

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА *N*-ФОСФОНОМЕТИЛ-ГЛИЦИНОМ

© 2023 г. Л.В. Авдеева*, Я.В. Вахтерова**, Е.А. Саратовских*,#

*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, просп. Н.Н. Семёнова, 1, Черноголовка Московской области, 142432, Россия

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/51, Москва, 119912, Россия

#E-mail: easar@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Исследовано ингибирование активности пероксидазы хрена *N*-фосфонометил-глицином, действующим веществом самого распространенного в сельскохозяйственной практике в мире гербицида раундапа (глифосата). Показано, что *N*-фосфонометил-глицин ингибирует активность пероксидазы из корней хрена по конкурентному типу, $K_i = 0.1004$ мМ. Определена константа Михаэлиса $K_m = 1.776$ мМ и величина концентрации $I_{50} = 0.302$ мМ. Полученные данные показывают, что *N*-фосфонометил-глицин способен блокировать работу антиоксидантной системы и в теплокровных организмах может стать причиной накопления свободных радикалов, что является дополнением к имеющимся литературным данным о биологических мишенях, на которые направлено действие раундапа.

Ключевые слова: раундап (глифосат), пероксидаза хрена, ингибирование активности фермента.

DOI: 10.31857/S0006302923030031, **EDN:** FPODNK

Экологическая опасность химического загрязнения окружающей среды проявляется в прямом и опосредованном токсическом действии на живые организмы веществ, не предназначенных природой к естественному метаболизму. Техногенные выбросы в окружающей среде приводят к изменению нормального протекания биохимических реакций. В результате этого, экосистемы теряют способность к самоочищению. Накопление токсикантов в природных объектах обуславливает прогрессирующие темпы сокращения ресурсов — запасов питьевой воды, промышленных организмов, плодородия почв.

Раскрытие молекулярных механизмов биологического действия экотоксикантов на структурно-функциональные системы клетки — ферментные системы, биомембраны, генетический аппарат — необходимы для успешной борьбы за чистоту окружающей среды и безопасность существования человека. Без понимания химической причины возникновения токсичности невозможно создавать методы контроля состояния окружающей среды, прогнозировать токсичность и отда-

ленные последствия применения препаратов, предотвращать возникновение вредных продуктов трансформации исходных соединений, разрабатывать эффективные и экологически безопасные способы переработки отходов промышленных и сельскохозяйственных производств, стоков коммунально-бытового хозяйства.

До 80% пестицидов адсорбируется почвенным гумусом, в таком состоянии они практически не подвергаются биоразложению, вследствие чего их время жизни в почвенном покрове значительно возрастает [1]. Накапливаясь в почвах, растениях и животных, они вызывают глубокие и необратимые нарушения нормальных циклов биологического круговорота веществ [2], отрицательно влияют на живые организмы почв [3]. Подавляемые виды насекомых вырабатывают резистентность, заставляя применять более токсичные препараты [2, 4]. Появляются в качестве сорных виды растений, более устойчивые к действию гербицидов [4, 5], увеличивается эрозия почв. В частности, с ростом применения гербицида раундапа происходит образование водородных связей между его фосфорными группами и гуминовыми полимерами, приводящее к дезагрегации молекул гуминовых кислот [6, 7]. Уменьшается содержание микроэлементов и других веществ в расте-

Сокращения: *N*-ФМГ — *N*-фосфонометил-глицин, ВПС-синтаза — 5-энолпирувилкиназа-3-фосфат-синтаза, ПХ — пероксидаза хрена.

ниях, способность сельскохозяйственной продукции к хранению, вкусовые качества и пищевую ценность растений [8].

Вещество с тривиальным названием глифосат используется более чем в 20 коммерческих препаратах, в частности, в раундапе (далее по тексту мы приводим те названия, которые использовали авторы в конкретной цитируемой статье). Раундап является самым распространенным по объему производства и применения в практике сельского хозяйства в мире [9]. Это неселективный системный гербицид, использующийся для борьбы с сорняками, особенно многолетними. Действующее вещество имеет систематическое название *N*-фосфонометил-глицин (*N*-ФМГ).

Всякое вещество, которое в следовых количествах оказывает биологическое действие, влияет на какую-то ферментативную реакцию. Считается, что действие раундапа, как и других фосфорорганических пестицидов, на растение обусловлено тем, что он ингибирует фермент растений 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазу (ВПСП-синтаза, КФ 2.5.1.19) [10, 11]. ВПСП-синтаза является компонентом ферментной системы шикиматного пути биосинтеза бензоидных ароматических соединений (содержащих бензольные кольца) и осуществляет одну из стадий превращения шикимата в хоризмат — предшественник трех ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), *para*-аминобензоата, терпеноидных хинонов (убихинона, пластохинона, филлохинона), ряда других важных метаболитов (фенолов, ароматических кислот, токоферолов, алкалоидов, фитогормонов), лигнинов и др. [12, 13].

На ферменте ВПСП-синтазе, выделенном из *Escherichia coli*, определено обратимое ингибирование его раундапом с псевдопервым порядком, при $K_i = 45 \text{ мМ}$ и $V_{\max} = 1.1 \text{ мМ} \cdot \text{мин}^{-1}$ [14]. В прямой реакции ингибирование конкурентное по фосфоэнолпирувату [15], но неконкурентное по шикимат-3-фосфату. Продукт реакции конкурентно ингибирует и то, и другое. В обратной реакции — неконкурентно ингибируется фермент из *Streptococcus pneumoniae*, но бесконкурентно — неорганический фосфат. Это указывает на образование непродуктивного четырехчленного комплекса между ферментом, раундапом и фосфатом [16]. Октаэдрическая координация осуществляется ионом кобальта: ВПСП-синтаза—Co—раундап [17].

