

УДК 577.152.1

КИНЕТИКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И ФЕРРОЦИАНИДА КАЛИЯ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

В.В. Рогожин, Д.В. Перетолчин

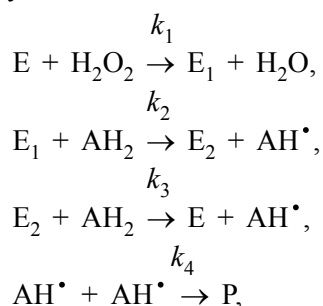
(Якутская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра агробиохимии;
e-mail: vrogozhin@mail.ru)

Субстраты пероксидазы различаются по структуре и химическим свойствам, поэтому в действии пероксидазы заложены различные механизмы. В случае присутствия в растворе различных субстратов пероксидазы могут наблюдаться эффекты взаимной активации и ингибирования фермента, которые проявляются в виде конкурентного типа ингибирования или дифференцированного окисления субстратов. В случае присутствия в среде двух субстратов в действии пероксидазы может проявиться механизм активации реакций окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, ферроцианид калия, дигидрокверцетин, ферментативная кинетика.

Принятые в статье сокращения: ДГКВ – дигидрокверцетин, ФК – ферроцианид калия.

Пероксидаза – фермент, катализирующий окисление неорганических и органических соединений в реакциях с участием кислорода (оксидазные) и перекиси водорода (пероксидазные) [1]. Особое значение имеют исследования реакций пероксидазного окисления с участием нескольких субстратов, которые получили название субстрат-субстратных взаимодействий [2]. Механизм действия пероксидазы предполагает образование промежуточных окисленных форм фермента (E_1 и E_2). Пероксидазные реакции протекают по следующей схеме:



где E , E_1 , E_2 – нативный фермент и его промежуточные окисленные формы, AN_2 , AN^{\bullet} – субстрат и его полуокисленные формы, P – продукт реакции, k_1 , k_2 , k_3 , k_4 – каталитические константы.

Субстраты пероксидазы различаются по структуре и химическим свойствам [3], поэтому в действии пероксидазы заложены различные механизмы. В частности, в случае присутствия в растворе различных

субстратов пероксидазы могут наблюдаться эффекты взаимной активации и ингибирования фермента, которые проявляются в виде конкурентного типа ингибирования или дифференцированного окисления субстратов. Кроме того, в случае присутствия в среде двух субстратов в действии пероксидазы может проявиться механизм активации реакций окисления субстрата медленно окисляемого быстро окисляемым субстратом [4].

Изучение субстрат-субстратной активации позволяет определить специфичность механизма действия пероксидазы в реакциях совместного окисления субстратов, в которых проявляется избирательность действия фермента в каталитическом процессе по отношению к окислению только одного из субстратов. Данный механизм может быть реализован в биологических системах живых организмов, в клетках которых могут одновременно присутствовать несколько субстратов пероксидазы. Кроме того, изучение механизмов совместного пероксидазного окисления субстратов, позволяет исследовать активный центр фермента, определив расположение участков специфичного связывания субстратов, выявить особенности протекания каталитического процесса и определить роль второго субстрата.

Особое значение имеет изучение реакций окисления с участием антиоксидантов (низко- и высокомолекулярных), к которым относятся пероксидаза и не-

которые ее субстраты (аскорбиновая кислота, кверцетин, дигидрокверцетин и др.). Дигидрокверцетин хорошо растворим в полярных растворителях, поэтому в водно-спиртовых растворах может присутствовать в *транс*- и *цис*-формах. Причем *транс*-форма более активно окисляется оксидазами [5]. Продуктом окисления дигидрокверцетина является кверцетин. Однако процесс окисления дигидрокверцетина перекисью водорода ферментативным способом в литературе практически не исследован.

