

Д. М. МИХЛИН и З. С. БРОНОВИЦКАЯ

О ВЛИЯНИИ НИТРАТНОГО И ДРУГИХ АНИОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 27 I 1949)

По современным представлениям, молекула гемина представляет собой плоскость, в центре которой находится атом железа. Из 6 координационных связей железа 4 направлены, в самой плоскости, к атомам азота пиррольных колец порфириновой группировки; 2 другие связи направлены перпендикулярно к плоскости, по обе ее стороны. У каталазы и пероксидазы, содержащих трехвалентное гематиновое железо, по крайней мере одна из этих валентностей насыщена гидроксильной группой, лежащей вне плоскости порфиринового кольца. По месту этих связей и происходит присоединение перекиси водорода к геминовой группировке фермента.

Таким образом, наблюденное Михаэлисом и Пехштейном ⁽¹⁾ торможение активности каталазы различными анионами, в особенности нитратным, было объяснено Агнером и Теореллом ⁽²⁾ конкурирующим действием этих анионов, как бы состязанием этих анионов с гидроксильной группой, который при сравнительно высоких концентрациях водородных ионов вытесняется другими анионами вследствие большего их сродства к атому железа. В результате получается блокирование тех связей, которые при ферментативном катализе назначены для присоединения водорода. Действительно, у каталазы отрицательный солевой эффект тем сильнее, чем ниже рН и, следовательно, чем ниже концентрация гидроксильных ионов в среде.

Что же касается пероксидазы, то А. А. Культюгин и Н. С. Конашенко ⁽³⁾ не нашли никакого влияния нитратов на пероксидазную активность гемоглобина. В опытах с истинной пероксидазой из хрена М. А. Бокучава ⁽⁴⁾ также не мог отметить никакого влияния даже очень больших концентраций нитратов на активность фермента.

Наше внимание было обращено на то, что в опытах как Культюгина и Конашенка, так и Бокучава применялись сравнительно высокие концентрации перекиси водорода, далеко превосходящие оптимальную, которая была недавно нами установлена для растительной пероксидазы. Оптимальная концентрация H_2O_2 зависит, конечно, от концентрации фермента.

Таким образом, отсутствие блокирующего действия нитратов на пероксидазу в прежних опытах могло быть объяснено большим избытком перекиси водорода. Кроме того, в названных работах реакция среды была такова, что влияние анионов на вытеснение гидроксила и на образование более прочного соединения их с железом гемина должно было сказаться меньше.

Мы поэтому изучали влияние анионов на активность пероксидазы в условиях, где это влияние должно проявиться, т. е. при $pH = 4,7$ и оптимальной концентрации перекиси водорода ($0,002 M$). Мы убедились, что в зоне $pH = 4,7-6,2$ активность пероксидазы почти не зависит от концентрации водородных ионов.

Применялся метод, сущность которого состоит в том, что активность фермента определяется количеством аскорбиновой кислоты, окисленной пероксидазой через посредство пирокатехина.

Так как оказалось, что концентрация ацетатного буфера не влияет на активность пероксидазы при одном и том же pH , то из этого можно было сделать заключение об индифферентности ацетатного иона к геминному железу пероксидазы. Ацетатный буфер применялся нами впоследствии для поддержания постоянства концентрации водородных ионов. На фоне этого буфера изучалось влияние различных солей в различных концентрациях, от $0,01$ до $1 M$, на активность фермента. Результаты этих опытов показаны на рис. 1.

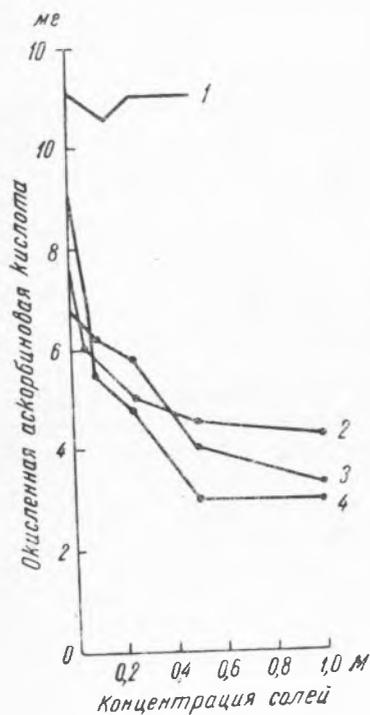


Рис. 1. 1 — ацетат, 2 — хлорид, 3 — нитрат, 4 — формиат

Тормозящее действие нитратного иона было подтверждено также пурпуругаллиновым методом. Для этого смесь, состоящая из 1 мл ацетатного буфера ($pH = 4,7$), 1 мл $0,02 M$ раствора перекиси водорода, 1 мл $0,5\%$ раствора пирогаллола, 1 мл разбавленного раствора пероксидазы и 1 мл $8,5\%$ раствора нитрата натрия, была оставлена на 30 мин. при 20° . После подкисления и извлечения эфиром в экстракте не оказалось пурпуругаллина; в контроле, без нитрата, было найдено $2,2$ мг пурпуругаллина.

Как видно из рис. 1, самое сильное тормозящее действие на активность пероксидазы оказывает формиат, затем следуют нитрат и хлорид.

Что касается фосфатов, то изменение их концентрации от $0,1$ до $0,01 M$ в буферном растворе, который заменял ацетатный, не влияет на активность пероксидазы.

Сульфат натрия, по невыясненной еще причине, обнаруживал в наших опытах слабое активирующее действие, которое, по нашему мнению, едва ли может быть связано с непосредственным действием на железо гемина.

Наше предположение о том, что тормозящее действие некоторых анионов на пероксидазу связано с их средством к геминному железу и способностью насыщать одну из его валентностей, необходимую для каталитической функции фермента, было проверено спектрофотометрическим путем. Эти измерения посредством спектрофотометра Бекмана были произведены на сыром, неочищенном препарате, полученном путем вытяжки из хрена. Мы не могли поэтому ожидать больших спектральных сдвигов. Табл. 1, однако, показывает, что при прибавлении нитрата или формиата к раствору пероксидазы происходят некоторые, хотя и небольшие, изменения в видимой части спектра.

Таким образом, наши спектральные данные служат подтверждением нашего вывода о том, что в определенных условиях некоторые органические и неорганические анионы оказывают тормозящее действие на

Таблица 1

Влияние формиата и нитрата на спектр пероксидазы
(В опыте 2 мл раствора пероксидазы + 1 мл ацетатного буфера (рН=4,7) + 1 мл раствора формиата или нитрата (0,5 М). В контроле—вода вместо раствора соли)

Длина волны в мμ	E (коэффициент экстинкции)			
	с нитратом	контроль	с формиатом	контроль
640	0,030	0,027	0,034	0,029
500	0,072	0,065	0,087	0,075
402	0,276	0,263	0,310	0,305

пероксидазу и что, так же как у каталазы, это отрицательное влияние может быть объяснено блокированием одной из координационных валентностей геминового железа, имеющей решающее значение для каталитической функции фермента. То обстоятельство, что такое торможение не наблюдается при большом избытке перекиси водорода, служит некоторым доказательством предположения, что тормозящие ионы занимают место, необходимое для присоединения перекиси к ферменту.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
25 I 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ L. Michaelis и H. Pechstein, *Biochem. Z.*, **53**, 320 (1913). ² K. Agner и H. Theorell, *Arkiv Biochem.*, **10**, 331 (1946). ³ А. А. Культюгин и Н. С. Коначенко, *Биохимия*, **4**, 133 (1939). ⁴ М. А. Бокучава, *ДАН*, **60**, 409 (1948).