Поэтому при попадании раундапа на растение он проникает в клетки, блокирует синтез ряда необходимых соединений, и в результате растение погибает. Кроме растений, шикиматный путь имеют микроорганизмы, что подвергает опасности их жизненный цикл при наличии раундапа в окружающей среде [18]. Считается, что животные

не имеют ферментной системы шикиматного пути, в том числе они не имеют ВПСП-синтазы.

Однако в литературе имеется очень большое количество работ, доказывающих высокую опасность раундапа для живых организмов. Установлено, что раундап оказывает токсическое действие на живые организмы всех трофических уровней, в частности, у людей вызывает множество патологий — нарушения в работе печени, почек, онкологические заболевания. В марте 2015 г. Международное агентство по изучению рака ВОЗ обнародовало заключение, о том, что глифосат является «возможным канцерогеном для человека» (категория опасности «2А»). В заключении приводятся данные о повышенном уровне развития неходжкинской лимфомы у работающих с глифосатом [19]; о развитии рака у лабораторных крыс и мышей [20, 21]; о способности глифосата повреждать ДНК и вызывать абберрации хромосом в клетках человека и животных, культивируемых *in vitro*; а также приводить к повышению частоты хромосомных повреждений (микроядер) в клетках крови [21]. Показано [22] образование комплексов раундапа с ДНК и РНК, приводящее к потере комплементарности спирали.

Ранее было показано, что раундап ингибирует активность фермента НАДН-оксидоредуктазы, катализирующего многие окислительно-восстановительные реакции в клетках [23]. Естественно, вставал вопрос о способности окислительно-восстановительной системы организма растения или животного окислять и обезвреживать данное химическое токсичное соединение. Способность объектов окружающей среды к самоочищению, т.е. разложению загрязняющих веществ, во многом определяется протеканием ферментативных окислительно-восстановительных процессов в клетках растений и микроорганизмов. Поэтому мы исследовали действие раундапа именно на окислительный фермент.

В качестве объекта исследования взята пероксидаза хрена (ПХ). Выбор фермента обусловлен тем, что пероксидазы (КФ 1.11.1.X) относятся к классу оксидоредуктаз, ферментов основной антиоксидантной системы. ПХ окисляет широкий спектр субстратов, однако функционирует исключительно в присутствии пероксида водорода. Например, при исследовании ингибирования активности пероксидазы хрена хлорсодержащим гербицидом пиклорамом, было показано, что до концентрации $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ он не влиял на окисление содержащей протогем ПХ [24].

Цель настоящего исследования состоит в определении кинетических параметров ингибирования пероксидазы хрена гербицидом раундапом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы: вода дистиллированная; раундап («Август», Россия) в форме действующего вещества *N*-ФМГ ($C_3H_8NO_5P$), очищенного двойной перекристаллизацией из воды [25]; тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$, Merck, Германия) в виде 0.1 N водного раствора; серная кислота (neoFroxx, Германия), в виде 1 N раствора; йодид натрия (NaI, Biochem, Франция) в виде 1 N раствора; бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$ («ЛенРеактив», Россия) в форме порошка; крахмал растворимый («ЛенРеактив», Россия) в виде 1%-го раствора; молибдат натрия (Na_2MoO_4 , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.1%-го раствора; гидрохинон, ($C_6H_6O_2$, Sigma-Aldrich, США), очищенный экстракцией из диэтилового эфира согласно работе [26]; перекись водорода (H_2O_2 , Merck, Германия) в виде 35%-го раствора; уксусная кислота (CH_3COOH , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.2 M раствора; ацетат натрия (CH_3COONa , «ЛенРеактив», Россия) в виде 0.2 M раствора; натрий-ацетатный буфер (pH 5.4) в концентрации 0.05 M. Пероксидаза хрена была выделена из корней хрена экстракцией водой с последующей фильтрацией с помощью ионообменной хроматографии и диализа согласно работе [27].

Приборы. Текущую концентрацию водных растворов регистрировали на UV-VIS-спектрофотометре BUOLAMBDA-45 (Perkin Elmer, США) при температуре 23°C. Использовали кварцевые кюветы объемом 3.0 мл и длиной оптического пути 1 см.

Определение концентрации перекиси водорода. Определение концентрации H_2O_2 в растворе выполняли йодометрическим методом [28].

Определение концентрации гидрохинона. Концентрацию гидрохинона в растворах определяли спектрофотометрически по калибровочной прямой, построенной по поглощению при $\lambda = 289$ нм и определенному в ходе исследования коэффициенту экстинкции $\epsilon = 2691 \pm 43 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Проведение предварительных реакций между компонентами системы. Возможность протекания реакции между гидрохиноном и *N*-ФМГ проверяли при молярных соотношениях гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 1; 1 : 3 и 3 : 1; исходные концентрации: гидрохинон — 0.15 мМ и *N*-ФМГ — 0.167 мМ. Возможность протекания реакции между гидрохиноном и H_2O_2 проверяли при молярных соотношениях гидрохинон : H_2O_2 = 1 : 1; 1 : 2 и 2 : 1; исходные концентрации: гидрохинон — 0.336 мМ и H_2O_2 — 0.318 мМ. Реакцию в тройной системе гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 проводили при молярном соотношении реагентов 1 : 1 : 1. Исходные

концентрации растворов: гидрохинон — 0.336 мМ, *N*-ФМГ — 0.331 мМ и H_2O_2 — 0.318 мМ. Для каждой реакции регистрировали изменение электронных спектров гидрохинона во времени.