Интерес к дигидрокверцетину и кверцетину обусловлен тем, что эти флавоноиды активно используются в пищевой промышленности и медицине. Оба флавоноида относятся к группе фенольных соединений, обладающих антиоксидантным действием, и поэтому могут использоваться совместно с аскорбиновой кислотой для повышения проницаемости капилляров. В окислительных реакциях дигидрокверцетин способен выполнять роль донора атомов водорода. Как антиоксидант дигидрокверцетин активно используется в пищевой промышленности для защиты продуктов от действия активных форм кислорода [6, 7]. В медицинской практике дигидрокверцетин и кверцетин применяются для лечения лучевой болезни, септического эндокардита, для профилактики поражений капилляров и др. [8].

Ферроцианид калия относится к субстратам пероксидазы, для которых возможен непосредственный контакт с гемом фермента [2], хотя известно, что при значениях pH, близких к нейтральным, гемин в пероксидазе недоступен даже для малых ионов из раствора [3]. Поэтому исследование реакций совместного окисления дигидрокверцетина и ферроцианида калия позволяет изучить механизмы взаимного влияния субстратов, а также выявить механизмы действия фермента. Наличие таких знаний позволяет понять особенности существования и функционирования живых организмов. В частности, раскрыть механизмы, обеспечивающие существование организмов в состоянии гипобиоза, так как пероксидаза, каталаза и различные оксидазы входят в состав системы, поддерживающей жизнеспособность гипобиотических организмов.

Нами изучены реакции совместного окисления дигидрокверцетина и ферроцианида калия в широком диапазоне pH и предложен механизм действия фермента в этом каталитическом процессе.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена (“*Reanal*”, Венгрия) со спектральным показателем

чистоты $RZ = 1,0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически [9] и по пиридингеохромогену [10]. Использовали дигидрокверцетин и ферроцианид калия (“*Биопрепарат*”, Россия). Концентрацию перекиси водорода (“*Реахим*”, Россия) определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения при 230 нм $72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [11].

Методы. Реакцию окисления дигидрокверцетина (34–120 мкМ) или ферроцианида калия (160–600 мкМ) перекисью водорода (0,64 мМ) проводили при 25°. В качестве буфера использовали 0,1 М натрий-ацетатный раствор (pH 4,5–6,0) или 0,1 М натрий-фосфатный раствор (pH 6,0–8,0), концентрация пероксидазы хрена составляла 4,0–18,0 нМ. Реакцию совместного окисления дигидрокверцетина и ферроцианида калия изучали по возрастанию поглощения при 420 нм ($\epsilon = 1050 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12]). Кинетические кривые снимали на двухлучевом спектрофотометре “DMS 100 S” (“*Varian*”, США). За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Кажущиеся константы скорости окисления субстратов пероксидазы определяли из данных по стационарной кинетике [13].

Результаты исследований

На рис. 1 приведены спектры поглощения продуктов пероксидазного окисления дигидрокверцетина, максимум поглощения которых приходится на 405 нм. Исследование индивидуальных реакций пероксидазного окисления ферроцианида калия позволило установить максимум поглощения продуктов реакции при

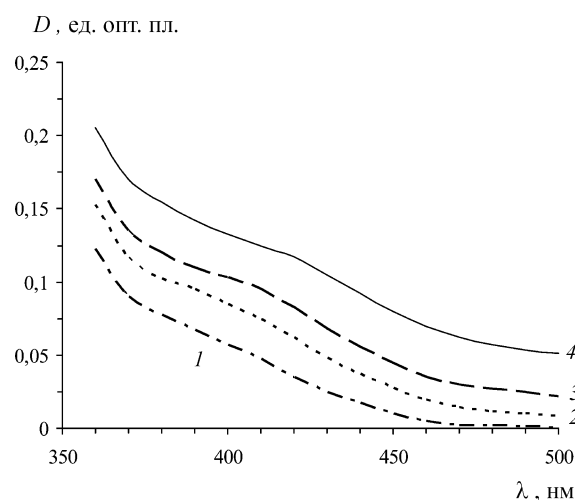


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов пероксидазного окисления дигидрокверцетина. Время реакции, мин: 2 (1), 4 (2), 7 (3), 17 (4); концентрация пероксидазы 18 нМ, H_2O_2 – 0,64 мМ, дигидрокверцетина – 68 мкМ (pH 6,0); скорость сканирования 100 нм/мин

