

УДК: 541.183:577.152.111*17.03

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ И СОЛЕЙ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В РАСТВОРЕ

Т. А. Аникеева, В. В. Егоров

(Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Скрябина, 23)

Изучено влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ): липидов и солей жирных кислот на активность гемсодержащей пероксидазы хрена в растворе. Обнаружено снижение скорости пероксидазной реакции в области низких концентраций ПАВ. Последующее увеличение их количества в растворе приводит сначала к возрастанию скорости ферментативной реакции, а потом к ее снижению вплоть до нуля в случае солей жирных кислот. Начальное снижение скорости пероксидазной реакции – результат ингибирования фермента ПАВ-ом вследствие его адсорбции в «гидрофобном кармане» белка вблизи активного центра. Последующее рост скорости связан с увеличением доступности для субстрата и возрастанием активности каталитического центра белка, что подтверждается снижением энергии активации. В области максимальных концентраций ПАВ уменьшение скорости ферментативной реакции объясняется экранированием белка ассоциатами поверхностно-активных веществ.

Долгое время считалось, что липидам принадлежит довольно скромная роль в жизнедеятельности клеток – служить строительным материалом мембран и формой депонирования запасов метаболического топлива. Однако выяснилось, что они являются активными компонентами биологических мембран, в частности обладают способностью к взаимодействию с интегральными и периферическими белками [1].

Особое значение имеет влияние липидов на каталитическую активность белков. Уменьшение активности ряда ферментов при отделении липидов, а затем возвращение ее к норме после их добавления (реактивации) дало основания для выделения особых липид-зависимых ферментов [2]. Остается открытым вопрос о влиянии природы липида, его строения и концентрации на мембранный фермент. Изучению воздействия липидов и солей жирных кислот (СЖК) на интегральный белок – пероксидазу хрена посвящена настоящая работа.

Методы исследования

В работе использовали липиды (выделенные из молока коров черно-пестрой породы по методу Фолча [3]) : фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, холестерин, сфингомиелин, а также соли жирных кислот (СЖК): пальмитат натрия, пальмитат калия, стеарат натрия, стеарат калия и пероксидазу хрена (*Reanal*, Венгрия) без дополнительной очистки.

Субстрат 5-аминосалициловую кислоту брали в концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М (определяли спектрофотометрически на СФ-16 при λ 455 нм и $\epsilon = 4,5 \cdot 10^4$ М⁻¹см⁻¹

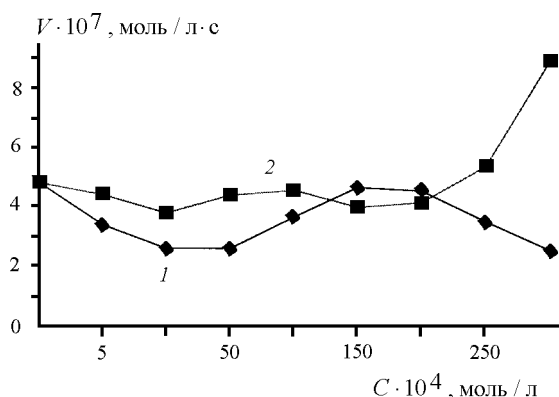


Рис. 1. Скорость ферментативной реакции при различных концентрациях: 1 – фосфатидилэтаноламина, 2 – сфингомиелина ([E] = $3 \cdot 10^{-8}$ М, [H₂O₂] = $3 \cdot 10^{-3}$ М, [S] = $3 \cdot 10^{-3}$ М, pH 7,2; 20°)

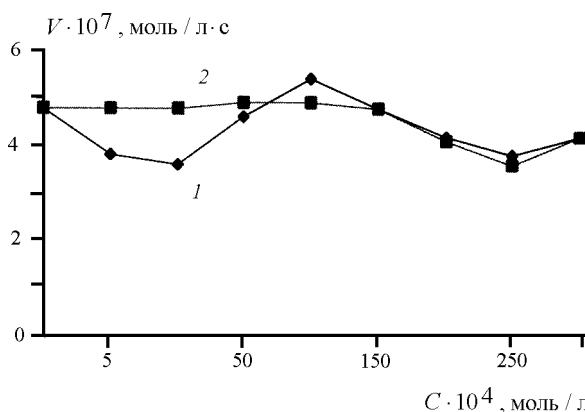


Рис. 2. Скорость ферментативной реакции при различных концентрациях: 1 – фосфатидилсерина, 2 – холестерина ([E] = $3 \cdot 10^{-8}$ М, [H₂O₂] = $3 \cdot 10^{-3}$ М, [S] = $3 \cdot 10^{-3}$ М, pH 7,2; 20°)