Определение активности фермента и величины константы ингибирования. Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ($\epsilon = 102 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [29]. За единицу активности ПХ принимали его количество, окисляющее 1 мкМ гидрохинона за 1 мин. Удельная активность составляла 110 ед/мг (мкМ окисленного субстрата в 1 мин на 1 мг белка). Значение *RZ* определяли как отношение поглощения при $\lambda = 403$ нм к поглощению при $\lambda = 275$ нм. Спектральный показатель чистоты *RZ* = 2. Каталитическую активность фермента ПХ определяли на основании контроля концентрации гидрохинона. Реакцию окисления гидрохинона на ферменте в присутствии H_2O_2 проводили при 23°C в 0.05 M натрий-ацетатном буфере, pH 5.4. Концентрации используемых веществ: гидрохинон — 0.05÷0.4 мМ; H_2O_2 — 0.64 мМ; ПХ — 15 нМ. Ингибирование пероксидазного окисления гидрохинона изучали путем добавления ингибитора *N*-ФМГ (в концентрации 0÷0.5 мМ) в кювету вместе со всеми компонентами системы.

В работе использовали методику Михаэлиса—Ментен. На первом этапе получали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации гидрохинона и определяли I_{50} — концентрацию ингибитора, при которой скорость ферментативной реакции составляет 50% от скорости в отсутствие ингибитора. На втором этапе проводили эксперименты при постоянной концентрации H_2O_2 и изменяющейся концентрации гидрохинона.

Значения константы ингибирования активности фермента K_i рассчитывали по формуле [30]:

$$K_i = \frac{I_{50} \cdot K_m}{\frac{S}{v} - K_m},$$

где K_i — константа ингибирования, I_{50} — концентрация пестицида ингибитора, K_m — полученные значения константы Михаэлиса для гидрохинона, v — скорость в конкретный момент времени, S — концентрация гидрохинона, V — максимальная скорость, взята из графика Лайнуивера—Бэрка.

Все эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистический разброс данных не превышал 3%.

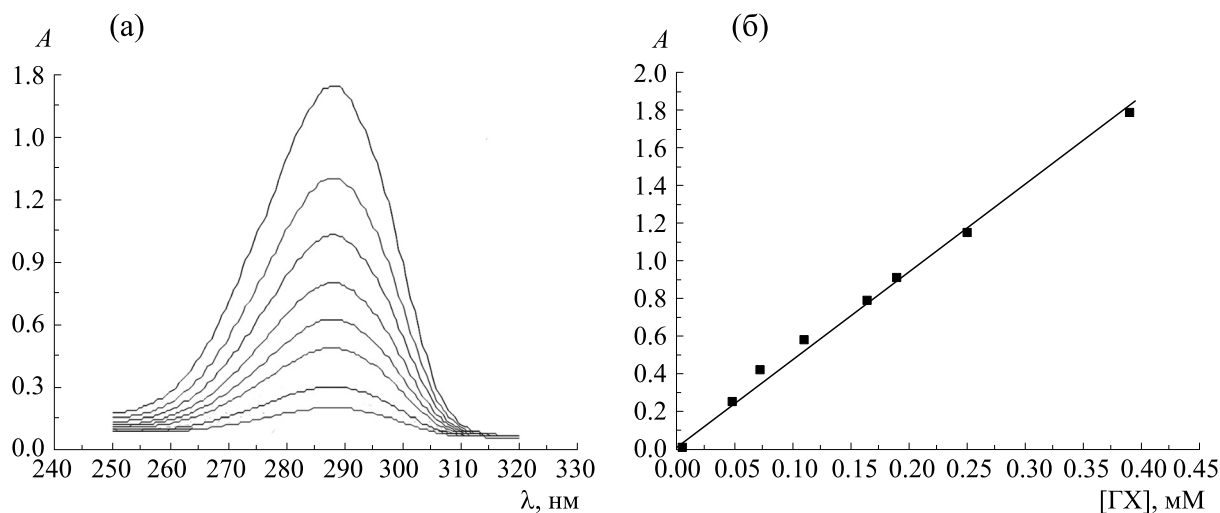


Рис. 1. (а) — Электронные спектры водных растворов гидрохинона в различных концентрациях ($0.39 \div 0.048$ мМ), (б) — график зависимости оптической плотности растворов гидрохинона от концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование кинетики и механизма ингибирования активности ПХ действующим веществом раундапа — *N*-ФМГ. За ходом реакции окисления гидрохинона пероксидом водорода наблюдали по уменьшению оптической плотности гидрохинона (рис. 1а).

По линейной зависимости оптической плотности раствора гидрохинона от концентрации свежеприготовленного раствора (рис. 1б) определен коэффициент экстинкции $\epsilon = 2691 \pm 43 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Это значение использовано в дальнейшем для расчета кинетических параметров реакции окисления гидрохинона.

Изучали кинетику реакций «гидрохинон + раундап», «гидрохинон + перекись водорода», «гидрохинон + раундап + перекись водорода». Исследуемая система является многокомпонентной, содержащей ПХ, *N*-ФМГ, H_2O_2 и гидрохинон. В ней гидрохинон — активнейший восстановитель, а H_2O_2 — сильнейший окислитель. Поэтому необходимо установить, являются ли компоненты системы инертными друг к другу, в частности, не происходит ли фонового окисления гидрохинона без участия ПХ. Полученные результаты представлены на рис. 2 (кривые 1–3).