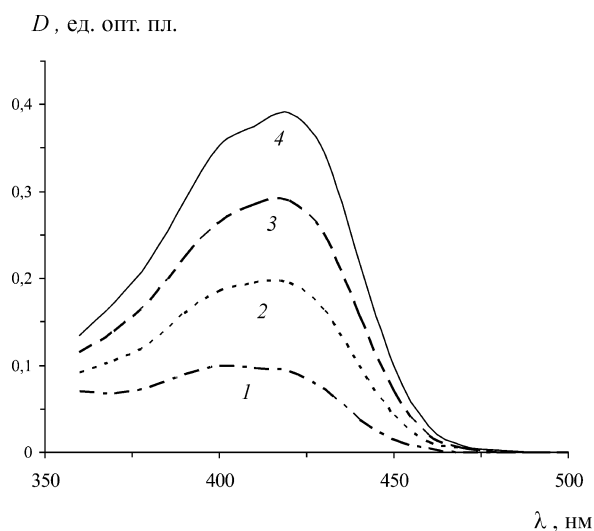


Рис. 2. Спектры поглощения продукта пероксидазного окисления ферроцианида калия. Время реакции, мин: 2 (1), 4 (2), 7 (3), 17 (4); концентрация пероксидазы 18 нМ, H_2O_2 – 0,64 мМ, ферроцианида калия – 400 мкМ (рН 6,0); скорость сканирования 100 нм/мин

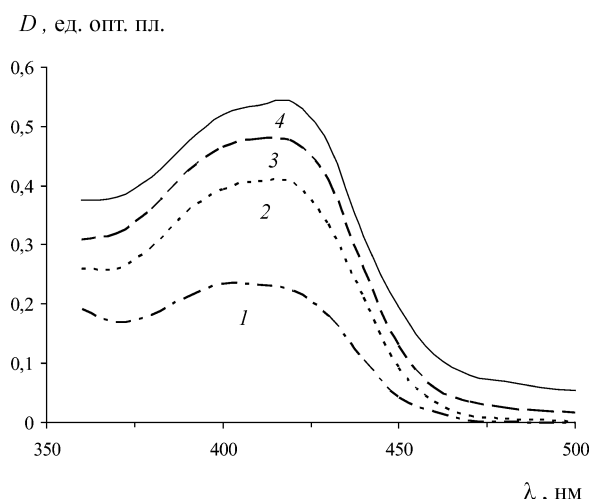


Рис. 3. Спектры поглощения продуктов совместного пероксидазного окисления дигидрохверцетина и ферроцианида калия. Время реакции, мин: 2 (1), 4 (2), 7 (3), 17 (4); концентрация пероксидазы 18 нМ, H_2O_2 – 0,64 мМ, дигидрохверцетина – 68 мкМ, ферроцианида калия – 400 мкМ (рН 6,0)

420 нм (рис. 2), что соответствует литературным данным [14].

Анализ спектров поглощения продуктов совместного пероксидазного окисления дигидрохверцетина (ДГКВ) и ферроцианида калия (ФК) позволил выявить, что при совместном присутствии в реакционной среде ДГКВ и ФК окислению вначале подвергается ферроцианид калия (рис. 3). Из разностного спектра продуктов окисления ДГКВ и ФК видно, что в течение первых 15 мин протекания реакции окисления определяется продукт с максимумом поглощения при

