



УДК 577.152.1

ВАН НИН (КНР), В.В. СЕНЧУК

ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КРАСНОГО, ЗЕЛЕННОГО И БЕЛОГО КИТАЙСКОГО ЧАЯ

Water-soluble phenolic compounds from red, green and white Chinese tea are oxidized by horseradish peroxidase according to the peroxidase, not to the oxidase mechanism. The active intermediate Compound I is formed in the reaction of peroxidase with hydrogen peroxide. After addition of Chinese tea extracts the Compound I is catalytically transformed. Inhibition of the peroxidase reaction by specific inhibitors and alternative substrates of peroxidases confirms the specific function of peroxidase in the oxidation reaction of Chinese tea water-soluble phenolic compounds. An essential role of the individual pattern of Chinese tea biologically active phenolic compounds in the specific peculiarities of the peroxidase reaction observed is proposed.

В исследованиях *in vitro* и *in vivo* обнаружена антиоксидантная, антиатеросклеротическая, гепатопротекторная, противовоспалительная, иммуностимулирующая, противораковая, ангиопротекторная активность китайского чая *Camelia sinensis* [1, 2]. Предполагается, что биологическая активность различных сортов китайского чая (зеленого, красного, белого, желтого) реализуется за счет содержащихся в нем фенольных соединений, экстрагирующихся при заваривании. В состав экстрактов китайского чая входят биологически активные полифенольные соединения - флавонолы, флавандиолы и фенолокислоты, составляющие до 30 % его сухого веса [3, 4]. Биохимические свойства катехинов чая основательно исследованы [1-5]. Установлено, что, в отличие от конденсированных олигомерных фенольных соединений ферментированного черного чая (теа-флавины, теарубигины) [2, 3], фенольные соединения зеленого чая проникают в системный кровоток, распределяются по органам и тканям человека, подвергаются метаболическим превращениям [6]. Катехины составляют около 60 % всех фенольных соединений ферментированного чая [1-4]. К важнейшим из них относятся: (-)-эпигаллокатехин, (-)-эпикатехин-3-галлат, (-)-эпигаллокатехин-3-галлат, (-)-эпикатехин, (+)-галлокатехин, катехин.

Вместе с тем, несмотря на весьма значительный прогресс в биохимии и фармакологии фенольных соединений китайских сортов чая, детальные биохимические механизмы биологической активности до настоящего времени изучены недостаточно. На основании результатов предыдущих исследований, выполненных на кафедре биохимии БГУ [7], а также на основании данных литературы [8] высказано предположение о том, что фармакологическая активность природных фенольных соединений может реализоваться путем участия в качестве субстратов и/или регуляторов пероксидаз и пероксидазных реакций в организме человека и животных. Миелопероксидаза, пероксидаза эозинофилов, пероксидаза матки, лактопероксидаза, тиреопероксидаза, простагландинсинтетаза, пероксидаза слюнных желез и псевдопероксидазы (цитохромы P-450, цитохром с, гемоглобин и миоглобин) определяют проявление важнейших и разнообразных функций организма [8, 9]. Все эти гемопротеины могут рассматриваться в качестве потенциальных биохимических мишеней для фенольных сое-

динений чая. В связи с этим нами была исследована возможность участия фенольных соединений экстрактов китайского чая (красного, зеленого, белого) в качестве субстратов пероксидазы хрена - фермента, наиболее широко используемого в модельных исследованиях пероксидазных реакций [10, 11].

Для этого предполагалось изучить UV-Vis-спектры поглощения экстрактов китайского чая до и после начала пероксидазной реакции, исследовать образование активированного промежуточного соединения пероксидазы с пероксидом водорода (Compound I) и его превращение в присутствии фенольных соединений китайского чая, определить активность пероксидазы в реакции окисления фенольных соединений экстрактов китайского чая, измерить окисление в присутствии специфических ингибиторов (NaN_3 , тиомочевина) или альтернативного субстрата (KI) пероксидаз.

