



УДК 577.161.3:661.732.8:577.158

## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА НА ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

© 1996 г. В. В. Чудинова<sup>#</sup>, Е. И. Василенко, Е. И. Захарова, Р. П. Евстигнеева

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 08.02.96 г.

Для изучения влияния  $\alpha$ -токоферола на работу липоксигеназы из клубней картофеля подобрана аналитическая система с оптимальными условиями для ферментативного окисления линолевой кислоты и методы контроля (полярографический, спектрофотометрический и хроматографический), позволяющие судить о состоянии активного центра фермента, скорости реакции и ее селективности. Показано, что  $\alpha$ -токоферол в зависимости от концентрации может оказывать на фермент как ингибирующее, так и активирующее действие. Предполагается, что взаимодействия в системе фермент–субстрат–токоферол определяются характером распределения последнего в дисперсионной среде.

*Ключевые слова:*  $\alpha$ -токоферол, липоксигеназа клубней картофеля, окисление линолевой кислоты.

Среди поставленных Н.А. Преображенским научных задач были исследования в области витаминов и полиненасыщенных жирных кислот, продолжающиеся на кафедре химии и технологии тонких органических соединений МИТХТ им. М.В. Ломоносова до сих пор. Действие витамина Е ( $\alpha$ -токоферола) в живой клетке в настоящее время связывают с его антиоксидантной и мембранотропной активностью, способностью к нейтрализации свободных радикалов и активных форм кислорода, а также кофакторными свойствами. Известно, что витамин Е способен модулировать каскад арахидоновой кислоты, контролируя при этом работу липоксигеназы на пути образования липоксинов и лейкотриенов [1–4]. Но однозначного мнения о механизме этого процесса нет. Одни исследователи считают, что влияние  $\alpha$ -токоферола на липоксигеназу связано с его антиоксидантными свойствами [1, 2]. Другие отводят  $\alpha$ -токоферолу роль необратимого ингибитора, способного специфически связываться с определенными пептидными фрагментами белка [3].

Мы изучили влияние  $\alpha$ -токоферола на ферментативное окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) на модели окисления линолевой кислоты препаратом липоксигеназы, полученным из клубней картофеля и частично очищенным [3].

Прежде всего, варьируя концентрации фермента и субстрата, способы и последовательность введения их во взаимодействие, мы подобрали условия, позволяющие достичь максимальной селективности и степени превращения линолевой

кислоты в окисляющей системе. Зависимость активности фермента от его концентрации (рис. 1а) и от концентрации субстрата (рис. 1б) была определена полярографически. Как видно из рис. 1а, б, обе кривые имеют максимумы, соответствующие оптимальным концентрациям фермента и субстрата, при превышении которых наблюдался спад активности. Это соответствует литературным данным [5, 6] о способности фермента к самоингибированию и ингибированию субстратом.

Для введения ПНЖК в буферный раствор фермента можно использовать их водные растворы с детергентами, спиртовые растворы или водные растворы  $K^+$ - или  $Na^+$ -солей. В процессе

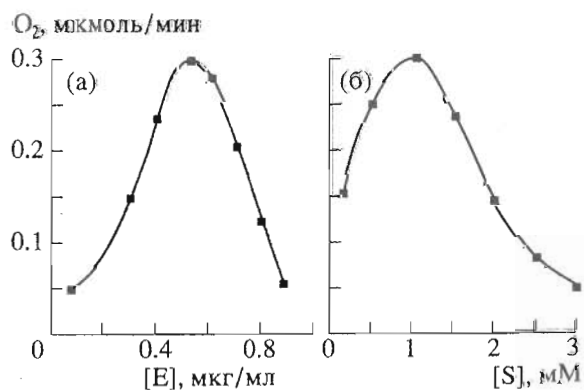


Рис. 1. Зависимость скорости поглощения кислорода при окислении линолевой кислоты препаратом липоксигеназы картофеля от концентрации фермента ([S] 1 мМ) (а) и концентрации субстрата ([E] 0.5 мкг/мл) (б).

<sup>#</sup> Автор для переписки.