420 нм (рис. 4). В дальнейшем максимум поглощения продуктов реакции смещается к 405 нм, что соответствует продукту окисления ДГКВ. Поэтому реакции совместного окисления ДГКВ и ФК в дальнейшем исследовались при 420 нм, что позволило установить активирующее действие ДГКВ на пероксидазное окисление ферроцианида калия (рис. 5). При этом был выявлен синергистический тип активации, проявляющийся в том, что точка пересечения пучка прямых в обратных координатах Лайнуивера–Берка, соответствующих различным концентрациям дигидрохверцетина, находится на оси ординат. Аналогичные зависимости были получены при рН 4,5–7,0. При рН $\geq 7,5$ мы наблюдали окисление только дигидрохверцетина. Постоянную константу активирования (α) определяли путем построения графика в координатах $K_m(K_m - K_{m(\text{каж})})$, $1/\text{ДГКВ}$ (рис. 6). Значения кинетических констант для реакции совместного окисления дигидрохверцетина и ферроцианида калия при различных значениях рН показаны в таблице.

Обсуждение результатов

Все субстраты пероксидазы условно делят на две группы – медленно и быстро окисляемые. К группе быстро окисляемых относят субстраты с величиной $k_{\text{кат}} > 10^3 \cdot \text{с}^{-1}$ [3].

Из таблицы видно, что на основании данных реакций индивидуального окисления ДГКВ и ФК их можно отнести к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы. При этом оптимум каталитической

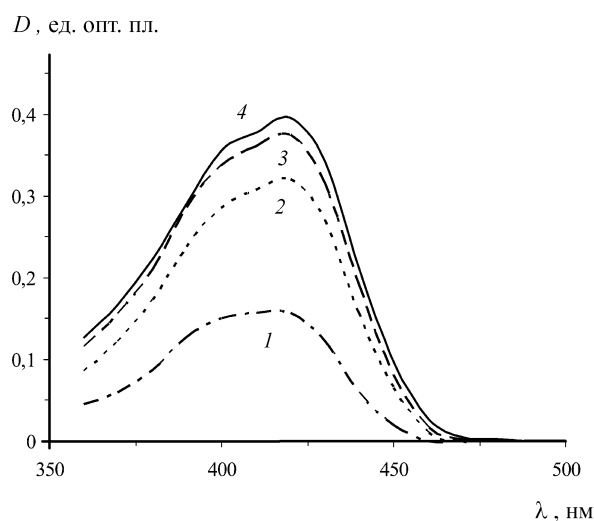


Рис. 4. Разностный спектр поглощения продуктов реакций совместного окисления ДГКВ и ФК, регистрируемые в течение 2 (1), 4 (2), 7 (3), 17 (4) мин. Условия представлены в подписи к рис. 3

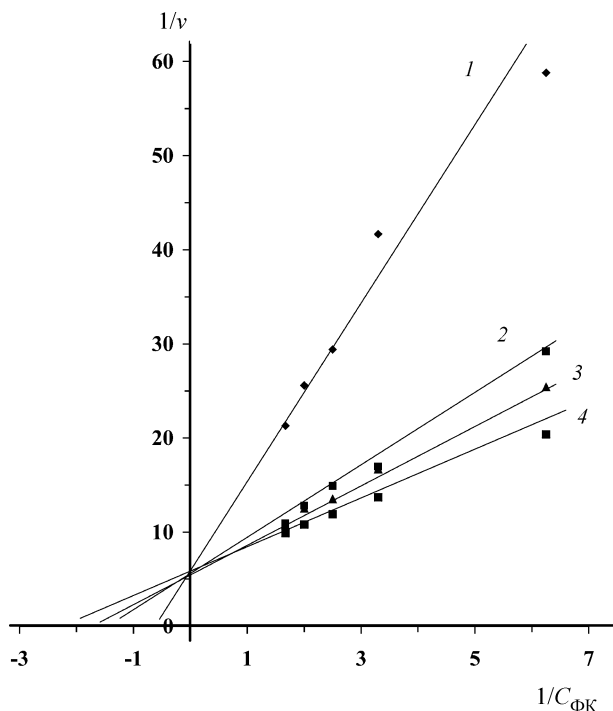


Рис. 5. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления ферроцианида калия в координатах Лайнуивера–Берка при разных концентрациях дигидроаскорбины (мкМ): 0 (1), 34,0 (2), 47,6 (3), 68,0 (4); концентрация пероксидазы 4 нМ, ферроцианида калия – 160–600 мкМ; Н₂О₂ – 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 5,5)

