

УДК 577.15.04:546.21.541.515

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

**ВЛИЯНИЕ ПЕРЕХВАТЧИКОВ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА НА РАСЩЕПЛЕНИЕ КРАХМАЛА α -АМИЛАЗОЙ***(Представлено академиком О. А. Стрельченко)*

Механизм каталитической функции энзимов-гидролаз остается пока недостаточно ясным. Ранее были получены факты [1, 2], позволяющие считать, что ряд реакций протеолиза: активация плазминогена стрептокиназой, активация трипсиногена, катализируемое папаином или пепсином расщепление белков протекают при обязательном участии активных форм кислорода. Последние генерируются самим зимогеном или системой протеиназа—субстрат [3, 4]. В этой связи была предположена возможность участия активированного кислорода в каталитической функции не только протеиназ, но и других гидролаз [5].

Это побудило нас изучить влияние перехватчиков активных форм кислорода на расщепление картофельного крахмала α -амилазами микробного и животного происхождения.

В работе использовали образцы очищенных α -амилаз (КФ 3.2.1.1) поджелудочной железы кролика (Reanal, Венгрия), и *Bac. subtilis* (любезно предоставлена докт. биол. наук В. Г. Бабицкой, Институт микробиологии АН Беларуси); Cu, Zn-супероксиддисмутаза (Sigma, США), каталаза печени, L-гистидин, DL-триптофан, DL-метионин (Reanal, Венгрия), формиат натрия, азид натрия (Serva, Германия), D-маннит (Chemapol, Чешская Республика). Остальные реактивы и соли были производства стран СНГ, их подвергали дополнительной очистке.

Предварительные исследования показали невозможность использования для определения активности α -амилазы в присутствии большинства перехватчиков активных форм кислорода широко распространенных методов, основанный на йод-крахмальной реакции (например, [6]) или на реакции с *O*-толуидином [7]. В этих условиях окрашенные комплексы не образовывались. Поэтому активность энзима определяли по изменению мутности раствора картофельного крахмала [8]. Состав реакционной смеси: раствор крахмала (25 г/л) в дистиллированной воде — 1,0 мл; 0,05 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,8—1,5 мл; раствор амилазы в буфере — 0,1 мл; раствор исследуемого перехватчика или дистиллированная вода — 0,4 мл. Кинетику уменьшения мутности $\Delta\tau$ среды регистрировали при длине волны 720 нм, температуре 25 °С с интервалами в 30 с, используя кюветы с длиной оптического пути 1 см. Пробы сравнения содержали продукты расщепления крахмала амилазой, полученные путем инкубации энзима с раствором субстрата при 37 °С в течение 2 ч, а также добавки соответствующих эффекторов. О расщеплении крахмала судили по убыли мутности раствора

$$\Delta\tau = \frac{\tau_0 - \tau_i}{\tau_0}, \text{ \%}, \text{ за 1 мин реакции.}$$

Таблица 1. Величина убыли мутности раствора крахмала ($\Delta\tau$, %) после расщепления его α -амилазами *Bac. subtilis* и поджелудочной железы кролика в присутствии перехватчиков активных форм кислорода (0,05 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,8, 25 °С, время реакции 1 мин, концентрация энзима 50 мкг/мл; $n=5$)

Перехватчики	Амилаза бацилл		Амилаза поджелудочной железы	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
L-гистидин, 10^{-2} М	50,7 \pm 6,3	29,5 \pm 2,1	50,3 \pm 4,1	50,2 \pm 3,9
DL-триптофан, 10^{-2} М	67,0 \pm 8,2	52,7 \pm 6,4	50,3 \pm 4,1	50,0 \pm 2,2
DL-метионин, 10^{-2} М	44,4 \pm 5,7	30,1 \pm 5,2	50,3 \pm 4,1	61,2 \pm 4,8
Азид натрия, $2 \cdot 10^{-1}$ М	68,8 \pm 6,2	33,4 \pm 4,0*		
10^{-1} М		37,3 \pm 3,5*	53,7 \pm 3,6	61,7 \pm 8,3
$5 \cdot 10^{-2}$ М		60,0 \pm 5,6		
Формиат натрия, 10^{-2} М	44,4 \pm 5,7	42,5 \pm 3,0	53,7 \pm 3,6	79,6 \pm 4,5*
D-маннит, 10^{-2} М	44,4 \pm 5,7	43,7 \pm 2,5	49,2 \pm 4,1	45,6 \pm 5,0
Супероксиддисмутаза 350 мкг	64,5 \pm 3,8	66,8 \pm 4,3	58,9 \pm 2,9	56,9 \pm 4,6

