

ОКИСЛЕНИЕ МЕЛАТОНИНА ГЕМОПРОТЕИНАМИ

Д. Е. Стрельцова

ВВЕДЕНИЕ

Мелатонин – гормон эпифиза, вовлеченный в регуляцию суточных ритмов и других физиологических функций (иммунные процессы, регуляция кровяного давления, контроль настроения и поведения, подавление роста опухолей) [1]. Помимо этого мелатонин является эффективным антиоксидантом. Он непосредственно взаимодействует с активными формами кислорода и азота, стимулирует антиоксидантные ферменты и повышает эффективность действия ряда антиоксидантов [2].

В печени млекопитающих происходит 6-гидроксилирование или О-диметилирование мелатонина цитохромами группы Р450 с образованием 6-гидроксимелатонина или N-ацетилсеротонина, которые затем подвергаются сульфатной или глюкуронидной конъюгации. Еще один путь превращений мелатонина включает размыкание индольного кольца под действием различных ферментов (например, такими гемопротеинами, как миелопероксидаза, индоламин-2,3-диоксигеназа, пероксидаза хрена и др.) или активных форм кислорода с образованием N¹-ацетил-N²-формил-5-метоксикинурамин (АФМК) и N-ацетил-5-метоксикинурамин (АМК) [3; 4; 5; 6].

Цель работы заключалась в изучении особенностей окисления мелатонина пероксидом водорода в присутствии гемопротеинов – лактопероксидазы, гемоглобина и пероксидазы хрена.

В настоящее время достаточно детально изучено окисление мелатонина гемоглобином и пероксидазой хрена [5; 6]. В то же время взаимодействие мелатонина с лактопероксидазой практически не исследовано. В связи с этим представлялось необходимым более детально изучить реакции мелатонина с лактопероксидазой в сопоставлении их с реакциями, катализируемыми гемоглобином и пероксидазой хрена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Окисление мелатонина проводили в водном 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4) или 0,1 М растворе, содержащем лимонную кислоту и цитрат натрия (рН 5,5). Концентрации реагентов составляли: мелатонина – 50 мкМ и H₂O₂ – 10 мкМ. Ферменты вводили в раствор в концентрациях: гемоглобин – 100 мкМ, лактопероксидаза – 100 мкМ,

пероксидаза хрена – 100 мкМ. В качестве ингибитора использовали азид натрия (конечная концентрация 10 мМ).

В ряде контрольных экспериментов, для исключения образования аквакомплексов железа в раствор добавляли эффективный хелатирующий лиганд – ЭДТА ($w = 0,08 \%$).

Идентификацию продуктов окисления мелатонина пероксидом водорода в присутствии гемопротеинов проводили на спектрофотометре Cary 50 (Varian, Australia) в интервале длин волн 240-700 нм. Концентрации растворов H_2O_2 , лактопероксидазы, пероксидазы хрена определялись спектрофотометрически с использованием коэффициентов молярной экстинкции $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{412} = 114000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{403} = 103000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окисление субстратов пероксидазами обычно происходит с помощью цикла нативный фермент – соединение I – соединение II – нативный фермент. При взаимодействии пероксидазы хрена с пероксидом водорода образуется соединение I, которое содержит оксиферрильный гем и порфириновый свободный радикал. Соединение I восстанавливается донором электронов с образованием соединения II, а затем нативного фермента [7].

В ходе изучения реакции окисления мелатонина пероксидазой хрена при pH 5,5 и pH 7,4 было показано, что мелатонин восстанавливает соединение II пероксидазы до нативного фермента. Об этом можно судить по сдвигу максимума поглощения от 420 нм к 403 нм (рис. 1).

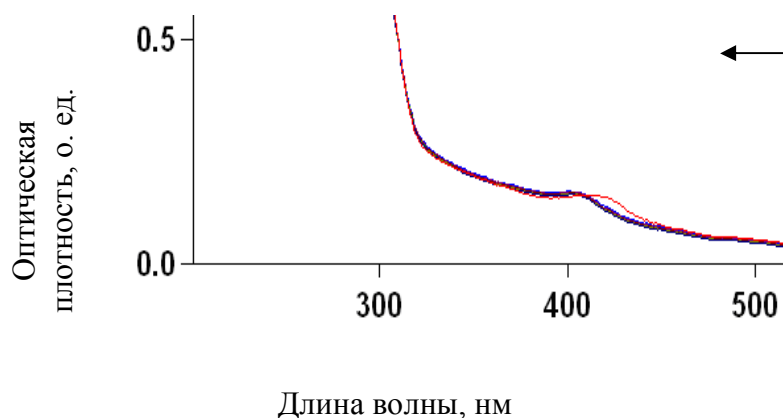


Рис. 1. Спектр поглощения раствора, содержащего мелатонин, пероксид водорода и пероксидазу хрена в области 300-500 нм. Записано 5 спектров поглощения с временным интервалом в 5 мин.

