

Inhibitorni efekat retinol-acetata na peroksidazu rena

Vladan R. Đurić¹, Nebojša R. Deletić¹, Vesna P. Stankov-Jovanović², Ranko M. Simonović³

¹Univerzitet u Prištini, Poljoprivredni fakultet u Lešku, Srbija

²Univerzitet u Nišu, Prirodno–matematički fakultet, Niš, Srbija

³Univerzitet u Prištini, Prirodno–matematički fakultet u Kosovskoj Mitrovici, Kosovska Mitrovica, Srbija

Izvod

Katalitička aktivnost peroksidaze rena, tokom koje ona istovremeno razlaže peroksid i oksiduje neki od kosupstrata, prevodeći ga u formu slobodnog radikala, praćena je pod kontrolisanim uslovima u prisustvu antioksidanata iz grupe vitamina C, E i A, odnosno njihovih u vodi rastvorljivih formi. Utvrđeno je da vitamin E nema uticaja na aktivnost enzima i sudbinu enzimski izmenjene oksidovane forme kosupstrata iz grupe derivata benzidina. Sa druge strane, dok se vitamin C nadovezuje na enzimsku reakciju, redukcijom oksidovanog kosupstrata, dotle vitamin A ispoljava ulogu nekompetitivnog inhibitora peroksidaze.

Ključne reči: peroksidaza, retinol, askorbinska kiselina, nekompetitivna inhibicija, oksidativni stres.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK 63:577.152.1:577.16

Hem. Ind. 67 (3) 419–426 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120602095D

Ljudska ishrana, kao i ishrana domaćih životinja i kućnih ljubimaca, sve više uključuje upotrebu raznih mineralno-vitaminskih suplemenata koji zbog načina pripreme često iziskuju oblike rastvorljive u vodi, a to se odnosi i na vitamine rastvorljive u uljima. Stoga, komponente ovih formula podležu drugačijoj asimilaciji i akumulaciji u organizmu, ali bi mogle da ispoljavaju i različito fiziološko delovanje u odnosu na prirodne forme.

Enzim peroksidaza (E.C.1.11.1.7) pripada klasi oksidoreduktaza. To je dvokomponentni enzim sa hemom vezanim za glikoproteinski deo molekula. Ovaj enzim igra značajnu ulogu u različitim fiziološkim procesima mikroorganizama, biljaka i životinja [1,2].

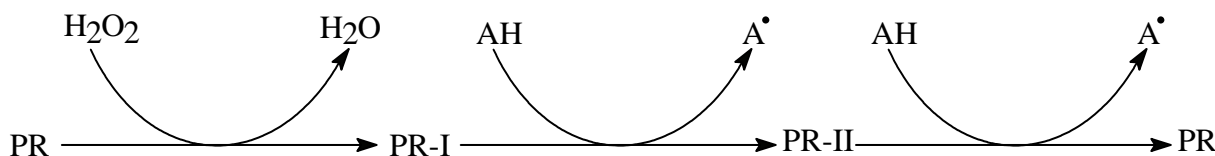
Peroksidaze određene biološke vrste, uglavnom, predstavljaju smešu izoenzima. Tako je iz rena izolovano više od 40 izoenzima peroksidaze o čijim se pojedinačnim aktivnostima nedovoljno zna [3], ali za većinu važi jedan generalni mehanizam katalitičke aktivnosti

[4], koji se može predstaviti na način kao što je dato na šemi 1.

Glavni supstrati i jedini molekuli koji direktno reaguju sa enzimom su peroksidi, i to obe forme – slobodna forma vodonik-peroksida i njegovi organski kompleksi i/ili soli.

O ulozi peroksidaze u ćeliji se govori prvenstveno u smislu regulisanja nivoa intracelularnog H₂O₂ kao mogućeg oksidativnog mutagena [5]. Peroksidaza zapravo transformiše peroksid u vodu i kiseonični radikal, koga u prisustvu kosupstrata – donora vodonika, prevodi u novi molekul vode. Tako, elektroni aktiviranog kiseonika bivaju prosleđeni dalje prema kosupstratnim molekulima, koji će ih donekle stabilizovati svojim rezonantnim strukturama, sprečavajući njihovo hemijsko delovanje na vitalne ćelijske funkcije.

Ulogu kosupstrata, akceptora elektrona, mogu imati razni fenoli, aromatični amini i njihove smeše [6], od



Šema 1. Generalni mehanizam katalitičke aktivnosti peroksidaze (PR). AH i A[•] predstavljaju redukovani, odnosno oksidovani oblik kosupstrata.

Scheme 1. General mechanism of peroxidase (PR) catalytic activity. AH and A[•] are reduced and oxidized form of cosubstrate, respectively.

Preписка: V. R. Đurić, Bore Stankovića 4, 19210 Bor, Srbija.