Как видно из рис. 2 (кривая 3), концентрация гидрохинона в смесях остается неизменной от 40 мин до полутора часов для всех проверенных соотношений гидрохинон : *N*-ФМГ. Концентрация гидрохинона в смесях гидрохинон : H_2O_2 (рис. 2, кривая 1) остается неизменной от 25 мин наблюдения, также при трех исследованных соотношении компонентов. Это означает, что реакционные взаимодействия между гидрохиноном и

N-ФМГ, а также между гидрохиноном и H_2O_2 в диапазоне исследованных нами концентраций отсутствуют, т.е. не наблюдается параллельная реакция окисления гидрохинона, обусловленная наличием в системе H_2O_2 и/или растворенного кислорода. Это позволяет не учитывать спонтанное окисление гидрохинона в дальнейших экспериментах.

В тройной системе гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 концентрация гидрохинона остается неизменной в течение 25 мин (рис. 2, кривая 2). Таким образом, компоненты исследуемой реакционной системы (гидрохинон, *N*-ФМГ и H_2O_2) являются инертными по отношению друг к другу.

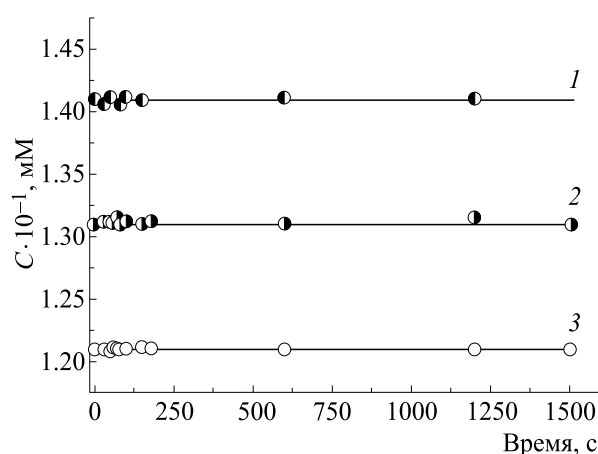


Рис. 2. Динамика изменения концентрации гидрохинона в присутствии компонентов реакционной системы: 1 — H_2O_2 (гидрохинон : $\text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 1$); 2 — H_2O_2 и *N*-ФМГ (гидрохинон : H_2O_2 : *N*-ФМГ = 1 : 1 : 1); 3 — *N*-ФМГ (гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 3).

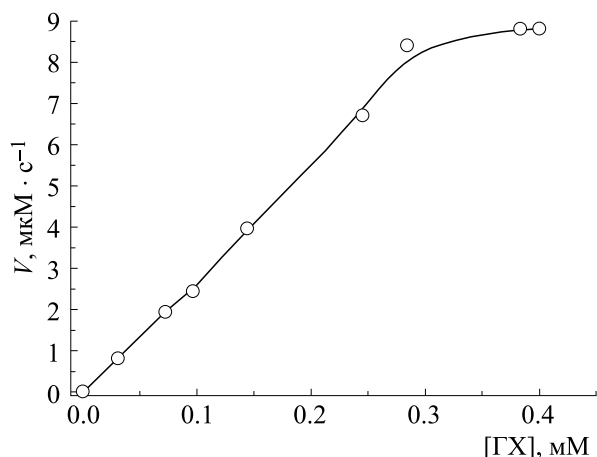


Рис. 3. Скорость окисления гидрохинона ($0.05 \div 0.4$ мМ) на ферменте ПХ (15 нМ) в присутствии 0.64 мМ H_2O_2 . Среда — 0.05 М Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

Кинетика окисления гидрохинона на пероксидазе хрена. Известно, что гидрохинон относится к группе быстро окисляемых субстратов ПХ [31]. Кинетика пероксидазного окисления гидрохинона подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен. На рис. 3 приведена экспериментальная кинетическая кривая скорости реакции фермента ПХ от концентрации субстрата — гидрохинона — при постоянной концентрации H_2O_2 . Из нее следует, что константа Михаэлиса $K_m = 0.1776$ мМ.

Влияние N -ФМГ на активность ПХ иллюстрирует рис. 4. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона в присутствии различных концентраций N -ФМГ строятся в координатах Лайнуивера—Берка. Полученные результаты показывают прямую зависимость снижения скорости ферментативной реакции от концентрации N -ФМГ. Величина концентрации N -ФМГ, приводящая к падению скорости ферментативной реакции в два раза (I_{50}), составляет 0.302 мМ.

Как видно из рис. 5, зависимость изменения скорости реакции от концентрации гидрохинона в двойных обратных координатах (координаты Лайнуивера—Берка) носит линейный характер и демонстрирует конкурентный тип ингибирования по донору электронов — гидрохинону. Значения кажущихся констант Михаэлиса составляют $K'_m = 0.883$ мМ и $K'_m = 0.552$ мМ при концентрациях субстрата 0.398 мМ и 0.31 мМ соответственно. Максимальная скорость ферментативной реакции составила $V = 0.5$ мкМ·с $^{-1}$.