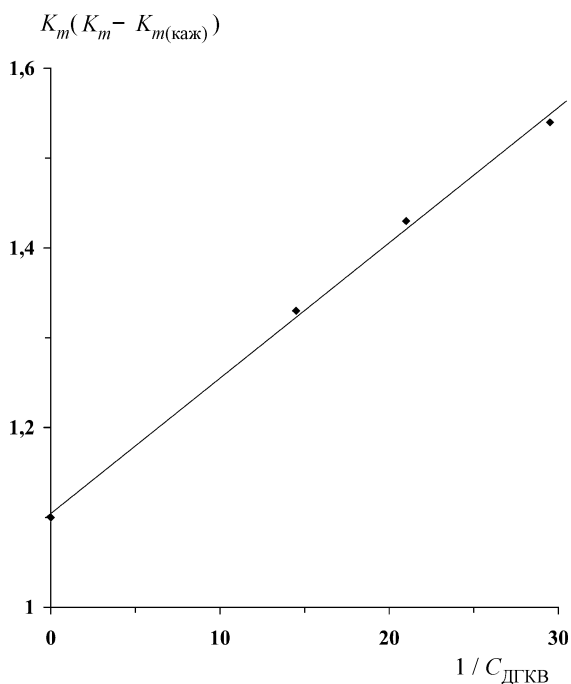


Рис. 6. Зависимость значений $K_m / (K_m - K_{m(каж)})$ от обратной концентрации дигидроаскорбины. Условия представлены в подписи к рис. 3

активности фермента в реакциях пероксидазного окисления дигидроаскорбина приходится на щелочную область рН (рН>6,5), тогда как у ферроцианида калия он проявляется в кислой области при рН<4,5. Данные, полученные для ферроцианида калия, соответствуют литературным [15].

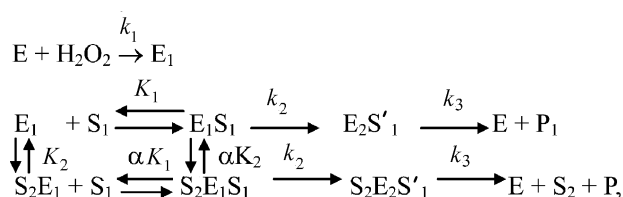
Анализ кинетических данных, представленных в таблице, свидетельствует о том, что величина K_m связывания для ферроцианида калия в 10–15 раз лучше, чем у ДГКВ, но ухудшается с возрастанием рН.

Таким образом, в случае присутствия в среде этих двух субстратов (дигидроаскорбина и ферроцианида) пероксидазы преимущество в связывании будет иметь ферроцианид, что и проявляется в реакции их совместного окисления. Однако эффективность превращения ферроцианида в активном центре фермента с возрастанием рН понижается, что выражается в низких значениях $k_{кат}$. По-видимому, с изменением рН происходят конформационные перестройки в области активного центра фермента, оказывающие влияние как на связывание ферроцианида, так и на его превращение.

Проявление каталитических свойств дигидроаскорбина в пероксидазных реакциях обусловлено его стереоспецифичностью [16, 17]. ДГКВ может присутствовать в растворе в виде *цис*- и *транс*-форм. Причем в реакциях окисления преимущественно участвует *транс*-форма [18]. Поэтому проявление высокой активности фермента в реакциях пероксидазного окисления дигидроаскорбина, наблюдаемое в щелочной области, обусловлено присутствием ДГКВ в виде *транс*-формы.

