



УДК 541.183:577.152.111*17.03

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

II*. ВЛИЯНИЕ КАТИОННЫХ ПАВ

© 1998 г. А. И. Давлетшин, Н. А. Калабина*, С. Ю. Зайцев*, В. В. Егоров#

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

*Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 15.04.97 г. Принята к печати 25.02.98 г.

Исследовано влияние катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) на начальную скорость перекисного окисления 5-аминосалициловой кислоты в присутствии пероксидазы из хрена. С ростом концентрации ПАВ эта скорость сначала возрастает, а потом понижается. Начальное возрастание скорости мы объясняем активацией фермента и/или увеличением концентрации субстрата в районе его активного центра, а последующее уменьшение – инактивацией белка ПАВ с последующей денатурацией.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, катионные поверхностно-активные вещества.

Катионные поверхностно-активные вещества (ПАВ) широко используются в медицинской практике в качестве антисептиков, поскольку, встраиваясь в липидный бислой плазматических мембран микроорганизмов, они его разрушают, что приводит к лизису клеток [2, 3]. Кроме того, катионные ПАВ инактивируют [4, 5] или даже денатурируют мембранные белки [6]. В настоящей работе изучено действие катионных ПАВ на белки на примере гемсодержащего белка пероксидазы хрена (КФ.1.11.1.7).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 приведены зависимости начальной скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ. Видно, что со всеми исследованными соединениями наблюдается сначала увеличение скорости реакции, а затем ее снижение.

Возрастание скорости мы связываем с образованием в растворе ассоциатов белка с ПАВ (ср. [7]). В таких ассоциатах может возрастать активность фермента [8] вследствие увеличения доступности его активного центра для субстрата [9] в результате изменения конформации белка (показано увеличение степени спирализации пероксидазы в присутствии ПАВ). С другой стороны, благодаря сольubilизации субстрата может возрасти его локальная концентрация вблизи активного центра фермента [10].

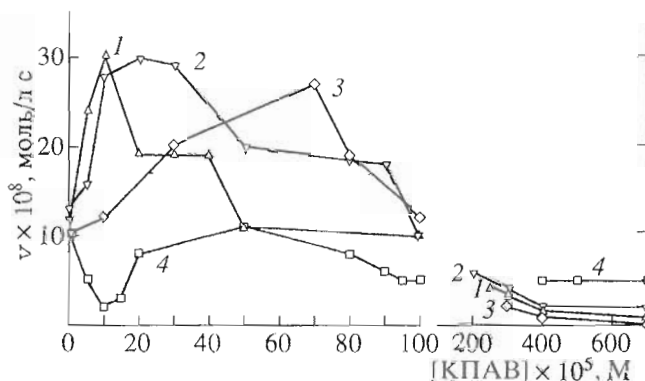


Рис. 1. Зависимость скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ: 1 – (IV), 2 – (III), 3 – (II), 4 – (I). [E] 3×10^{-8} М, $[H_2O_2] = [S] = 3$ мМ (рН 7.2; 20°C)

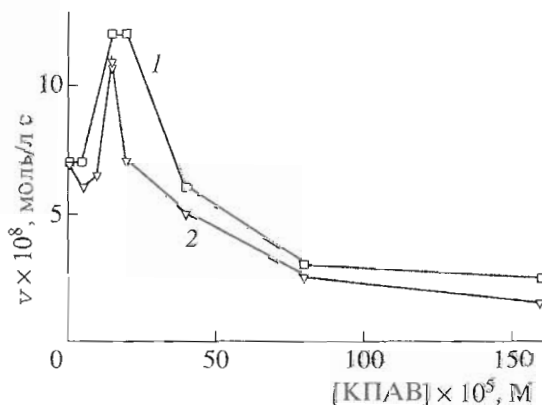


Рис. 2. Зависимость скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты от концентрации ПАВ: 1 – (VI), 2 – (VII). Условия – см. рис. 1

* Сообщение I см. [1].

Автор для переписки.