Следовательно, N -ФМГ блокирует фермент, связываясь с некими активными группами молекул или аминокислотными остатками, вероятно:

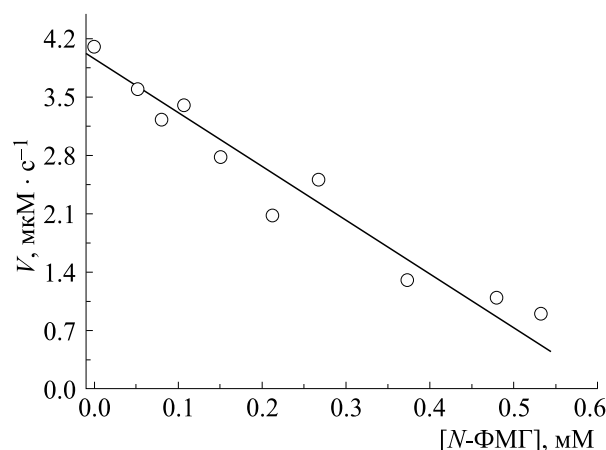


Рис. 4. Зависимость скорости окисления гидрохинона ($0.05 \div 0.4$ мМ) на ферменте ПХ (15 нМ) в присутствии 0.64 мМ H_2O_2 от концентрации ингибитора N -ФМГ ($0.05 \div 0.53$ мМ). Среда — 0.05 М Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

SH , NO^- , COO^- , находящимися внутри активного центра фермента.

Экспериментальные кинетические параметры ферментативного процесса приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что с увеличением концентрации гидрохинона происходит возрастание величины K'_m . Значения K_i рассчитывали по уравнению [30]. Полученное значение константы ингибирования $K_i = 0.1004$ мМ.

Механизм ингибирования активности пероксидазы хрена N -фосфонометил-глицином. Известно,

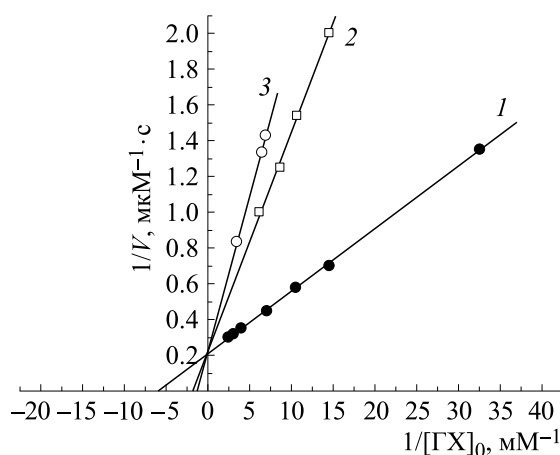


Рис. 5. Зависимость обратной скорости ферментативной реакции от обратной концентрации ингибитора N -ФМГ (координаты Лайнуивера—Берка): 1 — без ингибитора, 2 — в присутствии 0.31 мМ N -ФМГ, 3 — в присутствии 0.398 мМ N -ФМГ. Концентрации реагентов: ПХ — 20 нМ, H_2O_2 — 0.62 мМ, гидрохинон — $0.07 \div 0.285$ мМ, среда — 0.05 М Na-ацетатный буфер, pH 5.4.

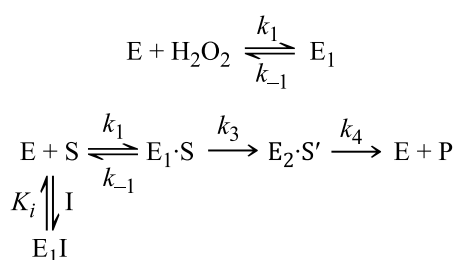
Таблица 1. Кинетические параметры пероксидазной реакции

Система	Кинетический параметр			
	I50, mM	K_m , mM	K_m' , mM	V , мкМ · с ⁻¹
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ	—	0.1776		5.00
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ + + <i>N</i> -ФМГ ($S = 0.398$ мМ)	0.302		0.883	5.00
Гидрохинон + H ₂ O ₂ + ПХ + + <i>N</i> -ФМГ ($S = 0.31$ мМ)	0.302		0.552	5.00

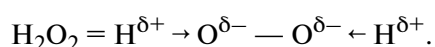
что *N*-ФМГ представляет собой аналог аминокислоты глицина. В растениях *N*-ФМГ блокирует работу ВПС-синтазы, тем самым угнетается синтез ароматических аминокислот, белка, хлорофилла, в результате чего растения погибают [32].

Кроме того, было показано [23], что *N*-ФМГ ингибирует активность НАДН-оксидоредуктазы. Это приводит к угнетению окислительно-восстановительных процессов как в растениях, так и в живых организмах. При этом *N*-ФМГ достаточно легко образует комплексы с металлами вида $M(N\text{-ФМГ})_2$ [33]. В результате повышается токсичность гербицида и меняется место связывания в активном центре. Ингибитор связывается в непосредственной близости к $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -кластеру активного центра НАДН-оксидоредуктазы [23]. Можно предположить, что и в ПХ ингибитор ориентируется на ион железа в составе гема активного центра.

Полученные результаты показали, что *N*-ФМГ инактивирует ПХ. Механизм ингибирования ПХ является весьма сложным и может включать несколько стадий. Конкурентное ингибирование *N*-ФМГ пероксидазного окисления гидрохинона, по-видимому, протекает по классической схеме 1.