При совместном присутствии в среде ДГКВ и ФК окислению подвергается ферроцианид калия. Наблюдаемый синергистический тип активации свидетельствует о том, что связывание ДГКВ с активным центром пероксидазы увеличивает сродство фермента к ферроцианиду, и наоборот. При этом каталитические постоянные могут приобретать следующее значение: $\alpha < 1$, $\beta = 1$ [13].

Для объяснения кинетики совместного окисления ферроцианида и дигидроаскорбина предложена следующая схема:



Каталитические константы реакции совместного окисления ферроцианида калия в присутствии дигидрохверцетина

| pH | $K_m(\text{ДГКВ}), \text{ мМ}$ | $k_{\text{кат}}(\text{ДГКВ}), \text{ с}^{-1}$ | $K_m(\text{ФК}), \text{ мкМ}$ | $k_{\text{кат}}(\text{ФК}), \text{ с}^{-1}$ | $K_a(\text{ФК}+\text{ДГКВ}), \text{ мкМ}$ | α |
|-----|--------------------------------|---|-------------------------------|---|---|-------------|
| 4,5 | 1,40±0,045 | 1,43±0,04 | 63±1,9 | 600±22 | 247±7,8 | 0,470±0,014 |
| 5,0 | 0,89±0,037 | 1,32±0,03 | 300±9,5 | 300±12 | 209±6,5 | 0,250±0,084 |
| 5,5 | 2,72±0,093 | 4,63±0,14 | 160±5,2 | 270±8,7 | 138±4,3 | 0,096±0,005 |
| 6,0 | 2,08±0,064 | 14,90±0,52 | 170±5,8 | 200±6,5 | 197±5,9 | 0,095±0,004 |
| 6,5 | 0,52±0,015 | 54,50±1,64 | 180±5,6 | 120±3,9 | 147±4,8 | 0,075±0,003 |
| 7,0 | 0,57±0,018 | 134,20±4,14 | 280±8,8 | 60±1,9 | 78±2,6 | 0,725±0,025 |
| 7,5 | 1,00±0,035 | 277,00±8,56 | 400±15,3 | 55±2,1 | нет | нет |
| 8,0 | 0,61±0,019 | 154,30±4,62 | 450±13,5 | 52±2,0 | нет | нет |

где E, E₁, E₂ – нативная и окисленные формы фермента, S₁ – ферроцианид калия, S₂ – дигидрохверцетин, E₁S₁, S₂E₁, E₂S'₁ – комплексы окисленных форм пероксидазы с субстратами, S₂E₁S₁, S₂E₂S'₁ – комплексы окисленных форм фермента с ДГКВ и ФК, K₁, K₂ – константы диссоциации соответствующих комплексов окисленных форм фермента с субстратами, k₁, k₂, k₃ – каталитические константы.

Исследование механизмов реакций индивидуального и совместного окисления позволило выявить, что в действии пероксидазы заложен сложный регуляторный механизм. При этом в реакциях окисления ферроцианида и дигидрохверцетина выявлены максимумы каталитической пероксидазы для этих субстратов, которые проявились в реакциях окисления ферроцианида в кислой области pH, а у дигидрохверцетина – в щелочной. Проявление низкой активности фермента в индивидуальных реакциях окисления дигидрохверцетина в кислой области pH, по-видимому, обусловлено присутствием в среде мало активной *цис*-формы субстрата.

При совместном присутствии в среде ФК и ДГКВ последний улучшает связывание ферроцианида, ускоряя его дальнейшее превращение.

В щелочных pH в среде преобладает *транс*-форма ДГКВ, которая способна конкурировать с ФК за

центр связывания. Поэтому преимущественное связывание *транс*-формы ДГКВ с активным центром вызывает протекание процесса его пероксидазного окисления при pH ≥ 7,5.