* Здесь и далее статистически достоверные ($P \leq 0,05$) изменения по отношению к контролю.

Содержание белка в образцах амилазы определяли колориметрическим методом [9].

Все исследования выполнены не менее, чем четырехкратно.

Аминокислоты-перехватчики синглетного кислорода почти не влияли на активность панкреатической амилазы, но несколько угнетали расщепление крахмала гидролазой бацилл, особенно заметно — гистидином (табл. 1). Иной по химической структуре перехватчик — азид натрия — угнетал расщепление полисахарида микробной, но не панкреатической амилазой. Эффект перехватчика был выражен лишь при достаточно высокой его концентрации. Столь разная чувствительность двух амилаз к перечисленным соединениям не вызывает недоумения: данные литературы свидетельствуют о весьма значительных отличиях структуры α -амилаз из различных источников [10]. Эффективность же перехватчиков определяется как наличием в растворе существенных для энзиматического действия свободных форм активированного кислорода, так и доступностью областей макромолекулы энзима, катализи-

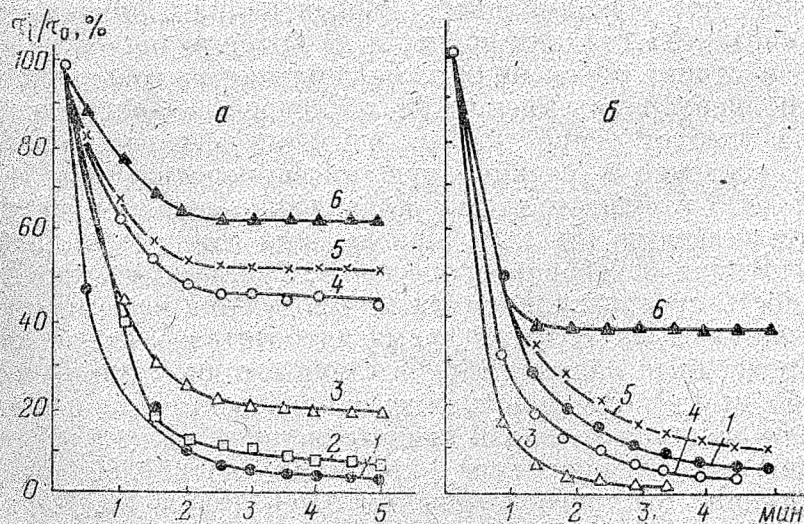


Рис. 1. Кинетика изменения мутности раствора картофельного крахмала при действии α -амилаз из *Bac. subtilis* (а) и из поджелудочной железы (б) после добавок нитротетразолиевого синего. Растворитель — 0,05 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,8, температура 25 °С, концентрация крахмала 10 г/л, концентрация амилазы — 30 мкг/мл, 1 — контроль; концентрация перехватчика: $5 \cdot 10^{-5}$ М (2), 10^{-4} М (3), $5 \cdot 10^{-4}$ М (4), 10^{-3} М (5), $2 \cdot 10^{-3}$ М (6)

рующих генерирование активных форм кислорода и (или) трансформацию их.