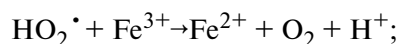
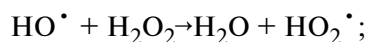
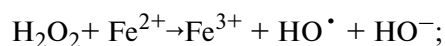


Работа ПХ происходит исключительно в присутствии H₂O₂, приводящей фермент в активированное состояние (E₁). В молекуле пероксида водорода электронная плотность смещена в сторону атомов кислорода [34]:



Реакция разложения пероксида водорода в присутствии катализаторов часто протекает по

радикально-цепному механизму, при этом роль катализатора заключается в иницировании свободных радикалов [34, 35]. Если кроме водного раствора H₂O₂ присутствует Fe²⁺, тогда в системе идет реакция переноса электрона с иона Fe²⁺ на молекулу H₂O₂ с образованием иона Fe³⁺ и очень неустойчивого анион-радикала $[\text{H}_2\text{O}_2]^\bullet$, который сразу же распадается на анион HO⁻ и свободный гидроксильный радикал HO[•]. Радикал HO[•] очень активен, реализуя разнообразные реакции с органическими соединениями, в том числе окисления ароматических соединений. В отсутствие же подходящих реагентов HO[•] реагирует с H₂O₂ с образованием менее активного радикала HO₂[•], который способен восстанавливать ионы Fe³⁺, что замыкает каталитический цикл:



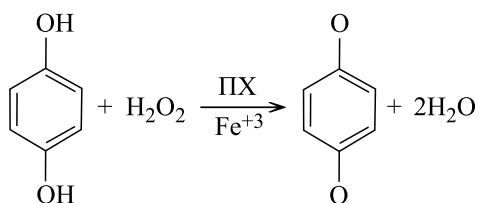
ПХ относится к двухкомпонентным ферментам, в ее состав входят гемин, представленный протопорфирином IX в комплексе с Fe³⁺, и полипептидная цепь [35, 36]. Пропионовокислые остатки протопорфирина направлены к поверхности, а винильные группы — во внутреннюю часть белка [37, 38]. Планарная структура гемина фиксируется внутри белка за счет π-электронных взаимодействий пропионовокислых остатков пиррольных колец протопорфирина с аминокислотными остатками: тирозина (Tyr), фенилаланина (Phe), триптофана (Trp), гистидина (His) и метионина (Met) [39]. Известно, что Phe-41 локализован между остатками дистальных His-40 и His-42. Последний координирует атом железа гемина в активном центре ПХ. При этом остаток Phe-143 расположен в проксимальной области гемина вблизи входа в полость, связывающую гем и совместно с Phe-142, формирует протяженный гид-

рофобный участок активного центра ПХ, связывающий субстрат [40].

Активный центр ПХ представлен Arg-38, Phe-41 и His-42; а Phe-142 и Phe-143 формируют канал доступа ароматических субстратов к активному центру [41,42]. Активную роль в каталитическом процессе пероксидазного окисления субстратов принимает ион Fe^{3+} , находящийся в координации с четырьмя атомами азотов пирролов протопорфирина, проксимальным лигандом которого является остаток имидазола гистидина белка His-170. В процессе восстановления перекиси водорода участвуют His-42 и Arg-38, расположенные в спирали В [41, 43, 44].

Причины широкой субстратной специфичности пероксидазы объясняются тем, что на поверхности белка реализуются несколько различных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема [45]. Ингибиторы пероксидаз — ионы, образующие прочные комплексы с катионом железа [35]. В восстановлении фермента участвуют соединения, являющиеся донорами водорода и донорами электронов.

В исследуемой реакции в активном центре в отсутствие ингибитора Fe^{3+} гем смещает в свою сторону электронную плотность донора электронов — перекиси водорода, возможно, через посредство аминокислотных остатков His-42 и(или) Arg-38. H_2O_2 претерпевает ряд превращений с образованием ионов и радикалов. Фермент переходит в окисленную форму (E_1). Гидрохинон, как сильнейший восстановитель, также входит в координацию с Fe^{+3} , который оттягивает на себя электронную плотность кислорода, что приводит к дегидрированию гидрохинона. При этом гидрохинон отдает два H^+ , а H_2O_2 принимает их на себя. Возникают две параллельные цепи: переноса e^- и переноса H^+ . Отдав e^- и H^+ реагенты, системы «расходятся» с образованием продуктов реакции: 1,4-бензохинона и воды:



Однако этого не происходит в присутствии ингибитора. В данном исследовании показано, что ингибитор *N*-ФМГ не взаимодействует ни с гидрохиноном, ни с H_2O_2 . Кроме того, он конкурирует с гидрохиноном за место связывания в активном центре. Очевидно, что *N*-ФМГ обладает значительной электронной плотностью за счет неподеленной электронной пары на двойной свя-

зи — $\text{P}=\text{O}$ и смещенной в сторону кислорода электронной плотности двух гидроксильных групп. Он атакует железо гема. Это кажется весьма вероятным, так как высокая комплексообразующая способность пестицидов с металлами, в частности с железом, была показана ранее [33]. В этом случае две группы HO^- в сочетании с двойной связью на кислороде при фосфорном конце молекулы *N*-ФМГ, имеют столь же значительную избыточную электронную плотность, что и H_2O_2 . Фосфорный остаток *N*-ФМГ способен к донированию двух H^+ . Аминокислотные группы, которые входят в активный центр ПХ (His-42, Phe-41, Arg-38), своими карбоксильными остатками могут достаточно легко вступить в реакцию с карбоксильным остатком *N*-ФМГ. Такое взаимодействие приведет к образованию прочной ковалентной связи между ферментом и ингибитором. Гипотетическая схема такого варианта ингибирования активности фермента представлена на рис. 6.