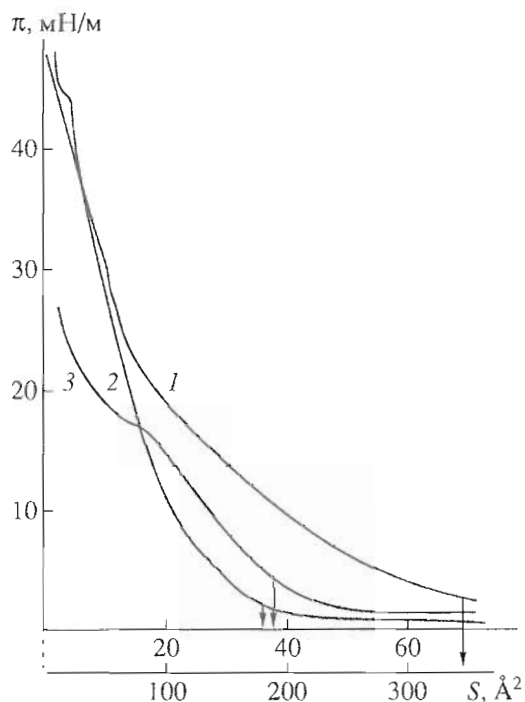


Рис. 3. Изотермы "поверхностное давление–площадь на молекулу" на границе вода–воздух для монослоев: пероксидазы (1), соединения (III) (2) и смешанного монослоя пероксидазы–соединение (III), 1 : 100 (3) (pH 6.8; 20°C)

Возможность образования ассоциатов пероксидазы с катионными ПАВ мы показали методом Ленгмюра–Блоджетт. На рис. 3 приведены изотермы "поверхностное давление–площадь на молекулу" на границе вода–воздух для монослоев пероксидазы, соединения (III), а также для смешанного монослоя пероксидазы и соединения (III). Видно, что изотерма смешанного монослоя существенно отличается от изотерм индивидуальных соединений и характеризуется меньшим давлением коллапса и появлением плато в области 16 мН/м. Последнее характерно для образования ассоциатов (ср. [11]).

Важно отметить, что обнаруженные значения давлений в области плато лежат в диапазоне значений поверхностного давления в природных мембранах [12].

На рис. 1 видно, что концентрации ПАВ, отвечающие ускорению пероксидазного окисления, а также величина этого ускорения уменьшаются в гомологическом ряду соединений (II)–(V). В этом ряду возрастает гидрофобность соединения, что сопровождается снижением его критической концентрации мицеллообразования [13] (см. табл. 1). Мы полагаем, что именно этим эффектом можно объяснить наблюдаемое влияние структуры ПАВ на кинетику пероксидазного окисления.

Снижение скорости ферментативной реакции на втором участке мы объясняем ингибированием пероксидазы в результате адсорбции ПАВ в

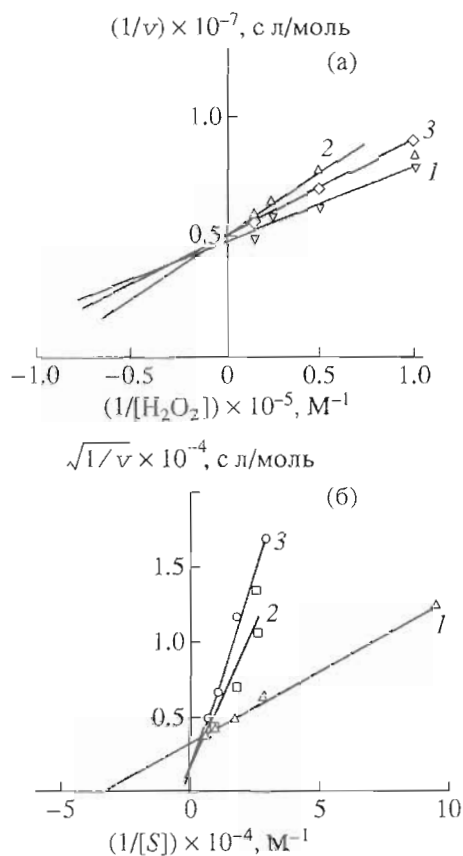


Рис. 4. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты в присутствии соединения (III) от концентрации перекиси водорода в обратных координатах (а) и от концентрации субстрата в координатах $\sqrt{1/v}/1/[S]$ (б). [Соединение (III)], мМ: 1 – 0.3; 2 – 0.63; 3 – 1.26; $[E] 3 \times 10^{-8}$ М; $[H_2O_2] = [S] = 3$ мМ (pH 6.8; 20°C)

районе активного центра фермента. На связывание с белком указывает существенное ускорение реакции перекисного окисления ПАВ в присутствии пероксидазы (табл. 2).

Анализ соответствующих зависимостей для разных концентраций соединения (III) (рис. 4а и б) показал, что в системе наблюдается смешанный механизм ингибирования по обоим субстратам.