Добавки перехватчиков $\cdot\text{OH}$ -радикала (формиата, маннита) не влияли на процесс расщепления крахмала, катализируемого α -амилазой бацилл. В то же время формиат (но не маннит), судя по полученным данным, усиливал деполимеризацию, катализируемую панкреатической гидролазой. Возможно, происходит удаление присутствующих в системе

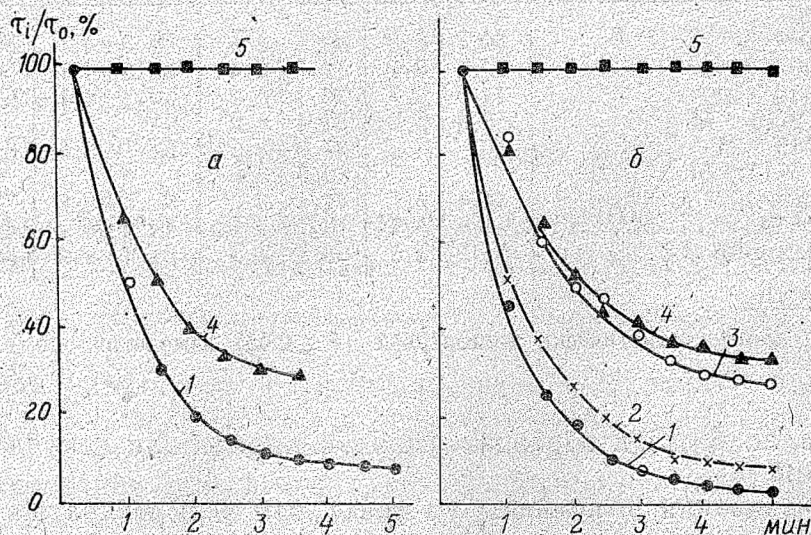


Рис. 2. Влияние добавок каталазы печени на кинетику изменения мутности раствора крахмала под действием α -амилазы *Bac. subtilis* (а) и поджелудочной железы (б). Условия те же, что на рис. 1. Концентрация каталазы (мкг/мл) — 0 (1), 240 (2), 480 (3), 600 (4), 1200 (5)

свободных $\cdot\text{OH}$, способных вызывать повреждение различных функциональных групп белков [11].

Действие перехватчиков супероксидного радикала зависело от природы этих соединений. Так, супероксиддисмутаза не влияла на расщепление полисахарида (табл. 1), а нитротетразолиевый синий вызвал подавление процесса, катализируемого обеими амилазами (рис. 1). Однако в опытах с микробной амилазой угнетение наблюдалось при концентрации перехватчика $\geq 10^{-4}$ М, а в случае панкреатической гидролазы — лишь при максимальной концентрации, причем наиболее четко — на «поздних» стадиях процесса. В более низких концентрациях добавки перехватчика обусловили даже тенденцию к ускорению деполимеризации полисахарида. Раскрытие последней особенности действия перехватчика требует углубленного изучения выявленного эффекта.

Наконец, введение в реакционную смесь перехватчика H_2O_2 -каталазы также вело к существенному подавлению реакции, катализируемой обеими амилазами (рис. 2). При высокой концентрации каталазы достигалась полная остановка процесса. Это обстоятельство проясняет неэффективность супероксиддисмутазы: продуктом катализируемой ею реакции является H_2O_2 . В то же время нитротетразолиевый синий связывает супероксидный радикал, препятствуя его дисмутации в перекись и каким-либо другим превращениям. Полное снятие азидом натрия ингибиторного действия каталазы свидетельствует, на наш взгляд, о том, что ингибирование расщепления крахмала каталазой реализуется вследствие именно быстрого устранения H_2O_2 (табл. 2). Близкая картина наблюдалась при смешивании каталазы с гистидином, но не триптофаном. Известно, что в молекуле каталазы железо координируется с участием остатков гистидина [12]. Возможно, дополнительное введение этого лиганда существенно изменяет каталитические свойства каталазы. Добавки перехватчиков супероксидного радикала или маннита не изменяли эффект каталазы, а формиат несколько ослаблял его.

