

УДК 577.15.04:546.21.541.515

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

**ВЛИЯНИЕ ПЕРЕХВАТЧИКОВ АКТИВНЫХ ФОРМ  
КИСЛОРОДА НА РАСЩЕПЛЕНИЕ КРАХМАЛА  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амилазами микробного и животного происхождения.

В работе использовали образцы очищенных  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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±6,3	29,5±2,1	50,3±4,1	50,2±3,9
DL-триптофан, $10^{-2}$ М	67,0±8,2	52,7±6,4	50,3±4,1	50,0±2,2
DL-метионин, $10^{-2}$ М	44,4±5,7	30,1±5,2	50,3±4,1	61,2±4,8
Азид натрия, $2 \cdot 10^{-1}$ М	68,8±6,2	33,4±4,0*		
$10^{-1}$ М		37,3±3,5*	53,7±3,6	61,7±8,3
$5 \cdot 10^{-2}$ М		60,0±5,6		
Формиат натрия, $10^{-2}$ М	44,4±5,7	42,5±3,0	53,7±3,6	79,6±4,5*
D-маннит, $10^{-2}$ М	44,4±5,7	43,7±2,5	49,2±4,1	45,6±5,0
Супероксиддисмутаза 350 мкг	64,5±3,8	66,8±4,3	58,9±2,9	56,9±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  $\alpha$ -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-

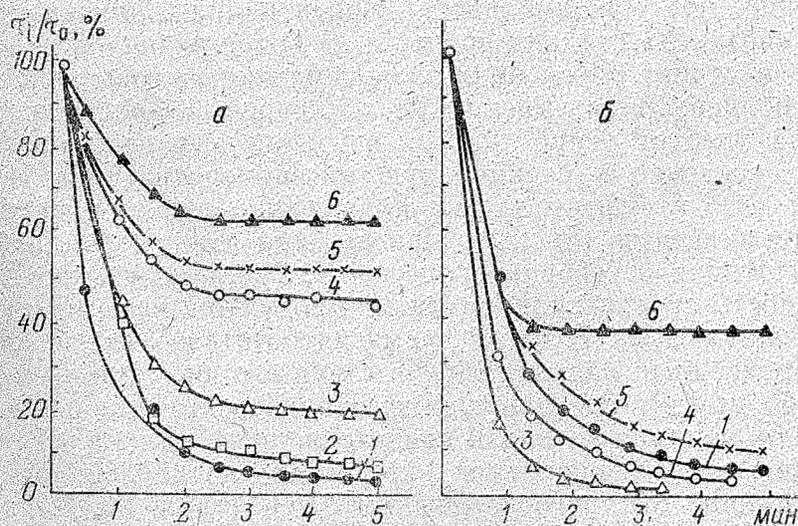


Рис. 1. Кинетика изменения мутности раствора картофельного крахмала при действии  $\alpha$ -амилаз из *Bac. subtilis* (а) и из поджелудочной железы (б) после добавок нитротетразолиевого синего. Растворитель — 0,05 М цитрат-фосфатный буфер pH 5,8, температура 25 °С, концентрация крахмала 10 г/л, концентрация 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  $\alpha$ -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

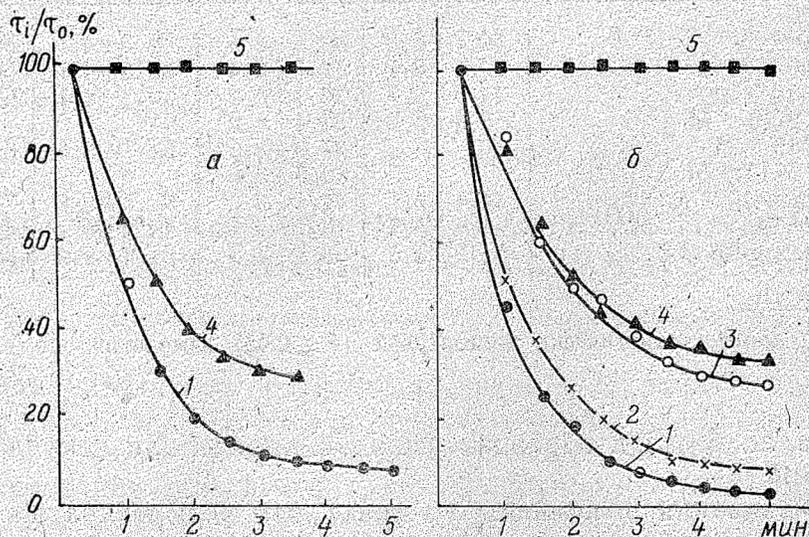


Рис. 2. Влияние добавок каталазы печени на кинетику изменения мутности раствора крахмала под действием  $\alpha$ -амилазы *Bac. subtilis* (а) и поджелудочной железы (б). Условия те же, что на рис. 1. Концентрация каталазы (мкг/мл) — 0 (1), 240 (2), 480 (3), 600 (4), 1200 (5)

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  $\text{H}_2\text{O}_2$ -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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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

$\alpha$ -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*