Материал и методика

Получение и анализ чайных экстрактов. Взвешивали 0,5 г чая, заваривали кипяченой водой (100 мл), оставляли на 15 мин для экстрагирования. Экстракт фильтровали, затем охлаждали до комнатной температуры и хранили при 4-6 °С. Экстракт характеризовали спектрофотометрическим и гравиметрическим методами, измеряя содержание сухого вещества в экстрактах чая, как описано нами в [12].

UV-Vis-спектры поглощения экстракта чая (30 мкл неразбавленного чайного экстракта в 3 мл реакционной пробы) регистрировали в диапазоне 220-700 нм в среде Na-фосфатного буфера 0,05 М (pH 7,4) при 37 °С.

Пероксидазное окисление фенольных соединений экстрактов китайского чая. Реакцию пероксидазного окисления запускали в кювете спектрофотометра добавлением H_2O_2 до 0,5 мМ к раствору, содержащему пероксидазу, пероксид водорода, Na-фосфатный буфер 0,05 М (pH 7,4) при 37 °С. Затем через каждые 3 мин после начала реакции записывали спектры поглощения реакционной среды. Концентрацию H_2O_2 измеряли спектрофотометрически при максимальной длине волны λ_{max} , равной 240 нм, и коэффициенте молярного поглощения ϵ , равном 43,6 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [13]. Концентрацию пероксидазы хрена определяли по оптической плотности А в полосе Соре ($\lambda_{\text{max}}=403 \text{ нм}$, $\epsilon=102\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [14].

Изучали зависимость окисления экстрактов чая от концентрации пероксидазы (50, 100, 200 нМ). Активность пероксидазы в реакции пероксидазного окисления фенольных соединений водных экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая характеризовали удельной активностью (LA/мин на 1 мг пероксидазы), которую рассчитывали из зависимостей изменения оптической плотности реакционной среды в максимуме поглощения фенольных соединений от времени протекания реакции.

Пероксидазное окисление названных соединений проводили также в присутствии ингибиторов (NaN_3 , тиомочевина) или альтернативного субстрата (KI) пероксидаз [8-11], которые вносили в среду до запуска реакции в концентрации 1 мМ.

Получение и анализ Compound I пероксидазы [15]. Для получения Compound I в кювету с 0,05 М Na-фосфатным буфером (pH 7,4) добавляли пероксидазу до концентрации 2,4 мкМ. После записи спектра поглощения к раствору приливали H_2O_2 до концентрации 4,8 мкМ и вновь записывали спектр поглощения, регистрируя появление характеристических полос поглощения Compound I пероксидазы. Затем к раствору добавили 30 мкл чайного экстракта и, регистрируя спектр поглощения, следили за изменением спектральных свойств Compound I пероксидазы. Все измерения выполняли на приборе Cary 50 Bio фирмы «Varian».

Результаты и их обсуждение

Методом UV-Vis-спектрофотометрии показано (рис. 1), что в состав водных экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая входят ароматические соединения с максимумом поглощения $\lambda=280 \text{ нм}$. Установлено, что в присутствии каталитических количеств пероксидазы и пероксида водорода происходят нарастающие во времени характерные изменения спектров поглощения экстрактов зеленого китайского чая. При этом уменьшается поглощение фенольных соединений чая при 280 нм, увеличивается при 250 нм и в области более 340 нм.

Спектральные свойства экстракта чая изменяются только в полной пероксидазной системе, содержащей пероксидазу, пероксид водорода и фенольный субстрат. Не обнаружено окисления фенольных соединений экстрактов китайского чая при участии кислорода без пероксида водорода, т. е. по оксидазному пути. Аналогичные данные получены и при внесении экстрактов белого и красного чая в пероксидазную реакционную среду. Эти результаты свидетельствуют о принципиальной способности пероксидазы окислять по пероксидазному механизму фенольные соединения экстрактов всех изученных сортов китайского чая.