E-pošta: vladdjuric@gmail.com

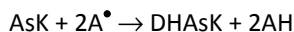
Rad primljen: 2. jun, 2012

Rad prihvaćen: 26. septembar, 2011

čije prirode i koncentracije zavisi relativna aktivnost i efikasnost peroksidaze [7,8]. U *in vitro* ogledima, rastući apsorpcioni maksimum oksidovane forme kosupstrata može se iskoristiti kao analitički signal za merenje katalitičke aktivnosti enzima.

U određenim uslovima ulogu kosupstrata može preuzeti i sam H_2O_2 , koji tako postaje i akceptor i donor elektrona u isto vreme, ali to za posledicu ima znatno smanjenje, pa čak i potpuni gubitak aktivnosti enzima [9]. Tako je utvrđeno da rastuća koncentracija peroksida, mereno na pH 6,3, može brzo da razori čitav molekul peroksidaze, formiranjem nestabilnog kompleksa, nastalog između dva molekula H_2O_2 i gvožđa u centru hema [10].

Sveprisutni antioksidanati mogu se uključiti posredno u „transfer“ elektrona sa peroksida na kosupstrat i tako uticati i na relativnu aktivnost peroksidaze. Tako vitamin C (L-askorbinska kiselina, AsK), inače odličan akceptor elektrona sa niskim standardnim redoks potencijalom, koji na pH 6,4 i 7 iznosi 0,08, odnosno 0,06 V [11], može i sam postati kosupstrat peroksidaze [12]. Međutim, njegov afinitet ka formiranju ternarnog kompleksa sa enzimom i supstratom, znatno je manji u odnosu na konkurentne kosupstrate iz grupe arilfenola i arilamina [6]. Stoga će najpre doći do oksidacije kosupstrata koji će se, kuplovanom neenzimskom reakcijom pomoću vitamina C, momentalno vratiti u svoj redukovani oblik, dok se sam vitamin oksiduje do dehidroaskorbinske kiseline (DHAsK) [13], imobilizujući elektrone peroksida:



Nakon što sav vitamin C bude preveden u svoj oksidovani oblik, ulogu akceptora preuzeće molekul-kosupstrat sa manje izvesnom sudbinom.

Radi standardizovanja metode kojom bi se ukupni antioksidantni kapacitet nekog uzorka izrazio kao ekvivalent aktivnosti peroksidaze u prisustvu odgovarajuće količine vitamina C, išlo se ka tome da se utvrdi da li postoji izvesna korelacija između ovog enzima, produkata njegove katalitičke aktivnosti i drugih vitamina koji poseduju antioksidantna svojstva, a takvi su vitamini E i A, odnosno njihovi estri, kako bi se metoda koristila za simultano određivanje ovih vitamina u određenim formulama. Pokazalo se da je njihov uticaj na aktivnost peroksidaze različit. Dok tokoferol-acetat, nema nikakvog uticaja na tok ove enzimske reakcije, čak i pri vrlo visokim koncentracijama primenjenog estera, dotle se retinol-acetat, ponaša kao nekompetitivni inhibitor peroksidaze rena sa merljivim efektom.

Kao i kod svake nekompetitivne inhibicije i u ovom slučaju se Mihaelisova konstanta, K_m , ne menja, ali dolazi do smanjenja maksimalne brzine reakcije, V_{max} [14]. Ovo se može manifestovati kao prividno smanjenje ukupne koncentracije enzima u reakcionoj smeši, pa i u ćeliji, što dalje može dovesti do nakupljanja peroksida i doprineti prouzrokovanju oksidativnog stresa [15].

EKSPERIMENTALNI DEO

U toku ovog istraživanja korišćeni su sledeći rastvori i aparatura.

Preparat peroksidaze rena čistoće 200 kU/g je bio Merck-ove (Nemačka) proizvodnje. Rastvori enzima, primenjivani u ogledu, bili su u koncentracijama od 5 do 20 U/l i pripremani su neposredno pre izvođenja ogleda, rastvaranjem odgovarajuće količine preparata u dejonizovanoj vodi.

Rastvori vodonik-peroksida (Merck, Nemačka) u koncentracijama od 0,1 do 1 mM, bili su pripremani od osnovnog rastvora (0,1 M) i kontrolisani standardnom permanganometrijskom metodom [16].

Kao kosupstrat čiji se apsorpcioni maksimum pratio kao mera relativne aktivnosti peroksidaze je upotrebljen *o*-tolidin (Centrohema, Beograd). Njegov apsorpcioni maksimum na primenjenim pH vrednostima je na 630 nm. Rastvori ovog kosupstrata pravljani su rastvaranjem 0,2 g *o*-tolidina u 1 ml 1% HCl, a zatim razblaživani do radnih koncentracija 0,005% [16].