Таким образом, присутствие в кислой среде *цис*-формы ДГКВ способствует преимущественно окислению медленно окисляемого субстрата (ферроцианида). При этом ДГКВ способен ускорять протекание каталитического процесса. Однако при смещении pH в щелочную область появляется *транс*-форма дигидрохверцетина, способная конкурировать с ферроцианидом за участок связывания в активном центре и самостоятельно участвовать в каталитическом процессе. Данный механизм обусловлен тем, что участки связывания *цис*- и *транс*-формы ДГКВ в активном центре пероксидазы различны, связывание *транс*-формы ДГКВ происходит в участке связывания ферроцианида, возникает конкуренция субстратов, тогда как *цис*-форма, связываясь в другом участке активного центра, ускоряет протекание его окисления. По-видимому, ДГКВ способен в биогенных системах выполнять роль триггера и в зависимости от pH инициировать или останавливать реакции пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов, включаясь в этот процесс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chance B.* // J. Biol. Chem. 1943. **151**. P. 553.
2. *Лебедева О.В., Узарова Н.Н.* // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 1. С. 25.
3. *Узарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П.* Пероксидазный катализ и его применение. М., 1981.
4. *Рогожин В.В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб., 2004.
5. *Turnbull J.J., Sobey W.J., Aplin R.T., Hassan A., Firmin J.L., Schofield C.J., Prescott A.G.* // Chem. Commun. 2000. **24**. P. 2473.
6. *Madsen H.L., Anderson C.M., Jorgensen L.V., Skilsted L.H.* // Eur. Food. Res. Technol. 2000. **211**. P. 240.
7. *Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J.* // Biochem. Biophys. Acta. 1995. **1234**. P. 99.
8. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Т 2. М., 2002.
9. *Ogawa S., Shira Y., Morishima I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. **90**. P. 674.
10. *Falk J.E.* Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam, 1964.
11. *George P.* // Biochem. J. 1953. **54**. P. 267.
12. *Chance B.* // Science. 1949. **109**. P. 204.
13. *Березин И.В., Клесов А.А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976.
14. *Hasinoff F., Dunford H.B.* // Biochemistry. 1970. **9**. P. 4930.
15. *Лебедева О.В., Узарова Н.Н., Березин И.В.* // Биохимия. 1981. **46**. С. 1202.
16. *Madsen H.L., Anderson C.M., Jorgensen L.V., Skilsted L.H.* // Eur. Food. Res. Technol. 2000. **211**. P. 240.
17. *Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J.* // Biochem. Biophys. Acta. 1995. **1234**. P. 99.
18. *Turnbull J.J., Sobey W.J., Aplin R.T., Hassan A., Firmin J.L., Schofield C.J., Prescott A.G.* // Chem. Commun. 2000. P. 2473.

Поступила в редакцию 10.09.09

KINETICS OF INDIVIDUAL AND COMBINED OXIDATION OF DIHYDROQUERCETIN AND POTASSIUM FERROCYANIDE CATALYZED BY HORSERADISH PEROXIDASE

V.V. Rogozhin, D.V. Peretolchin

(Yakutsk State Agricultural Academy)

The study-state kinetics of individual and cooxidation of ferrocyanide and dihydroquercetin catalyzed by horseradish peroxidase was studied. It is shown, that ferrocyanide and dihydroquercetin are slowly oxidized substrata peroxidase. In an interval pH 4,5-8,0 sizes k_{cat} and K_m for these substrata peroxidase are certain. In reactions of cooxidation substrata was revealed, that at pH 4,5-7,0 dihydroquercetin accelerated oxidation ferrocyanide. At pH 7,5 oxidation only dihydroquercetin was observed. Mechanisms of reactions of combined oxidation ferrocyanide and dihydroquercetin are offered.

Key words: *horseradish peroxidase, dihydroquercetin, ferrocyanide, enzyme catalysis.*

Сведения об авторах: *Рогожин Василий Васильевич* – профессор, зав. лабораторией исследования БАВ ЯГСХА, докт. биол. наук, (vrogozhin@mail.ru); *Перетолчин Денис Валерьевич* – ассистент кафедры агробиохимии Якутской государственной сельскохозяйственной академии.