,11	1,40
15	0,785	0,56	1,40	7,12	5,1	1,40
45	0,78	0,557	1,40	6,9	4,9	1,39

рис. 2. Как в водном, так и в кальциевом экстрактах наблюдается достаточно высокая стабильность пероксидазной активности. На основании этого можно сделать вывод о возможности достаточно длительного хранения препарата в обычных условиях без изменения его полезных свойств. Об этом же говорят и данные по хранению экстрактов в холодильнике в течение месяца (рис. 1 кривые 5, 6). Наибольшие потери активности наблюдались в кальциевом экстракте по отношению к ABTS, что говорит о появлении небольших конформационных изменений в области этого субстрат-связывающего центра. Следует отметить, что в обоих экстрактах соотношение пероксидазной активности ABTS/гваякол практически

не меняется (табл. 2). Вероятно, глобальных повреждений субстрат-связывающих центров не происходит даже при 45 Гр.

Таким образом, в препаратах корневища и корней хрена содержится пероксидаза хрена в небольших количествах. Наблюдается достаточно высокая стабильность пероксидазной активности. Учитывая важность гем-содержащих ферментов для организма человека, особенно в наноконцентрациях, можно считать экстракт из корневища и корней хрена важным компонентом для дальнейшего применения в фармацевтической практике, особенно в стоматологии, и в качестве биологически-активных добавок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кускин П. Хрен. М., 1991. С. 30.
2. Ковалева Н.Г. Лечение растениями. М., 1993. С. 232.
3. Luttrell D.K. // *Biomodels*. 2002. **10**. P. 211.
4. Waugh. S, Thallestromp Y.S., Warski. T., Rummenighe D. // *Biopharmacy*. 2001. **II**. Budapest-Szeged.
5. Газарян И.Г. Итоги науки и техники. Биотехнология. 1992. **36**. P. 168.
6. Gazaryan I.G. // *Recent Research Development in Biophysical Chemistry*. 2000. **1**. P. 73.
7. Welinder K.G. // *Curr. Opin. Structural Biol.* 1992. **2**. P. 388.
8. Орлова М.А. Радиоэнзимология – метод исследования свойств и структуры ферментов. М., 2002. С. 285.
9. Орлова М.А., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Газарян И.Г. // *Изв. АН Сер. хим.* 1998. № 3. С. 522.
10. Несмеянова О.А., Рудашевская Т.Ю., Гринберг Ц.И. // *Изв. АН. Сер. хим.* 1997. № 12. С. 2590.
11. *Biochimica Information* / Ed Y. Keescy. Indianapolis, 1987. P. 57.
12. Orlova M.A., Kost O.A., Gribkov V.A., Gazaryan I.G., Dubrovsky A.V., Egorov V.A., Troshina N.N. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. **88**. P. 321.

Поступила в редакцию 15.02.05

THE INVESTIGATION OF ENZYME PEROXIDASE ACTIVITY FROM RHIZOME AND ROOTS OF PLAIN HORSE RADISH PLANT BY RADIATION INACTIVATION METHOD

E.Y. Alexandrova, M.A. Orlova, P.L. Neiman

(Division of Radiochemistry)

Investigation of enzyme activity of Horseradish Peroxidase (HRP), depending the weight of the raw materials and extracts was studied. The level of peroxidase activity was observed in the water and calcium extracts in to guayacol and ABTS as substrates. Stability of peroxidase activity in the samples was determined by radiation inactivation method.