Rastvori L-askorbinske kiseline (Galenika, Beograd) korišćeni u ovom ogledu su bili koncentracije 0,1 i 0,2 mM. Kako su vodeni rastvori vitamina C veoma nepostojani u prisustvu vazduha i na sobnoj temperaturi, bilo je potrebno izvršiti njihovu stabilizaciju. To je učinjeno dodatkom smeše CH_3COOH i EDTA u osnovne i radne rastvore, tako da su koncentracije stabilizirajućih komponenti uvek bile, 0,1 M za CH_3COOH , odnosno 0,5 mM za EDTA. Koncentracije osnovnih rastvora askorbinske kiseline, proveravane su standardnom volumetrijskom metodom sa 2,6-dihlorfenol-indofenolom [17].

Rastvori retinol-acetata (Alfa Aesar, Nemačka) čistoće 500.000 U/g, su pripremani u koncentracijama od 1 do 100 U/ml.

Kao medijumi u kojima se odigrava katalitička reakcija bili su upotrebljeni citratni puferski sistemi pH 5 i 6 (Farmitalia Carlo Erba).

Eksperimenti su izvođeni u staklenim kivetama, tako da su reakcionu smešu zapremine 1 ml činili sledeći rastvori: 0,5 ml odgovarajućeg pufera; 0,1 ml *o*-tolidina; 0,1 ml peroksidaze; 0,2 ml H_2O i/ili vitaminske miksture (askorbinska kiselina, retinol-acetat) i 0,1 ml H_2O_2 . Nakon termostiranja kivete na 25 °C tokom 1 min, relativna aktivnost peroksidaze je bila praćena spektrofotometrijski, merenjem zavisnosti apsorpcije oksidovane forme *o*-tolidina od vremena, na talasnoj dužini 630 nm, od momenta ubrizgavanja 0,1 ml H_2O_2 . U tu svrhu je bio korišćen spektrofotometar Beckman DU-65 (UK).

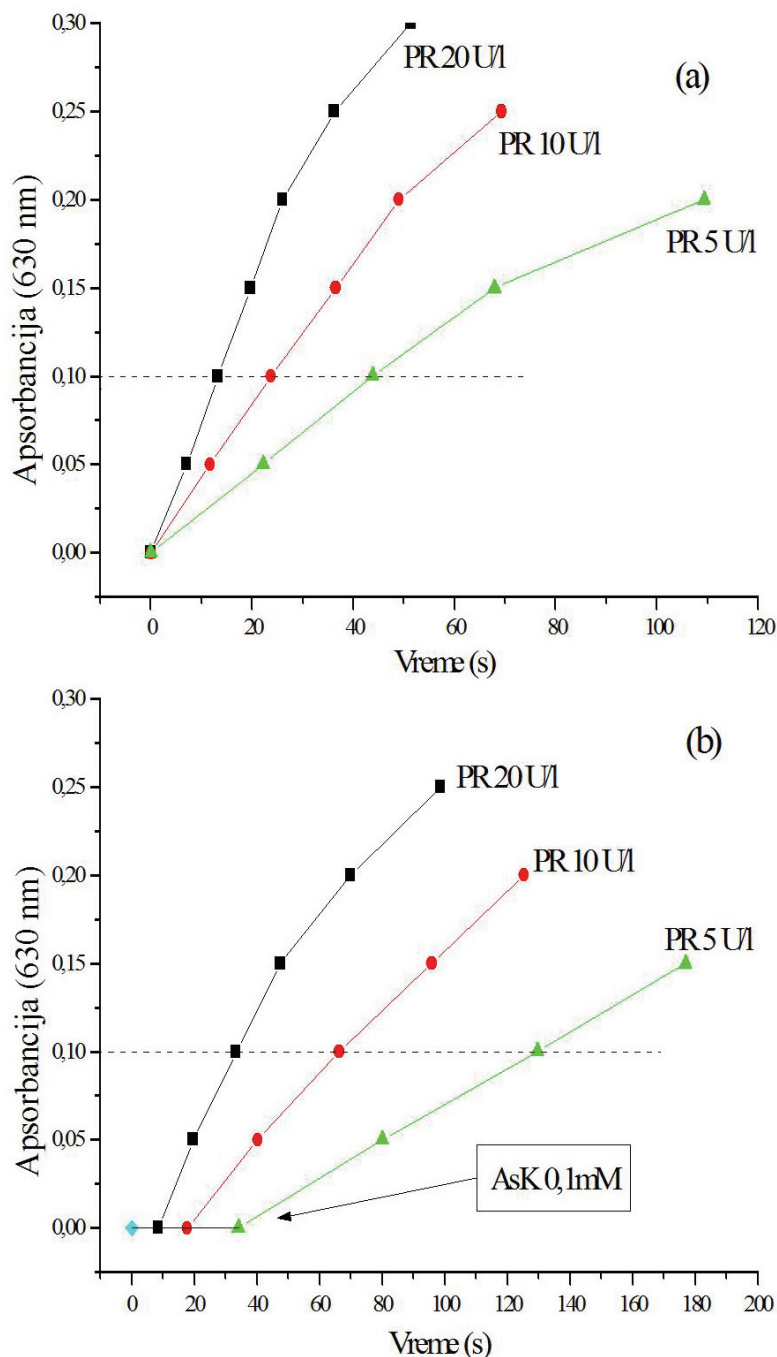
Svi pomenuti rastvori bili su spravljani svakodnevno, a kao rastvarač je upotrebljavana dejonizovana voda.