На следующем этапе было проведено исследование взаимодействия мелатонина с лактопероксидазой при различных значениях pH. При

pH 5,5 спектрофотометрически не регистрируется образование промежуточных форм лактопероксидазы. При щелочных значениях pH отмечался сдвиг максимума поглощения от 430 нм к 423 нм, что может указывать на переход между промежуточными соединениями лактопероксидазы (рис. 2).

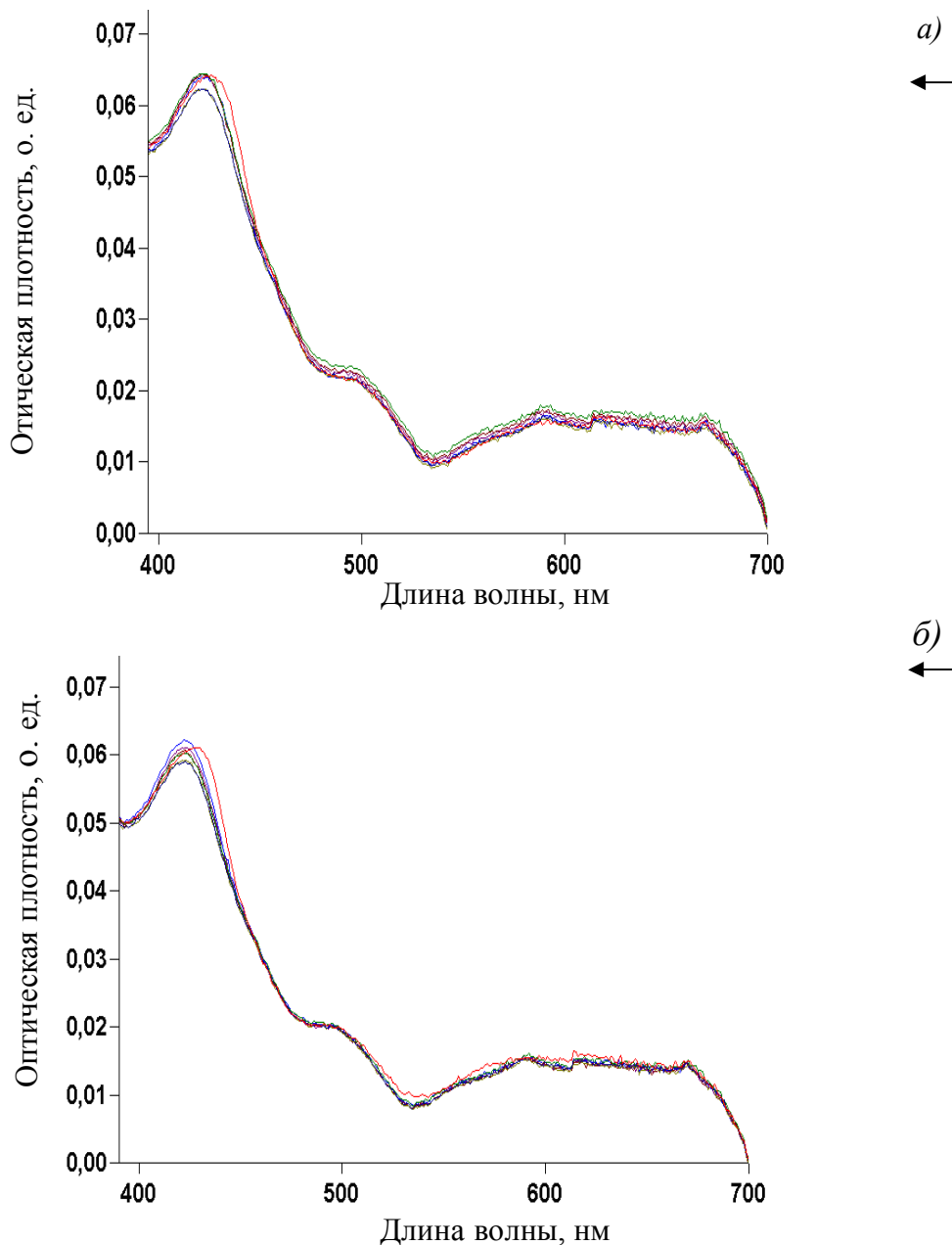


Рис. 2. Спектры поглощения раствора, содержащего мелатонин, пероксид водорода и лактопероксидазу при значениях pH 7, 8, в области 400-700 нм. а) – спектр поглощения реакционной среды при pH 7; б) – спектр поглощения реакционной среды при pH 8. Записано 5 спектров поглощения с временным интервалом в 5 мин.