отработки условий эксперимента оказалось, что конверсия линолевой кислоты в гидропероксиды при добавлении ее в 0.5% водном растворе Твина 80 выше, чем в этиловом спирте, а  $\text{Na}^+$ -соль линолевой кислоты в виде водного раствора окисляется еще хуже. В нашем случае использование детергента не представлялось возможным из-за необратимой потери чувствительности мембраны электрода Кларка при полярографическом определении количества поглощенного кислорода в ячейке оксиграфа. Для введения линолевой кислоты в окисляющую систему был выбран ее спиртовой раствор, поскольку, по нашим и литературным [3] данным, в используемых концентрациях (не более 3%) этанол практически не влияет на работу фермента.

Мы показали также, что последовательность введения компонентов в окисляющую систему играет немаловажную роль. Так, скорость поглощения кислорода уменьшается вдвое при добавлении субстрата перед введением фермента по сравнению с обратной последовательностью (рис. 2). По-видимому, это можно объяснить образованием мицеллярных ассоциатов линолевой кислоты в водном растворе, что уменьшает ее доступность для фермента.

Таким образом, оптимальные условия эксперимента таковы: алиquotы буферного раствора фермента (20 мкл, 55 мкг белка/мл) и раствора линолевой кислоты в этаноле (20 мкл, 0.1 М) последовательно вводили в ячейку оксиграфа (объемом 2 мл) с фосфатным буфером (рН 6.3) при 20°C. В этих условиях самоингибирование и субстратное ингибирование фермента было минимальным и обеспечивалась максимальная конверсия линолевой кислоты.

Для контроля за процессом ферментативного окисления линолевой кислоты нами был использован ряд методов. Для изучения кинетических закономерностей процесса мы остановились на методе электрохимической регистрации количества поглощенного кислорода с помощью электрода Кларка. На рис. 2 показано протекание ферментативной реакции окисления линолевой кислоты, зафиксированное по изменению концентрации растворенного кислорода в ячейке оксиграфа. Ферментативная реакция продолжалась 2–3 мин при длительности лаг-фазы 30–40 с, количество поглощенного в ходе процесса кислорода составляло 60–80% от требуемого для полного окисления субстрата. Это объясняется, по-видимому, частичной дезактивацией фермента продуктами реакции и кислородом [5]. Дезактивацию фермента в ходе реакции подтверждает и тот факт, что при введении после окончания процесса дополнительного количества линолевой кислоты превращения ее не происходило даже при наличии необходимого количества кислорода (рис. 2).

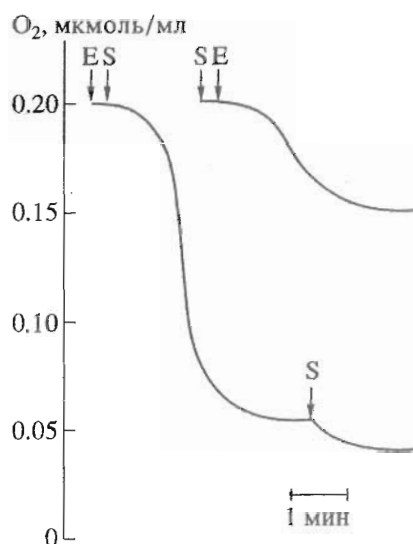


Рис. 2. Динамика изменения количества кислорода в ходе ферментативного окисления линолевой кислоты в зависимости от порядка добавления компонентов методом электрохимической регистрации с помощью электрода Кларка. Вертикальными стрелками показаны моменты введения фермента (E) и субстрата (S).