REZULTATI

U puferovanom vodenom medijumu u kome su prisutni peroksidaza, H_2O_2 i *o*-tolidin, katalitičko razlaganje peroksida i oksidacija supstrata se odvija veoma brzo. Početnu brzinu (v_0) ove reakcije možemo izraziti kao

promenu apsorbancije produkta, tj. oksidovanog kosupstrata, u promeni vremena $\Delta[Abs]/\Delta[t]$, odnosno ekstrapolacijom, kao $tg\alpha$, tj. nagib početnog dela krive.

Brzina formiranja oksidativne forme kosupstrata zavisi od koncentracija svih komponenti ternarnog kompleksa enzim–supstrat–kosupstrat. Tako, slika 1a poka-



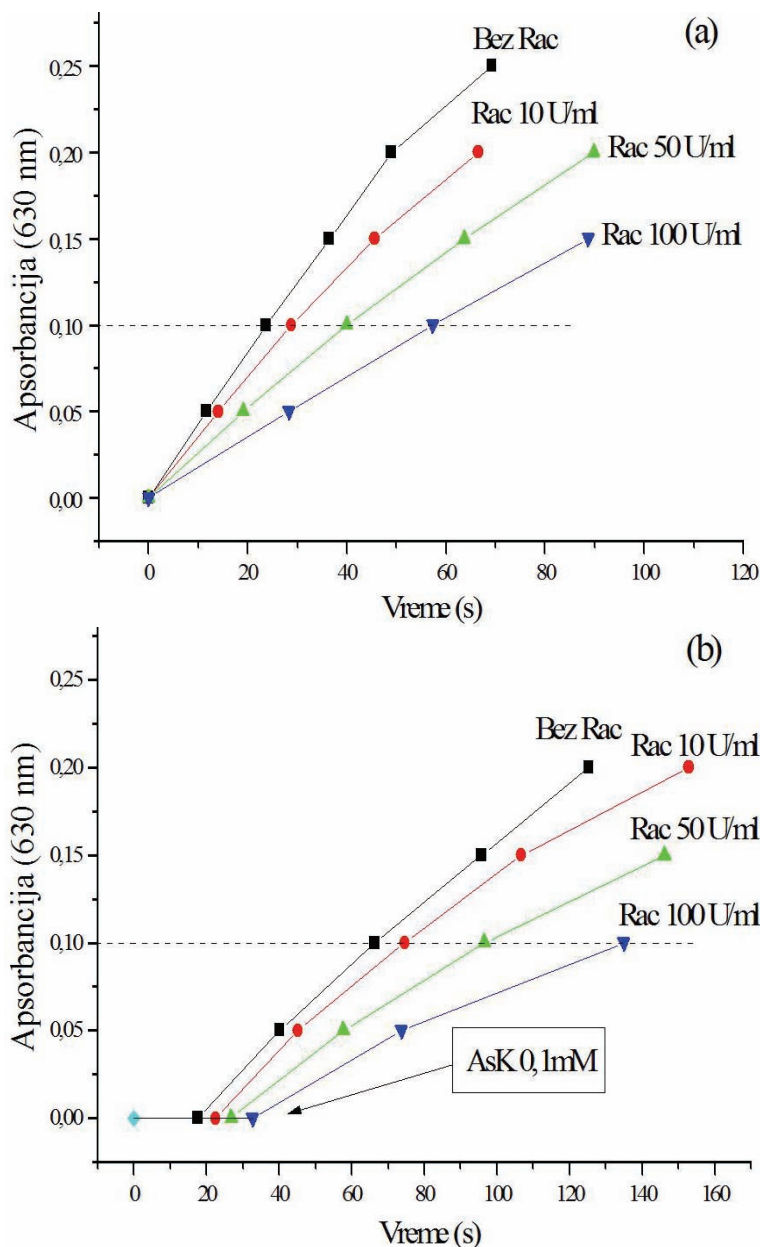
Slika 1. Uticaj koncentracije peroksidaze na brzinu formiranja oksidativne forme *o*-tolidina, bez (a) i u prisustvu (b) vitamina C. Koncentracije: H_2O_2 , 0,5 mM; *o*-tolidin, 0,005%; PR 5, 10 i 20 U/l. Relativne početne brzine bez prisutne AsK, iznose: 0,0023; 0,0042 i 0,0075. U prisustvu AsK (0,1 mM), odgovarajuće relativne brzine (zanemarujući indukcionu period) iznose: 0,001; 0,002 i 0,004. Figure 1. The effect of peroxidase concentration on rate of forming *o*-tolidine oxidative form, without (a) and with (b) vitamin C present. Concentrations: H_2O_2 , 0.5 mM; *o*-tolidine, 0.005%; PR 5, 10 and 20 U/l. Relative initial rate, without AsK present, was: 0.0023; 0.0042 and 0.0075, respectively. In the presence of AsK (0.1 mM) corresponding relative rate (excluding lag time) was: 0.001; 0.002 and 0.004, respectively.

zuje zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije enzima. Ta zavisnost je u uslovima odvijanja oglada, očekivano, direktno proporcionalna [13].