Прерываются цепь переноса электронов и цепь переноса протона. Фермент полностью дезактивирован: *N*-ФМГ препятствует вхождению гидрохинона в активный центр, связыванию, превращению и образованию продуктов реакции.

Снижение активности ПХ под действием *N*-ФМГ свидетельствует о снижении регулирования окислительно-восстановительных процессов и может приводить к накоплению перекиси водорода и усилению свободнорадикальных процессов в клетках. Полученные нами в настоящей работе данные расширяют круг знаний о тех ферментах, деятельность которых в растении или живом организме ингибирует гербицид раундап.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что гидрохинон в условиях проведения исследования (23°C ; 1.5 ч наблюдения; при соотношениях реагентов гидрохинон : *N*-ФМГ = 1 : 1; 1 : 3; 3 : 1; гидрохинон : H_2O_2 = 1 : 1; 1 : 2; 2 : 1; гидрохинон : *N*-ФМГ : H_2O_2 = 1 : 1 : 1) не вступает во взаимодействие ни с H_2O_2 , ни с *N*-фосфометил-глицином (глифосатом) — действующим веществом гербицида раундап.

2. Впервые показано, что *N*-фосфометил-глицин ингибирует пероксидазу из корней хрена. Данный результат является серьезным дополнением к имеющимся литературным данным о мишенях, на которые направлено действие гербицида раундап.

3. Определена константа Михаэлиса (K_m = 0.1776 мМ) и величина концентрации *N*-ФМГ, приводящая к падению скорости ферментативной реакции в два раза (I_{50} = 0.302 мМ). Установлено, что *N*-ФМГ ингибирует пероксидазу по

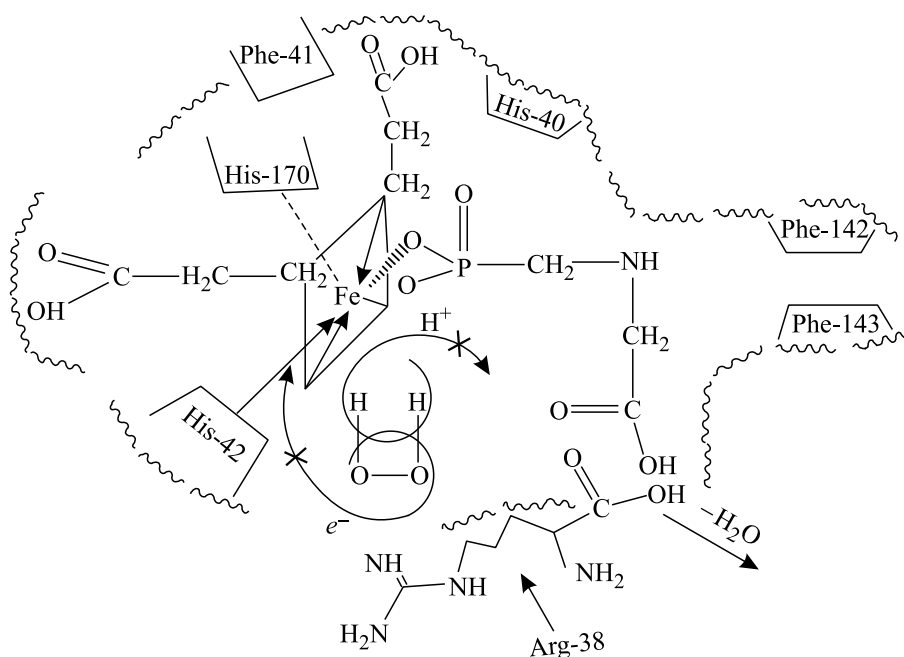


Рис. 6. Гипотетическая схема ингибирования активности ПХ N-ФМГ.

конкурентному типу. Значение K_i составляет 0.1004 мМ.

4. Полученные результаты доказывают, что гербицид раундап блокирует работу антиоксидантной системы, что в теплокровных организмах может стать причиной накопления свободных радикалов и онкологических перерождений тканей и органов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в соответствии с темами Государственного задания № 0089-2019-0014 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071890015-6) и № 0089-2019-0004 (№ государственной регистрации АААА-А19-119071190045-0).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. А. Головлёва и З. И. Филькенштейн, *Агрохимия*, № 3, 105 (1984).
2. С. А. Остроумов, *Введение в биохимическую экологию* (Изд-во МГУ, М., 1986).
3. Г. В. Меренюк, А. С. Усатая, Е. Е. Емнова и др., *Гигиена и санитария*, № 5, 20 (1987).
4. В. В. Курдюков, *Последствие пестицидов на растительные и животные организмы* (Колос, М., 1982).
5. А. В. Яблоков, *Ядовитая приправа. Проблемы применения ядохимикатов и пути экологизации сельского хозяйства* (Мысль, М., 1990).
6. И. В. Перминова, в сб. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, под ред. П. Д. Саркисова и М. П. Кирпичникова (ПИК Максима, М., 2003), с. 11.
7. В. Н. Давидчик, О. В. Королёва, Е. В. Степанова и др., в сб. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*, под ред. П. Д. Саркисова и М. П. Кирпичникова (Максима, М., 2003), с. 59.
8. Л. А. Юданова, *Пестициды в окружающей среде* (ГПНТБ СО АН СССР, Новосибирск, 1989).
9. Ch. M. Benbrook, *Environ. Sci. Eur.*, **28** (1), 3 (2016).
10. Е. М. Кузнецова и В. Д. Чмиль, *Современные проблемы токсикологии*, № 1, 87 (2010).
11. Д. Грин и Р. Гольдбергер, *Молекулярные аспекты жизни* (Мир, М., 1968).
12. V. Tzin, G. Galili, and A. Aharoni, In *eLS* (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2012). DOI: 10.1002/9780470015902.a0001315.pub2
13. *Saccharomyces Genome Database — S. cerevisiae Pathway: chorismate biosynthesis*: <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ALL-CHORISMATE-PWY-1>. Дата обращения: 30.12.2022.