Для изучения изменений в состоянии активного центра липоксигеназы и регистрации накопления продуктов реакции был выбран метод УФ-спектроскопии. В ходе реакции фиксировались значения интенсивностей поглощения (A) при 280 и 330 нм, характеризующие состояние активного центра фермента [5, 7], и при 235 нм, соответствующее количеству продуктов оксигенации ПНЖК, содержащих конъюгированную диеновую систему [6]. Как видно из рис. 3а, б, начальная активация фермента при введении в окисляющую систему субстрата протекала с высокой скоростью и при  $\lambda$  280 и 330 нм происходило практически мгновенное возрастание A, а затем наблюдалось плавное ее уменьшение по ходу окисления с выходом кривой на плато. При длине волны 330 нм, характеризующей изменения в комплексе с переносом заряда при переходе в активном центре фермента  $\text{Fe(II)}$  в  $\text{Fe(III)}$  в ходе реакции [5, 7], конечное значение A было близко к первоначальному, что говорит об обратимости этого перехода. Однако при 280 нм конечное значение A было больше на  $0.4 \pm 0.1$ , чем до активации, что свидетельствует о необратимых изменениях, происходящих с ферментом в ходе реакции.

При 235 нм оптическое поглощение в ходе процесса ферментативного окисления линолевой кислоты возрастало (рис. 3в). Лаг-фаза составляла 8 с, а накопление гидропероксидов в процессе окисления продолжалось 4–5 мин. Отличие в длительности лаг-периодов и самого процесса окисления, зафиксированных по увеличению значения

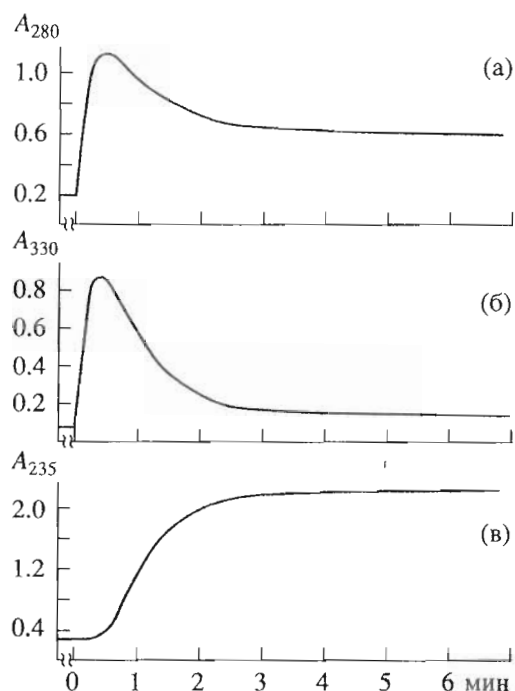


Рис. 3. Изменение интенсивности поглощения реакционной смеси при 275 (а), 330 (б) и 235 нм (в).

$A_{235}$  и по изменению количества поглощенного кислорода, можно объяснить разницей в условиях проведения эксперимента. Так, в ячейке оксиграфа (рис. 2) реакция протекает при интенсивном перемешивании, что увеличивает скорость реакции, но, с другой стороны, время, необходимое для установления абсорбционного равновесия на мембране электрода, увеличивает видимый лаг-период. В спектрофотометрической кювете (рис. 3) отсутствуют ограничения, накладываемые диффузией кислорода через мембрану электрода, поэтому при изучении влияния  $\alpha$ -токоферола на ферментативное окисление линолевой кислоты скорость реакции мы регистрировали электрохимически, а длительность лаг-периода определяли спектрофотометрически.

Наконец, для оценки степени и селективности превращения линолевой кислоты, а также состава продуктов реакции был выбран метод ВЭЖХ. На рис. 4 представлена типичная хроматограмма смеси продуктов окисления линолевой кислоты, из которой видно, что в ходе ферментативной реакции наряду с преимущественным образованием гидропероксидов линолевой кислоты (62%) появлялись также ее гидроксипроизводные (31%) и кетопроизводные (7%). Их накопление протекает, по-видимому, за счет неферментативного гомолитического распада продуктов первичной окислительной субстрата и свидетельствует об участии свободнорадикальных частиц в липоксигеназной реакции.