Kao što je pomenuto, u prisustvu antioksidanta AsK, istovremeno sa enzimskom oksidacijom, teče neenzimska redukcija oksidativnog oblika kosupstrata *o*-tolidina, dok sam vitamin biva oksidovan do slabog oksidanta, DHAsK. Ovo se u ogledu manifestovalo odlaganjem razvoja absorpcionog maksimuma oksidovanog *o*-

tolidina, očekivanog na 630 nm, dok god u reakcionoj smeši ima dovoljno molekula AsK (slika 1b). Dužina tog indukcionog perioda direktno zavisi od prisutne količine AsK, pa se ova enzimaska reakcija može koristiti za kvantitativno određivanje vitamina C u vodenom rastvoru [13,18].

Retinol-acetat je estar vitamina A rastvorljiv u vodi, a njegovo uključivanje u reakcionu smešu smanjuje početnu brzinu reakcije (slika 2), što se ogleda kroz opadanje koeficijenta pravih.



Slika 2. Uticaj koncentracije retinol-acetata na brzinu formiranja oksidativne forme *o*-tolidina, bez (a) i u prisustvu (b) vitamina C. Koncentracije: H_2O_2 , 0,5 mM; *o*-tolidin, 0,005%; PR 10 U/l; retinol-acetat (Rac) 10, 50 i 100 U/ml. Relativne početne brzine bez prisutne AsK iznose: 0,0042; 0,0035; 0,0025 i 0,0017, dok u prisustvu AsK (0,1 mM), one iznose: 0,002; 0,0019; 0,0014 i 0,0009. Figure 2. The effect of retinol acetate concentration on rate of forming *o*-tolidine oxidative form, without (a) and with (b) vitamin C present. Concentrations: H_2O_2 , 0.5 mM; *o*-tolidine, 0.005%; PR 10 U/l; retinol acetate (Rac) 10, 50 and 100 U/ml. Relative initial rate, without AsK present, was: 0.0042; 0.0035; 0.0025 and 0.0017 respectively, while in the presence of AsK (0.1 mM) it was: 0.002; 0.0019; 0.0014 and 0.0009, respectively.

To smanjenje relativne početne brzine je direktno proporcionalno upotrebljenoj količini retinol-acetata (slika 3).

Na osnovu ovih rezultata utvrđeno je da retinol-acetat vrši inhibiciju peroksidaze rena. Linearizacijom po Lineweaver-Burku, pokazalo se da je u pitanju nekompetitivna inhibicija, jer prave zavisnosti relativne početne brzine od koncentracije peroksida (slika 4) teže da se seku u jednoj tački. Presek tih pravih sa apscisom omogućava određivanje Mihaelisove konstante K_m , kao i drugih kinetičkih parametara, kakva je konstanta inhibicije K_i .

Dakle, u nepromenjenim uslovima gde se održavaju konstantnim koncentracije PR (10 U/l), *o*-tolidina (0,005%), kao i koncentracija vitamina C (0,1 mM), a variraju koncentracije H_2O_2 (0,1–1 mM) i retinol-acetata (10–100 U/ml), K_m iznosi $1,3 \pm 0,1$ mM. U preuređenom obliku ovog dijagrama, gde se na apscisi nalaze vrednosti za koncentraciju inhibitora, kao prema Diksonu, utvrđeno je da konstanta inhibicije iznosi $98,5 \pm 5$ U/ml.