Таблица 1

Силы отрыва пластинки Вильгельми от поверхности водных растворов липидов

Липид С, моль/л	P, мг	СЖК С, моль/л	P, мг
ФЭ		ПМNa	
10 ⁵	205	10 ⁵	212
10 ⁴	187	10 ⁴	195
10 ³	172	10 ³	175
ФС		ПМ-К	
10 ⁵	204	10 ⁵	208
10 ⁴	189	10 ⁴	185
10 ³	175	10 ³	172
СФ		СТ-Na	
10 ⁵	187	10 ⁵	201
10 ⁴	177	10 ⁴	188
10 ³	162	10 ³	162
Х		СТ-К	
10 ⁵	195	10 ⁵	195
10 ⁴	177	10 ⁴	177
10 ³	154	10 ³	155

(3) непосредственно перед опытом). Концентрация субстрата выбрана ниже порога ингибирования [4].

Активность пероксидазы в водном фосфатном буфере (0,03 М, pH 7,2) при температуре 20° исследовали спектрофотометрическим методом на СФ-16 при $\lambda = 455$ нм ($\epsilon = 4,5 \cdot 10^4$ М⁻¹см⁻¹) в соответствии с [4]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при $\lambda = 403$ нм с коэффициентом экстинции 102100 М⁻¹см⁻¹ [5].

Образцы для исследования готовили следующим образом. В водном фосфатном буфере растворяли фермент, субстрат и липид, инкубировали 10 мин и прибавляли перекись водорода ($3 \cdot 10^{-2}$ М). Концентрацию перекиси водорода определяли методом перманганатометрического титрования. Поверхностное натяжение на границе с воздухом растворов липидов в водном фосфатном буфере определяли методом Вильгельми на торсионных весах типа ВТ при 20° [6]. Энергию активации определяли из зависимости логарифма скорости процесса от величины обратной температуры по методу Аррениуса [7].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены значения поверхностного натяжения (силы отрыва пластинки Вильгельми) водных растворов липидов на границе с воздухом. Видно, что все исследованные соединения уменьшают поверхностное натяжение воды, т.е. являются поверхностно-активными, причем активность зависит от строения соединения.

На рис. 1–4 приведены зависимости максимальной скорости (относительная погрешность измерения около 10%) пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты при насыщающих концентрациях субстратов от концентрации ПАВ для всех изученных соединений. Анализ рисунков показывает, что на первом участке в области низких концентраций ПАВ скорость реакции снижается, на втором участке возрастает и далее вновь снижается при увеличении концентрации ПАВ в растворе. Такой характер зависимости обнаружен для всех исследованных соединений (исключение составляли холестерин и сфингомиелин). Это согласуется с полученными ранее данными для различных типов ионогенных ПАВ [8, 9] и объясняется следующим образом.

Начальное снижение скорости реакции (ингибирование фермента) может происходить в результате адсорбции поверхностно-активных веществ (липидов, СЖК) в «гидрофобном кармане» пероксидазы вблизи активного центра. В пользу этого свидетельствует тот факт, что ПАВ

Таблица 2

Энергия активации ферментативной реакции. 289–303 К

ПАВ	Концентрация липида, моль/л	Энергия активации, кДж/моль
Контроль	–	45,7
Пальмитат натрия	10^3	35,5
	10^2	18,9
	$2,5 \times 10^2$	8,3
Стеарат натрия	10^3	33,2
	10^2	18,9
	$2,5 \times 10^2$	8,3
Фосфатидилэтаноламин	10^3	23,9
	10^2	13,6
	$2,5 \times 10^2$	6,0
Фосфатидилсерин	10^3	29,3
	10^2	15,4
	$2,5 \times 10^2$	4,5
Холестерин	10^3	33,2
	10^2	18,9
	$2,5 \times 10^2$	10,1

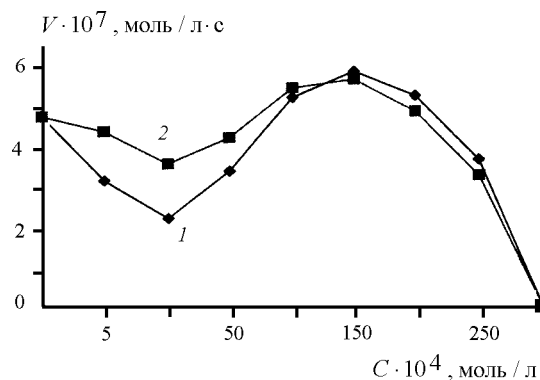


Рис. 3. Скорость ферментативной реакции при различных концентрациях: 1 – пальмитата калия, 2 – пальмитата натрия ($[E] = 3 \cdot 10^{-8}$ М, $[H_2O_2] = 3 \cdot 10^{-3}$ М, $[S] = 3 \cdot 10^{-3}$ М, pH 7,2; 20°C)