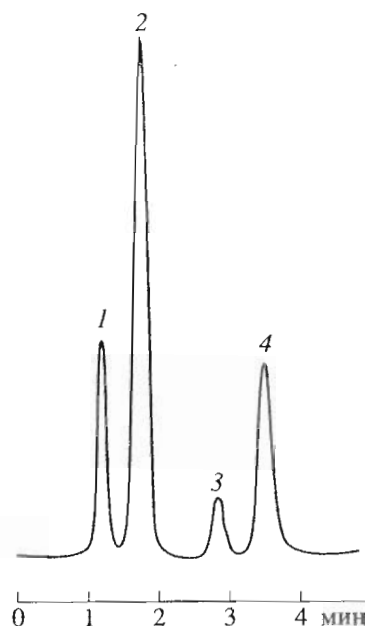


Рис. 4. ВЭЖХ продуктов ферментативной окислительной линолевой кислоты препаратом липоксигеназы картофеля. 1 – 9-гидрокси-, 2 – 9-гидроперокси-, 3 – 9-кето-10,12-октадекадиеновые кислоты, 4 – линолевая кислота.

Подобранные экспериментальные условия ферментативного окисления линолевой кислоты препаратом липоксигеназы картофеля и разработанные методы контроля позволили нам изучить влияние  $\alpha$ -токоферола в различных концентрациях на этот процесс. Как видно из рис. 5а–г, в зависимости от модифицирующего действия на активный центр липоксигеназы и влияния на скорость ферментативного окисления линолевой кислоты в интервале исследованных концентраций  $\alpha$ -токоферола (0–5 мкМ) можно выделить три участка: <10 мкМ (I), 10–25 мкМ (II), >25 мкМ (III).

На участке I (концентрация  $\alpha$ -токоферола <10 мкМ) наблюдалось уменьшение количества образующихся гидропероксидов линолевой кислоты (рис. 5а) и снижение скорости ферментативной реакции (рис. 5б). При этом в УФ-спектре реакционной смеси в максимумах при длинах волн 280 и 330 нм оптическое поглощение возрастало по сравнению со значениями, полученными при добавлении к ферменту только субстрата (рис. 5в, г), т.е. наблюдалось ингибирование реакции при одновременном увеличении эффективности перехода фермента в активное состояние. Это, по-видимому, можно объяснить тем, что в данном интервале концентраций реализуется структурное взаимодействие  $\alpha$ -токоферола и фермент-субстратного комплекса, препятствующее превращению линолевой кислоты в продукт. При этом  $\alpha$ -токоферол не взаимодействует непосредственно с активным центром липоксигеназы, поскольку при

введении его в буферный раствор фермента в отсутствие субстрата каких-либо изменений в электронном спектре не происходило (данные не приведены).

На участке II (10–25 мкМ  $\alpha$ -токоферол) скорость поглощения кислорода (рис. 5б) и количество образующихся гидропероксидов (рис. 5а) превышали соответствующие параметры контрольной системы (без  $\alpha$ -токоферола) при одновременном возрастании интенсивности поглощения при 280 и 330 нм. Другими словами, наблюдалась активация ферментативного окисления линолевой кислоты  $\alpha$ -токоферолом, максимальная при его концентрации 20 мкМ.

Исчезновение ингибирующего эффекта  $\alpha$ -токоферола можно объяснить тем, что, как известно [8], это липофильное соединение способно образовывать агрегаты в полярных и амфифильных средах, которые уже в небольших концентрациях не могут выполнять функцию неконкурентного ингибитора за счет специфического взаимодействия с ферментом. С другой стороны, как нами было показано ранее [9], при содержании  $\alpha$ -токоферола 10–25 мкмоль/л он образует агрегаты с низкой стехиометрией, которые наиболее эффективно выполняют защитную антирадикальную функцию, что, по-видимому, и может объяснить общее увеличение эффективности работы ферментной системы.

В концентрации >25 мкМ (участок III)  $\alpha$ -токоферол практически не проявляет регулирующих свойств по отношению к скорости липоксигеназной реакции (рис. 5а–г). Вероятно, в таких концентрациях  $\alpha$ -токоферол уже не может встраиваться в липидные мицеллы, происходит разделение фаз и избыток  $\alpha$ -токоферола существует в виде агрегатов с высокой стехиометрией [10].