DISKUSIJA

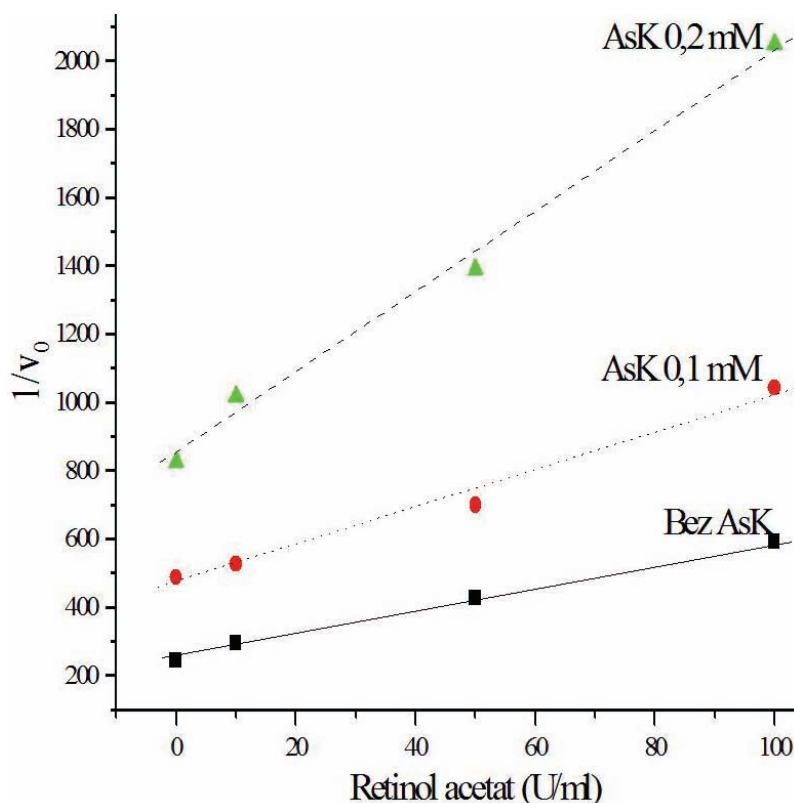
Retinol-acetat je česta forma vitamina A, zastupljena u suplementima u ishrani, multivitaminskih ins-

tant napitaka, kao i kod kozmetičkih sredstava za zaštitu kože. Molekuli vitamina A su u stanju da se ugrade u fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane, što dovodi do povećanja permeabilnosti ćelijske membrane [19], a da primena koncentracija većih od fizioloških ($>70 \mu M$) može izazvati lizu ćelije, naticanje mitohondija kao i hemolizu eritrocita [20].

Sa nekim proteinima, kakvi su serumski albumin, β -laktoglobulin i protein humane plazme koji vezuje retinol on gradi komplekse rastvorljive u vodi [21]. Isto tako je poznato, da *in vitro* značajno inhibira aromatazu odgovornu za rast tumora u koncentracijama iznad $>0,2 \mu M$. Ta inhibicija pripada mešovitom tipu, te retinol smanjuje i V_{max} i K_m ovog enzima [22].

Inhibicija peroksidaze je važna kod nekih detekcionih metoda gde je peroksidazna aktivnost nepoželjna, a posebno je značajna potpuna inaktivacija peroksidaze u ko-lokalizacionim testovima i sekvencijalnim višeciljnim analitičkim metodama. Najčešće korišćeni inhibitori peroksidaze su NaN_3 i upravo njen glavni kosupstrat, vodonik-peroksid [3].

Peroksidaza i L-askorbinska kiseline su veoma osetljivi na prisustvo mnogih metalnih jona koji doprinose autooksidaciji vitamina C i skraćivanju indukcionog perioda. Posebno se to odnosi na soli žive, koje ispoljavaju i inhibitorni efekat na peroksidazu [13]. Sa druge strane



Slika 3. Zavisnost relativne početne brzine reakcije od koncentracije retinol-acetata, bez i u prisustvu vitamina C, uz konstantnu koncentraciju H_2O_2 (0,5 mM).

Figure 3. Dependence of relative initial reaction rate on retinol acetate concentration, without and with vitamin C present, and with constant concentration of H_2O_2 (0.5 mM).

joni Fe^{3+} stimulišu aktivnost peroksidaze [8], dok se joni zemnoalkalnih metala i salicilati pri nižim koncentracijama ponašaju kao umereni aktivatori [23].

EDTA pri nižim koncentracijama ne utiče na aktivnost peroksidaze, dok drugi helirajući agensi mogu umanjiti relativnu aktivnost ovog enzima [3].

Uticaj fenola i njihovih derivata koji stupaju u reakciju sa peroksidazom može biti različit i zavisi od odnosa njihovog redoks-potencijala prema potencijalu kosupstrata-indikatora. Tako, jedinjenja sa višim vrednostima redoks-potencijala inhibiraju katalitičku aktivnost peroksidaze iz kikirikija, dok ona sa nižim potencijalom preuzimaju ulogu primarnog kosupstrata, što se manifestuje pojavom indukcionog perioda u odnosu na signal indikatora [6].

Indol-sirćetna kiselina iz grupe biljnih hormona auksina, koja takođe pripada kosupstratima peroksidaze, može se oksidovati i u prisustvu i u odsustvu vodonik-peroksida. Uključivanjem L-askorbinske kiseline u reakciju, ona se može ponašati i kao kompetitivni i kao nekompetitivni inhibitor u zavisnosti od relativnog odnosa koncentracija enzima i vitamina C. Pri koncentracijama L-askorbinske kiseline kada je samo jedan njen molekul vezan za aktivno mesto enzima, indol-sirćetna kiselina se ponaša kao kompetitivni inhibitor konkurišući za isto