Изложенные материалы свидетельствуют о вероятном участии активных форм кислорода в деполимеризации крахмала α -амилазами. Ранее описаны примеры, когда в присутствии источников активного кислорода происходит деградация полисахаридов: гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата или такая деградация облегчается [13]. В наших же экспериментах показана возможность полного подавления катализируемой α -амилазой реакции в присутствии перехватчиков активных форм кислорода, прежде всего — каталазы. Это наводит на мысль о важности

Таблица 2. Влияние добавок смеси каталазы с другими перехватчиками активных форм кислорода на расщепление крахмала панкреатической α -амилазой (по убыли мутности раствора крахмала — $\Delta\tau$, %, $n=5$)

Варианты эксперимента	$\Delta\tau$, %
Контроль	53,7 \pm 3,6
+каталаза, 600 мкг/мл	29,3 \pm 3,1*
+каталаза+азид натрия, 10^{-1} М	75,0 \pm 9,0
+каталаза+L-гистидин, 10^{-2} М	56,6 \pm 4,5
+каталаза+DL-триптофан, 10^{-2} М	39,5 \pm 4,3
+каталаза+DL-метионин, 10^{-2} М	54,1 \pm 2,8
+каталаза+формиат натрия, 10^{-2} М	39,5 \pm 3,9
+каталаза+D-маннит, 10^{-2} М	26,1 \pm 2,8*
+каталаза+супероксиддисмутаза, 350 мкг	25,0 \pm 1,3*
+каталаза+нитротетразолиевый синий, 10^{-3} М	25,0 \pm 3,0*

этих форм (в частности, $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2) именно для каталитической функции данной гидролазы. Анализ действия перехватчиков на активность двух амилаз позволяет допустить, что особенности участия форм активированного кислорода могут быть разными, возможно, из-за структурных различий белков. Складывается также впечатление, что функция перекиси водорода в амилазной реакции сложнее и не ограничивается ролью источника более реактивных форм кислорода. Детализация этих вопросов, в том числе количественная характеристика описываемых эффектов, а также источника генерируемых радикалов в системе, реакций их превращений является самостоятельной задачей и может быть осуществлена в ходе дальнейших исследований.

Полученные результаты заставляют также думать, что в принципе многие реакции энзиматического гидролиза могут иметь радикальную природу. Это диктует необходимость разработки теоретической модели реализации функции гидролаз через активные формы кислорода на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

Выражаем благодарность В. Г. Бабицкой и М. А. Зильберглейту за оказанную помощь при проведении экспериментов.

Исследования финансировались Фондом фундаментальных исследований Республики Беларусь.

Summary

α -Amylase activity from *Bac. subtilis* and rabbit pancreas is inhibited by nitro-tetrazolium blue or catalase. It was concluded that active oxygen forms can participate in the catalytic function of amylase.

Литература

1. Nikandrov V. N. // *Int. J. Biochem.* 1992. Vol. 24, N 1. P. 47—53.
2. Пыжова Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: Дис. ... канд. биол. наук. Минск, 1990.
3. Никандров В. Н., Пыжова Н. С. // *Вестн АН БССР. Сер. биол. наук.* 1988. № 5. С. 58—63.
4. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Пыжова Н. С. // *Докл. АН Беларуси.* 1992. Т. 36, № 11—12. С. 1034—1039.
5. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. // *Folia Haematol.* 1988. Vol. 115, N 4.

Р. 557—561. 6. Дроздова Г. А., Фексон Э. Г. // *Лабор. дело*. 1981. № 3. С. 138—139. 7. Колб В. Г., Камышников В. С. *Справочник по клинической химии*. Беларусь. Минск, 1982. 8. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. *Методы химического анализа крови*. М., 1953. 9. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248—254. 10. Прист Ф. *Внеклеточные ферменты микроорганизмов*. М., 1987. 11. Davies K. J. A., Delsignore M. E., Lin Sh. W. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262, N 20. P. 9902—9907. 12. Метелица Д. И. *Моделирование окислительно-восстановительных ферментов*. Минск, 1984. 13. Del Maestro R. F. // *Free radicals in molec. biol. aging and disease* (Ed. D. Armstrong et al.) Raven Press, N. Y., 1984. P. 87—102.

*Белорусский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь*

Поступило 24.08.94