14. Q. K. Huynh, G. M. Kishore, and G. S. Bild, *J. Biol. Chem.*, **263** (2), 735 (1988).
15. E. Schönbrunn, S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1376 (2001).
16. W. Du, N. G. Wallis, and D. J. Payne, *J. Enzyme Inhib.*, **15** (6), 571 (2000).
17. R. J. Ganson, R. A. Jensen., *Arch. Biochem. Biophys.*, **260** (1), 85 (1988).
18. N. E. De Long and A. C. Holloway, *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **10**, 101 (2017).
19. K. Z. Guyton, D. Loomis, Ya. Grosse, et al., *Lancet*, **16** (5), 490 (2015). DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8
20. D. Cressey, *Nature* (2015). DOI: 10.1038/nature.2015.17181
21. *IARC Monographs, V. 112: Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides* (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 20 March 2015).
22. Е. А. Саратовских, М. В. Личина, Б. Л. Психа и др., *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 9, 1984 (1989).
23. Е. А. Саратовских, Л. А. Коршунова, Р. И. Гвоздев и др., *Изв. АН. Сер. хим.*, № 5, 1284 (2005).
24. J. K. Chang and C. L. Foy, *Biochem. Physiol.*, **18** (2), 141 (1982).
25. Н. Н. Мельников, *Пестициды. Химия, технология и применение* (Химия, М., 1987).
26. Т. П. Позднякова, *Методы выделения и очистки органических соединений* (НТИ МГУДТ, Новосибирск, 2008).
27. K. G. Paul, *The Enzymes* (Acad. Press, N-Y., 1963).
28. Т. А. Большова, Г. Д. Брыкина, А. В. Гармаш и др., *Основы аналитической химии* (Акад., М., 2012).
29. S. Ogawa, Y. Shira, and I. Morishima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90** (2), 674 (1979).
30. М. Диксон и Э. Уэбб, *Ферменты* (Мир, М., 1982).
31. Г. С. Захарова, И. В. Упоров и В. И. Тишков, *Усп. биол. химии*, **51**, 37 (2011)
32. О. С. Медведев, *Комбикорма*, **4**, 61 (2017).
33. Е. А. Саратовских, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 10, 2327 (1989).
34. Л. И. Мухортова, Ю. Т. Ефимов, И. В. Глушков и др., *Химия и технология пероксида водорода* (Чуваш. ун-т, Чебоксары, 2020).
35. Г. Эйхгорн, *Неорганическая биохимия* (Мир, М., 1978).
36. K. G. Welinder, L. B. Smillie, and G. R. Schonhaum, *Canad. J. Biochem.*, **50** (1), 44 (1972).
37. Н. Н. Угарова, О. В. Лебедева и А. П. Савицкий, *Пероксидазный катализ и его применение* (МГУ, М., 1981).
38. А. П. Савицкий, Н. Н. Угарова и И. В. Березин, *Биоорган. химия*, **3** (9), 1242 (1977).
39. R. K. DiNello and D. H. Dolphin, *J. Biol. Chem.*, **56** (13), 6903 (1981).
40. K. G. Welinder, *Eur. J. Biochem.*, **151**, 497 (1985).
41. Т. Н. Аммосова, И. В. Упоров, М. Ю. Рубцова и др., *Биохимия*, **62** (4), 516 (1997).
42. M. Gajhede, P. Osmark, F. M. Poulsen, et al., *Nature Struct. Biol.*, **3**, 1040 (1996).
43. D. J. Schuller, N. Ban, R. B. van Huystee, et al., *Structure*, **4**, 311 (1996).
44. И. Г. Газарян, И. В. Упоров, Т. А. Чубарь и др., *Биохимия*, **63** (5), 708 (1998).
45. N. N. Ugarova, G. D. Kutuzova, V. V. Rogozhin, et al., *Bioch. Biophys. Acta*, **790** (1), 22 (1984). DOI: 10.1016/0167-4838(84)90327-3

Kinetics and Mechanism of Inhibition of Horseradish Peroxidase Activity by *N*-Phosphonomethyl-Glycine

L.V. Avdeeva*, Ya.V. Vakhterova**, and E.A. Saratovskikh*

*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. N.N. Semenova 5, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/51, Moscow, 119912 Russia

The inhibition of horseradish peroxidase activity by *N*-phosphonomethyl-glycine, an active ingredient in the most extensively used glyphosate-based herbicide (Roundup) in agricultural applications worldwide, was investigated. It has been shown that *N*-phosphonomethyl-glycine inhibits the activity of peroxidase from horseradish roots. This inhibition is of a competitive nature, the value of $K_i = 0.1004$ mM. The Michaelis constant ($K_m = 0.1776$ mM) and herbicide concentration (I_{50} of Roundup = 0.302 mM) were determined. The results demonstrate that *N*-phosphonomethyl-glycine can suppress the activity of the antioxidant system, and in warm-blooded organisms it may cause the accumulation of free radicals, thereby contributing to expanding knowledge of biological targets Roundup is applied to.

Keywords: Roundup (glyphosate), horseradish peroxidase, enzyme inhibition