На следующем этапе мы показали, что при добавлении H_2O_2 к раствору гемоглобина наблюдаются спектральные изменения в области 520-700 нм, что может свидетельствовать об образовании оксоферриль-

ного гема. Так как оксоферильная форма белков является сильным окислителем, способным повреждать большинство биологических молекул, актуально изучать способность различных соединений восстанавливать эту форму до гемоглобина [5; 8]. В результате проведенных экспериментов было установлено, что добавление мелатонина инициирует восстановление оксоферрилгемоглобина до гемоглобина.

С целью доказательства того, что окисление мелатонина катализируется ферментативным путем было проверено влияние ингибитора гемопротеиновых соединений – азид натрия – на протекание реакций. Нами было показано, что 10 мМ азид натрия ингибирует протекание реакций окисления мелатонина гемопротеинами.

Изменений спектра поглощения мелатонина (конечная концентрация 50 мкМ) при инкубации с пероксидом водорода (конечная концентрация 10 мкМ) не наблюдалось. Таким образом, нами была исключена возможность неферментативного окисления мелатонина пероксидом водорода.

На следующем этапе исследования было изучена возможность окисления мелатонина за счет присутствия свободных ионов железа. Для изучения такой вероятности изучалось влияние 0,08 % ЭДТА на протекание реакций окисления мелатонина гемопротеинами. Было показано, что 0,08 % ЭДТА не влиял на протекание реакции. Это свидетельствует о том, что свободные ионы железа не играют значительной роли в окислении мелатонина.

Для оценки возможного влияния отдельных компонентов реакционной смеси на физико-химические свойства используемых гемопротеинов были проведены следующие реакции:

- между пероксидом водорода и гемопротеинами;
- между мелатонином и использованные в работе белками.

Инкубация перекиси водорода (конечная концентрация 10 мкМ) с гемоглобином, пероксидазой хрена или лактопероксидазой (конечная концентрация белков 100 мкМ) приводит к открытию порфиринового кольца.

Нами было продемонстрировано, что мелатонин (конечная концентрация 50 мкМ) не изменяет характерные для каждого из белков спектры поглощения.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было более детально изучено взаимодействие мелатонина с лактопероксидазой, показана зависимость образования интермедиатов лактопероксидазы от значения pH.

Литература

1. Арушанян Э. Б. Гормон эпифиза мелатонин и его лечебные возможности // Рус. мед. журн. 2005. Том 13, № 26. С. 1755–1760.

2. *Reiter R. J., Tan D.-X., Mayo J. C. et al.* Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathological implications in humans // *Acta Biochimica Polonica*. 2003. Vol. 50. № 4. P. 1129–1146.
3. *Semak I., Korik E., Antonova M. et al.* Metabolism of melatonin by cytochrome P-450s in rat liver mitochondria and microsomes // *J. Pineal Res.* 2008. Vol. 45, № 4. P. 515–523.
4. *Ferry G., Ubeaud C., Lambert P.-H. et al.* Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase // *Biochem. J.* 2005. Vol. 388. P. 205–215.
5. *Tesoriere L., Avellone G., Ceraulo L. et al.* Oxidation of melatonin by oxoferryl hemoglobin: a mechanistic study // *Free Radical Research*. 2001. Vol. 35. P. 633–642.
6. *Ximenes V. F., Fernandes J. R., Bueno V. B. et al.* The effect of pH on horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of melatonin: production of N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine versus radical-mediated degradation // *J. Pineal. Res.* 2007. Vol. 42, № 3. P. 291–296.
7. *Рогожсин В. В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. Санкт-Петербург. 2004.
8. *Шумаев К. Б., Петров Н. Э., Заббарова И. В. и др.* Взаимодействие оксоферрил-миоглобина и динитрозильных комплексов железа // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 5. С. 699–705.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

М. И. Чернявская

Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки является актуальной экологической проблемой. Попадая в почвенные или водные экосистемы в результате переработки, добычи и транспортировки, нефть приводит к необратимому нарушению природных биоценозов, угнетая процессы жизнедеятельности всех живых организмов. Очистка от этого сложного химического соединения требует значительных затрат связанных с использованием большого арсенала физических и химических методов, которые зачастую влекут за собой возникновение новых не менее опасных источников загрязнения. Общеизвестно, что основную роль в круговороте веществ в природе играют микроорганизмы, способные деградировать практически все известные соединения природного и антропогенного происхождения. В этом плане особый интерес представляют природные микробные сообщества сформировавшиеся в условиях высокого загрязнения нефтью и продуктами ее переработки, изучение которых позволит понять принцип их формирования и использовать его для разработки экологически безопасных технологий очистки окружающей среды от опасных поллютантов.