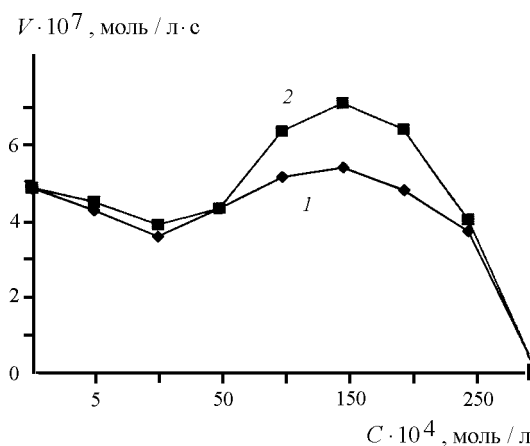


Рис. 4. Скорость ферментативной реакции при различных концентрациях: 1 – стеарата калия, 2 – стеарата натрия ($[E] = 3 \cdot 10^{-8}$ М, $[H_2O_2] = 3 \cdot 10^{-3}$ М, $[S] = 3 \cdot 10^{-3}$ М, pH 7,2; 20°C)

сами подвергаются каталитическому окислению перекисью водорода в присутствии фермента. В частности, скорость окисления пероксидом водорода стеарата и олеата натрия возрастает в 2–3 раза при добавлении пероксидазы (по данным хемилюминесценции). Таким образом, речь может идти о ингибировании окисления одного специфического субстрата другим неспецифическим (ПАВ).

Наибольший темп снижения скорости на данном участке (рис. 1–4) и минимальная ее величина наблюдаются в ряду СЖК для пальмитата калия, обладающего промежуточной поверхностной активностью и имеющего определенную геометрию и размер молекулы, возможно близкий размеру полости в районе активного центра фермента. В ряду липидов аналогичный результат также наблюдается для промежуточного по поверхностной активности фосфатидилэтаноламина (табл. 1).

Последующее возрастание скорости ферментативной реакции на втором участке (активация фермента) является, по-видимому, результатом совокупного действия двух факторов: увеличения доступности для субстрата и воз-

растания активности каталитического центра белка в результате встраивания последнего в ассоциаты ПАВ (мицеллы, липосомы) [6]. Прямым доказательством увеличения активности пероксидазы является снижение энергии активации ферментативной реакции в присутствии ПАВ (табл. 2). Можно полагать, что эти соединения увеличивают активность каталитического центра главным образом в результате изменения конформации его ближайшего окружения в пероксидазе (показано исследованием кругового дихроизма белка).

Из табл. 2 видно, что энергия активации ферментативной реакции при добавлении фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина снижается более значительно по сравнению с другими липидами. Это может быть следствием их высокой поверхностной активности (табл. 1) и способности более существенно изменять конформацию белка по сравнению с другими ПАВ. Можно предположить, что в мембране данные липиды находятся в непосред-

ственной близости от фермента и таким образом «управляют» его активностью. В то же время холестерин, как следует из наших данных (рис. 2, табл. 2), не столь значительно влияет на активность пероксидазы и вероятно располагается в бислое на значительном расстоянии от белка. По-видимому, его роль сводится в основном к поддержанию структуры мембраны, приданию ей определенной жесткости и прочности [2].

В области максимальных концентраций липидов и СЖК наблюдается вторичное снижение скорости ферментативной реакции, что мы объясняем чисто стерическим фактором – экранированием белка ассоциатами ПАВ, агломераты которых заметны визуально в этой области.

Таким образом, в работе установлено, что органические мембранообразующие ПАВ – липиды и соли жирных кислот являются активными компонентами биологических мембран, в частности способны «управлять» активностью интегральных белков, например ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия. М., 1987.
2. Введение в биомембранологию / Под ред. А.А. Болдырева. М., 1990.
3. *Баранова В.С.* Липиды молока. Методические указания. М., 1985.
4. *Лебедева О.М.* Кинетика и механизм действия гемсодержащей пероксидазы с ограниченными субстратами и физиологически активными веществами. Дисс. ... канд. хим. наук. М., 1980.
5. *Smith K.M.* Porphyrins and Metalloproteins. Amsterdam, 1975. P. 757.
6. *Абрамзон А.А., Боброва Л.Е.* и др. Поверхностноактивные явления и поверхностно-активные вещества. Ленинград, 1984. С. 166.
7. *Простов Ю.П., Леонова Л.А., Литвишко В.С., Новиков В.С.* Лабораторный практикум по общей и неорганической химии. М., 1992.
8. *Давлетшин А.И., Егоров В.В.* // Биоорганическая химия. 1998. 24. №6. С. 426.
9. *Давлетшин А.И., Егоров В.В.* // Биоорганическая химия. 1998. 24. №6. С. 430.

Поступила в редакцию 21.12.99