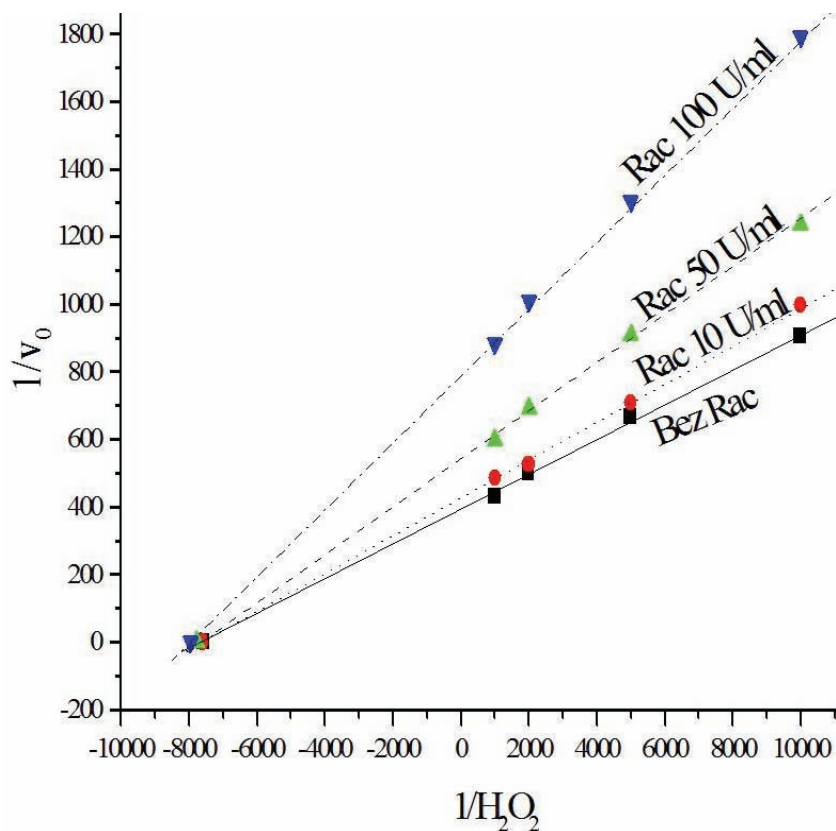
mesto na enzimu, ali kada je aktivno mesto zasićeno sa dva molekula vitamina C ona se vezuje za neko drugo područje na enzimu narušavajući interakciju između aktivnog mesta i supstrata i tada se ponaša kao nekompetitivni inhibitor [12].

Smatramo da inhibicija peroksidaze retinol-acetatom pripada nekompetitivnom tipu jer smanjuje početnu brzinu katalitičke reakcije, što se ogleda u smanjenju promene apsorbancije (ΔA) u odnosu na isti period (Δt), bez prisustva retinola, dok Mihaelisova konstanta ostaje nepromenjena. Takođe, povećanje koncentracije retinol-acetata, direktno povećava indukcionu period izazvan vitaminom C.

Uzorak sirovinke komponente za izradu tzv. šumehih tableta i instant napitaka u prahu, retinol-acetata na nosaču (Galenika, Beograd), deklarativnog iznosa 524519 U/g, analiziran je predstavljenom metodom, a dobijeni rezultat je odstupao za +6,3% i iznosio je 557500 U/g.

ZAKLJUČAK

Peroksidaza prvenstveno učestvuje u regulisanju nivoa endogenog vodonik-peroksida. Njena inhibicija, izazvana eventualno nekontrolisanom upotrebom diz-



Slika 4. Zavisnost relativne početne brzine od koncentracije supstrata (peroksida) bez i u prisustvu retinol-acetata (Rac) i uz konstantnu koncentraciju vitamina C (0,1 mM).

Figure 4. Dependence of relative initial reaction rate on substrate (peroxide) concentration, without and with retinol acetate (Rac) present, and with constant concentration of vitamin C (0.1 mM).

balansiranih suplemenata, može zbog povećanja nivoa peroksida doprineti narušavanju homeostaze ćelije, dodatno opteretiti enzim peroksidazu i potencijalno uvesti ćeliju u oksidativni stres.

S obzirom na postojanje direktno proporcionalne zavisnosti relativne početne brzine enzimske reakcije i indukcionog perioda od upotrebene količine retinol-acetata, ovaj enzimski postupak se može koristiti za određivanje retinol-acetata sa i bez prisutne L-askorbinske kiseline u uzorku.

Zahvalnica

Istraživanja prikazana u ovom radu podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekta 172051.