На наш взгляд, приведенные выше экспериментальные данные свидетельствуют о том, что характер влияния  $\alpha$ -токоферола на окисление линолевой кислоты препаратом липоксигеназы картофеля зависит от его концентрации, которая однозначно определяет тип распределения этого липофильного соединения в водно-липидной среде. Можно выделить две критические концентрации  $\alpha$ -токоферола. Первая (5 мкМ) соответствует началу ассоциации его в агрегаты. Ниже нее реализуется в основном структурный механизм взаимодействия регулятора и фермента, что приводит к необратимому ингибированию последнего. Выше этой концентрации распределение  $\alpha$ -токоферола характеризуется наличием ассоциатов с низкой стехиометрией. Последние из-за стерических трудностей не способны структурно взаимодействовать с ферментом, но в них наиболее эффективно реализуется стабилизирующее свойство  $\alpha$ -токоферола – его способность нейтрализовать высокоэнергетические и радикальные частицы за

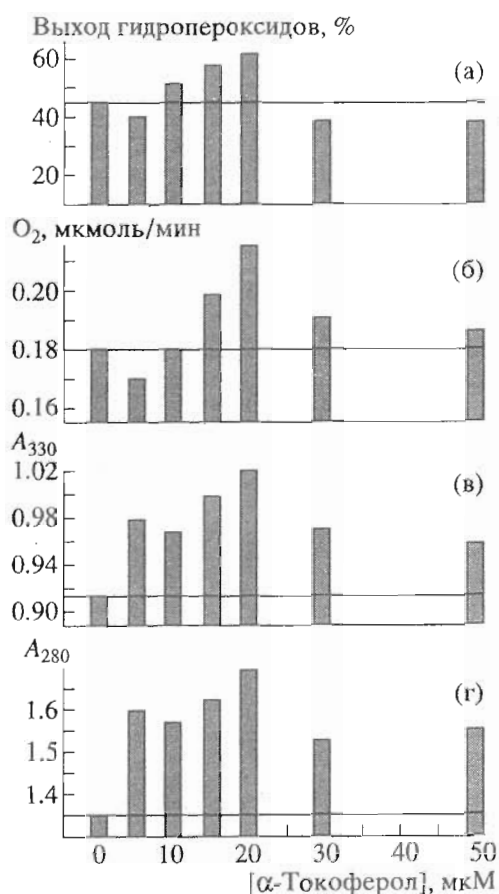


Рис. 5. Влияние  $\alpha$ -токоферола на количество гидропероксидов, образующихся при липоксигеназном окислении линолевой кислоты (а), на скорость поглощения кислорода (б), интенсивность поглощения фермента при длинах волн 280 (в) и 330 нм (г).

счет образования комплексов в возбужденном состоянии – эксиплексов и эксимеров – и эффективности перераспределения в них энергии через систему пространственно сближенных доноров и акцепторов [9]. В интервале концентраций 10–25 мкМ эти свойства  $\alpha$ -токоферола наиболее ярко выражены. Здесь фермент наилучшим образом защищен от деструкции и ингибирования продуктами окисления, поэтому он наиболее активен – степень превращения субстрата и селективность образования продуктов максимальна. И наконец, выше второй критической концентрации (25 мкМ)  $\alpha$ -токоферол практически не влияет на работу фермента, поскольку существует в высокоагрегированном состоянии, затрудняющем проявление им биологических свойств.

В заключение необходимо отметить, что при всех исследованных концентрациях в присутствии  $\alpha$ -токоферола наблюдалась более эффективная активация липоксигеназного фермента, что хорошо видно на рис. 5в, г ( $A_{280(50 \text{ мкМ})}$  и  $A_{330(50 \text{ мкМ})} > A_{280(0 \text{ мкМ})}$  и  $A_{330(0 \text{ мкМ})}$ ). Это, по-видимому, связано с тем, что

распределение  $\alpha$ -токоферола в водно-липидной среде вероятностное и при любой его концентрации в той или иной степени реализуется его стабилизирующее действие, а следовательно, и активирующее действие на фермент.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали линолевую кислоту с содержанием основного вещества 99% (по данным ГЖХ), полученную из подсолнечного масла. DL- $\alpha$ -токоферол был синтезирован по методу [11]. Препарат липоксигеназы с содержанием белка 55 мкг/мл и удельной активностью 0,25 нмоль  $O_2$ /(мин мг белка) получали из клубней картофеля по методу [3].