На рис. 1 видно, что в области предельно высоких концентраций ПАВ наблюдается либо минимальная активность фермента, либо полное ее отсутствие, по-видимому из-за денатурации белка (ср. [6]). Косвенно об этом свидетельствует частичная преципитация белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединения (I)–(VII) были синтезированы на химическом факультете МГУ и, по данным ГМР,

Таблица 1. Критические концентрации ПАВ, соответствующие мицеллообразованию и максимальной активности пероксидазы в водном фосфатном буфере (0.03 М, рН 7.2; 20°C)

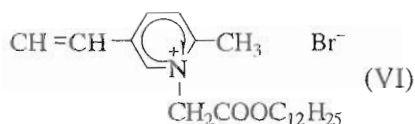
ПАВ	ККМ × 10 ³ , М	[ПАВ] × 10 ³ , М
(I)	8.7	0.5
(II)	4.4	0.7
(III)	4.0	0.2
(IV)	0.28	0.1

Таблица 2. Скорость реакции перекисного окисления ПАВ в воде ($v \times 10^{10}$ моль/л с, [ПАВ] 0.1 М, [H₂O₂] 0.26 М, 20°C)

ПАВ	Без пероксидазы	С пероксидазой (2.5 мМ)
(III)	1.2	2.2
(IV)	2.4	4.8
(V)	2.8	7.7

содержали менее 1% примесей.

$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COOC}_n\text{H}_{2n+1} \text{X}$,
 $n = 4, \text{X} = \text{Br}$ (I); $n = 10, \text{X} = \text{Cl}$ (II); $n = 12,$
 $\text{X} = \text{Cl}$ (III); $n = 16, \text{X} = \text{Cl}$ (IV); $n = 16, \text{X} = \text{Br}$ (V)-



$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_8\text{H}_{17} \text{Br}^-$ (VII)

Все изученные ПАВ содержали способные к полимеризации непредельные группы, что позволяет применять их для получения полимерных носителей лекарственных препаратов [14].

В работе использовали также калиевые соли фосфорной кислоты (ч.) без дополнительной

очистки, 5-аминосалициловую кислоту (х.ч.), пероксидазу хрена (Reanal, Венгрия) и дважды дистиллированную воду.

Использованные в работе методы описаны в нашей предыдущей публикации [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давлетшин А.И., Егоров В.В., Зубов В.П. // Био-органи. химия. 1998. Т. 24. С. 426–429.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. М.: Медицина, 1991. С. 409–413.
3. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993. С. 138–180.
4. Пушкарев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 410–417.
5. Moss J., Osborne J., Stanley J., Stanley S. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 46–48.
6. Жолы М. Физическая денатурация белков. М.: МГУ, 1968. С. 41–44.
7. Robinson N., Tanfold Ch. // Biochemistry. 1975. V. 14. P. 369.
8. Левашов А.В. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112–158.
9. Марданян С.С., Григорян М.А. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1055–1061.
10. Березин И.В. Действие ферментов в обращенных мицеллах ПАВ. М.: Наука, 1985.
11. Клямкин А.А. Структурообразование и радикальная полимеризация в монослоях поверхностно-активных мономеров: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1992. С. 133–136.
12. Часовникова Л.В. // Иммунология. 1992. Т. 1. С. 23–25.
13. Абрамзон А.А., Боброва Л.Е. Поверхностные явления и ПАВ. Л.: Химия, 1984. С. 166.
14. Егоров В.В., Аляутдин Р.Н., Харкевич Д.А. // Вопросы физико-химической биологии и ветеринарии. М., МГАВМиБ, 1995. С. 62–72.

Effect of Surfactants on Peroxidase Activity. II. Effect of Cationic Surfactants

A. I. Davletshin*, N. A. Kalabina**, S. Yu. Zaitsev**, and V. V. Egorov**

*Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, ul. Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

The effect of various cationic surfactants on the initial rate of the 5-aminosalicylic acid peroxidation with horse-radish peroxidase was studied. With increasing concentration of the surfactant, the rate first increased and then decreased. We attributed these changes to a primary activation of the enzyme and/or an increase in the concentration of the substrate in the region of the active site and to the subsequent inactivation of the protein with surfactant followed by its denaturing, respectively.

Key words: horse-radish peroxidase, cationic surfactants

To whom correspondence should be addressed.