LITERATURA

- [1] B. Wen, D.J. Moore, Bioactivation of glafenine by human liver microsomes and peroxidases: Identification of electrophilic iminoquinone species and glutathione conjugates, *Drug Metab. Dispos.* **39** (2011) 1511–1521.
- [2] I. Riikka, V. Loimaranta, J. Tenovu, Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva, *Arch. Biochem. Biophys.* **445** (2006) 261–268.
- [3] R. Krieg, K.J. Halbhuber, Detection of endogenous and immuno-bound peroxidase — The status quo in histochemistry, *Prog. Histochem. Cytochem.* **45** (2010) 81–139.
- [4] R.Q. Thompson, Peroxidase-based colorimetric determination of L-ascorbic acid, *Anal. Chem.* **59** (1987) 1119–1121.
- [5] N.C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochem.* **65** (2004) 249–259.
- [6] N.A. Bagirova, T.N. Shekhovtsova, R.B. van Huystee, Enzymatic determination of phenols using peanut peroxidase, *Talanta* **55** (2001) 1151–1164.
- [7] M. Stiborova, M. Miksanova, V. Martinek, Heme peroxidases: Structure, function, mechanism and involvement inactivation of carcinogens, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65** (2000) 297–323.
- [8] S.A. Mohamed, K.O. Abulnaja, A.S. Ads, J.A. Khan, T.A. Kumosani, Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady, *Food Chem.* **128** (2011) 725–730.
- [9] J. Hernandez-Ruiz, M.B. Arnao, A.N.P. Hiner, F. Garsia-Canovas, M. Acosta, Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂, *Biochem. J.* **345** (2001) 107–114.
- [10] A. Scheeline, D.L. Olson, E.P. Williksen, G.A. Horras, The peroxidase-oxidase oscillator and its constituent chemistries, *Chem. Rev.* **97** (1997) 739–756.
- [11] T.N. Shekhovtsova, S.V. Muginova, J.A. Luchinina, A.Z. Galimova, Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid, *Anal. Chim. Acta* **573–574** (2006) 125–132.
- [12] V.V. Rogozin, T.V. Rogozina, The role of indole-3-acetic acid in peroxidase oxidation of ascorbic acid catalyzed by horseradish peroxidase, *Biol. Bull.* **31** (2004) 342–345.
- [13] R.H. White-Stevens, Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron and mercury, *Clin. Chem.* **28** (1982) 578–588.
- [14] Đ.N. Petrović, Osnovi enzimologije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1998, str. 168–174.
- [15] R. Mittler, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.* **7** (2002) 405–410.
- [16] V. Vajgand, *Analitika, Rad*, Beograd, 1986, p. 37.
- [17] Official Methods of Analysis of AOAC International, (1995) Chapter 45, Method 80, 16th ed.
- [18] M.B. Arnao, A. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta, Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods, *Anal. Biochem.* **236** (1996) 255–261.
- [19] A.N. Nagapa, P.L. Kole, P.V. Pandi, K. Zeeyauddin, R.T. Patil, I. Shanmukha, Transport across liquid membranes containing vitamin A (retinol acetate), *J. Colloid Interface Sci.* **271** (2004) 416–418.
- [20] J. Hamzaha, T.M.E. Davisa, T.S. Skinner-Adamsa, J. Beilbyb, Characterization of the effect of retinol on *Plasmodium falciparum* in vitro, *Exp. Parasitol.* **107** (2004) 136–144.
- [21] S. Futterman, J. Heller, The enhancement of fluorescence and decreased susceptibility to enzymatic oxidation if retinol complexed with bovine serum albumin, β -lactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 5168–5179.
- [22] H.P. Ciolino, Z. Dai, V. Neir, Retinol inhibits aromatase activity and expression in vitro, *J. Nutr. Biochem.* **22** (2011) 522–526.
- [23] V.P. Pandey, U.N. Dwivedi, Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **68** (2011) 168–173.

SUMMARY**INHIBITORY EFFECT OF RETINOL ACETATE ON HORSERADISH PEROXIDASE**Vladan R. Đurić¹, Nebojša R. Deletić¹, Vesna P. Stankov-Jovanović², Ranko M. Simonović³¹*University of Priština, Faculty of Agriculture Lešak, Serbia*²*University of Niš, Faculty of Science, Niš, Serbia*³*University of Priština, Faculty of Science Kosovska Mitrovica, Kosovska Mitrovica, Serbia*

(Scientific paper)

The primary role of the peroxidase enzyme is to decompose endogenous hydrogen peroxide, when an oxygen radical is being replaced by a less potent radical, which is its cosubstrate oxidized form. During this study, catalytic activity of horseradish peroxidase has been observed in the presence of antioxidants from vitamin group, such as C, E and A, *i.e.*, their water-soluble forms. It was found that vitamin E showed no effect on the enzyme activity and fate of cosubstrate radicals from the group of benzidine derivatives. Vitamin C proceeds enzymatic reaction showing its antioxidative character, and absorbs electrons from radicals, bringing the cosubstrate back to its relaxed state. On the other hand, vitamin A plays the role of a noncompetitive peroxidase inhibitor, which can be observed by decreasing initial rate of catalytic reaction, and is reflected as virtual decrease of enzyme concentration. Furthermore, it prolongs the life of endogenous hydrogen peroxide, which could potentially lead to oxidative stress of cells. This inhibitory effect can be used in analytical purpose, for determination of retinol acetate content in a sample.

Keywords: Peroxidase • Retinol • Ascorbic acid • Noncompetitive inhibition • Oxidative stress