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman DU-8 (США) в диапазоне длин волн 230–340 нм. В качестве раствора сравнения использовали фосфатный буфер, pH 6,3.

Изменение концентрации кислорода в растворе измеряли с помощью оксиграфа LP-9 (Чехия), снабженного электродом Кларка.

ВЭЖХ-анализ проводили на жидкостном хроматографе Клауер (ФРГ), снабженном УФ-детектором с фильтром 230 нм, рефрактометрическим детектором, инжектором и обращенно-фазовой колонкой (3  $\times$  250 мм, 6 мкм) с сорбентом Nupersil ODS (США) в системе ацетонитрил–вода, 70 : 30. Скорость элюирования 1 мл/мин.

Для идентификации продуктов ферментативной оксигенации линолевой кислоты методом ВЭЖХ использовали стандартные образцы 9-гидроперокси-, 9-гидрокси- и 9-кетооктадекадиеновых кислот (Sigma, США).

Окисление линолевой кислоты препаратом липоксигеназы картофеля проводили непосред-

ственно в измерительной ячейке оксиграфа или в измерительной кювете спектрофотометра в 2 мл фосфатного буфера, pH 6,3. В буфер при перемешивании последовательно добавляли 20 мкл препарата липоксигеназы картофеля (0,25 МЕ),  $\alpha$ -токоферол от нулевой до конечной концентрации (0–50 мкМ) и 20 мкл 0,1 М раствора линолевой кислоты (1 мМ) в этаноле (96%).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reddanna P., Whelan Y., Burgess J.R., Eskew M.L. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1989. V. 570. P. 136–145.
2. Phoenix J., Edwards R.H.T., Jacson M.J. // Biochem. J. 1989. V. 257. P. 207–213.
3. Reddanna P., Krishna M.R., Channa S.R. // Fed. Eur. Biochem. Soc. 1985. V. 193. P. 28–35.
4. Grossman S., Waksman E.G. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 140. P. 281–287.
5. Corey E.J. // Pure Appl. Chem. 1987. V. 59. P. 269–278.
6. Gibian M.J., Vandenberg P. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. P. 343–349.
7. Draheim J.E., Carroll R.T., McNemar T.B., Dunham W.R., Sanks R.H., Funk M.O. // Arch. Biochem. Biophys. 1989. V. 269. P. 208–218.
8. Kagan V.E., Serbinova E.A., Bakalova R.A., Stoychev T.S., Erin A.N., Prilippko L.L., Evstigneeva R.P. // Biochem. Pharmacol. 1990. V. 40. P. 2403–2413.
9. Чудинова В.В., Захарова Е.И., Алексеев С.М., Евстигнеева Р.П. // Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. С. 515–520.
10. Erin A.N., Gorbunov N.V., Brusovanic V.I. // Brain Res. 1986. V. 398. P. 85–90.
11. Захарова Е.И., Шуаитов К.А.-В., Чудинова В.В., Алексеев С.М., Евстигнеева Р.П. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. С. 1268–1273.

## Effect of $\alpha$ -Tocopherol on Enzymic Oxidation of Linoleic Acid

V. V. Chudinova, E. I. Vasilenko, E. I. Zakharova, and R. P. Evstigneeva

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Abstract**—To study the effect of  $\alpha$ -tocopherol on the action of lipoxidase from potato tubers, an analytical system with optimal conditions for the enzymic oxidation of linoleic acid and monitoring methods (polarographic, spectrophotometric, and chromatographic) were chosen. These allowed us to determine the state of the enzyme active center, the rate of the reaction, and its selectivity. Depending on concentration,  $\alpha$ -tocopherol was shown to be capable of both inhibition and activation of the enzyme. The interactions in the enzyme–substrate–tocopherol system were suggested to be determined by the tocopherol distribution in the dispersion medium.

**Key words:**  $\alpha$ -tocopherol, lipoxidase from potato tubers, linoleic acid oxidation.