Еще одним прямым доказательством непосредственного участия каталитически активной формы пероксидазы (оксоферрил р-катион-радикал или Compound I) в окислении фенольных соединений чайных экстрактов являются результаты, представленные на рис. 2. Из приведенных данных видно, что при добавлении H_2O_2 к раствору пероксидазы в Na-фосфатном буфере (pH 7,4) изменяются спектральные свойства фермента и

появляются полосы поглощения, характерные для Compound I пероксидазы. При добавлении фенольных соединений экстракта зеленого чая наблюдается восстановление спектральных свойств и переход фермента в исходную форму. Это означает, что после внесения фенольных экстрактов чая (т. е. субстратов пероксидазы) происходит каталитический цикл пероксидазного окисления и превращение активного соединения пероксидазы (степень окисления $Fe=5+$) в неактивное состояние (степень окисления $Fe=3+$). Аналогичные результаты получены и при изучении взаимодействия Compound I пероксидазы с фенольными соединениями экстрактов белого и красного чая.

Определена активность пероксидазы в реакции пероксидазного окисления фенольных соединений водных экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая (табл. 1). По нашим данным, пероксидаза лучше всего окисляет фенольные соединения зеленого и белого чая, а красного чая - в 3,3-3,8

раза хуже. Такое положение дел может быть обусловлено особенностями качественного и количественного состава катехинов чая. Экстракты различных сортов китайского чая существенно отличаются друг от друга по содержанию катехинов [2-4]. В экстракте зеленого чая содержание эпигаллокатехина, эпикатехингаллата и эпигаллокатехингаллата достигает 26,7 %, в красном - 23,2 %, а в черном - всего лишь 4,3 % [16]. Кроме этого, различные эффекты могут быть связаны с тем, что, в отличие от зеленого и белого чая, красный китайский чай является частично ферментированным продуктом [2-4]. Поэтому в водных экстрактах красного чая присутствуют не только мономерные фенольные соединения, но и продукты их окисления - конденсированные фенольные соединения [17], которые можно отнести к «плохим» субстратам пероксидаз.

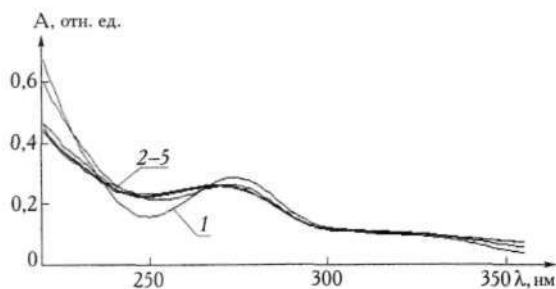


Рис. 1. UV-Vis-спектры поглощения экстрактов зеленого чая до (1) и после начала пероксидазной реакции (2-5)

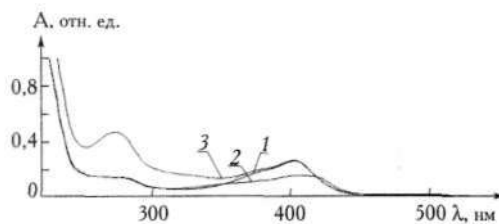


Рис. 2. UV-Vis-спектры поглощения раствора неактивной пероксидазы (1), Compound I пероксидазы после добавления H_2O_2 (2) и после внесения экстракта зеленого чая (3)

Таблица 1

Активность пероксидазы хрена в реакции пероксидазного окисления фенольных соединений водных экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая

Китайский чай	Удельная активность пероксидазы, ΔА/мин на 1 мг пероксидазы
Зеленый	59,8 ± 4,2
Красный	25,0 ± 1,4
Белый	53,5 ± 3,7

Таблица 2

Активность пероксидазы хрена в реакции окисления фенольных соединений красного, зеленого и белого китайского чая в присутствии ингибиторов (NaN₃, тиомочевина) или субстрата (KI) пероксидаз

Реакционная среда + добавки	Активность пероксидазы хрена. % к контролю		
	Зеленый чай	Красный чай	Белый чай
Без добавок (контроль)	100	100	100
+ NaN ₃ , 1 mM	41,3	3,6	28,0
+ KI, 1 mM	30,9	12,8	13,5
+ тиомочевина, 1 mM	51,5	0	7,5

Примечание. Приведены средние значения трех измерений.

Измерена активность пероксидазы в реакции окисления фенольных соединений экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая в присутствии специфических ингибиторов или альтернативного субстрата пероксидаз. Из данных табл. 2 видно, что при добавлении ингибиторов (NaN₃, тиомочевина)

или субстрата (KI) наблюдается выраженное уменьшение активности пероксидазы в реакции окисления фенольных соединений чая. Остаточная активность пероксидазы составляет в основном не более 50 % от исходной. При этом максимальную чувствительность к модификаторам проявляет реакция пероксидазного окисления фенольных соединений экстрактов красного китайского чая. Известно, что азид натрия подавляет все гемсодержащие пероксидазы за счет связывания с гемовым железом, а тиомочевина ингибирует активность пероксидаз и эффективно дезактивирует пероксидные соединения [8-11, 15]. Антипероксидазное действие йодида калия, альтернативного субстрата пероксидаз, может реализоваться за счет неферментативного взаимодействия с промежуточными продуктами пероксидазного окисления. Конкуренция йодида с фенольными соединениями китайского чая за связывание с активным центром фермента вряд ли возможна, так как считается, что йодид реагирует непосредственно с гемом пероксидаз, а фенольные субстраты - обычно с аминокислотными радикалами белковой части фермента [8-11,15]. Такие представления часто используются в качестве важного критерия идентификации пероксидаз и предлагаются для объяснения механизмов ингибирования пероксидазных реакций.

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы. Фенольные соединения водных экстрактов красного, зеленого и белого китайского чая окисляются пероксидазой хрена по пероксидазному (а не оксидазному) пути. В ходе этого процесса образуется активированное промежуточное соединение пероксидазы с пероксидом водорода (Compound I), претерпевающее дальнейшее каталитическое превращение при добавлении экстрактов китайского чая. Специфичность участия пероксидазы в реакции окисления фенольных соединений экстрактов китайского чая подтверждается данными об ингибировании реакции в присутствии специфических ингибиторов или альтернативного субстрата пероксидаз. Предполагается, что выявленные особенности пероксидазного окисления фенольных соединений различных сортов китайского чая определяются индивидуальностью состава биологически активных фенольных соединений.

1. Hollman P.C, Feskens E.J., Katan M. B. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999. Vol. 220. P. 198.
2. Graham H. // Prev. Med. 1992. Vol. 21. P. 334.
3. Balentine D.A., Wiseman S.A., Bouwens L.C. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1997. Vol. 37. P. 693.
4. Barroso M. B., Gerrit van de Werken // J. High Res. Chrom. 1999. Vol. 22. P. 225.
5. Запрометов М. Н. Биохимия катехинов. М., 1964.
6. Alberts D.S., Hakim I., Hara Y. и др. // Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2001. Vol. 10. P. 53.
7. Сенчук В.В., Курченко В. П. // Выбранные научные работы Белорусского государственного университета: у 7 т. Мн., 2001. Т. 7. С. 62.
8. Dunford H.B. Heme Peroxidases. New York, 1999.
9. O'Brien P. // Chem. Biol. Interact. 2000. Vol. 129. P. 113.
10. Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology / K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C. Penal, H. Greppin (eds.). Geneva, 1993.
11. П. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М., 1988.
12. Сенчук В.В., Ван Нин // Молекулярно-биологические и физико-химические методы идентификации биологических объектов и материалов различного происхождения: Материалы конф. Мн., 2004. С. 46.
13. Aebi H. E. // Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. & Grabl, M., eds.). 3rd ed. Verlag Chemie. 1983. Vol. 3. P. 273.

14. Schonbaum G.R., Lo S. // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247. P. 3353.
15. Saunders B.C. // Inorganic Biochemistry. Elsevier. G.L. Eichhorn (ed.). 1973. P. 988.
16. Yeh G.C., Chen H.Y. // Mutagenesis. 1996. Vol. 11. P. 37.
17. Liang Y., Lu J., Zhang L. et al. // Food Chemistry. 2003. Vol. 80. P. 283.

Поступила в редакцию 23.03.05.

Ван Нин - студент 5-го курса биологического факультета.

Вадим Валентинович Сенчук - кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии.