



ISSN 577.152.1.042

## ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ 3,3',5,5'-ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА 2-АМИНО-4-НИТРОФЕНОЛОМ И ЕГО ПОЛИДИСУЛЬФИДОМ

© 1999 г. Е. И. Карасева, Т. В. Никифорова, Ю. П. Лосев\*, Д. И. Метелица#

*Институт биоорганической химии НАН Белоруссии,  
220141, Минск, ул. Купревича, 5/2;**\* Белорусский государственный университет, химический факультет,  
220080, Минск, ул. Ленинградская, 14*

Поступила в редакцию 18.08.98 г. Принята к печати 13.04.99 г.

Проведено сравнительное кинетическое изучение ингибирования пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина (ТМБ) 2-амино-4-нитрофенолом (АНФ) и его полимерным производным – поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенолом) (poly(ADSNP)), молекула которого содержала 6–7 мономерных звеньев. Оба ингибитора действуют по конкурентному механизму и характеризуются константами ингибирования  $K_i$ , равными 160 и 18 мкМ, соответственно. Полимерный ингибитор намного эффективнее в процессе пероксидазного окисления ТМБ, чем его мономерный аналог, и имеет стехиометрический коэффициент ингибирования  $f$ , в 8.4 раза превышающий его величину для АНФ. Обсуждена схема сопряженного пероксидазного окисления пар “ароматический амин (субстрат) – фенол (ингибитор)” и основные предпосылки при подборе ингибиторов пероксидазного окисления ароматических субстратов.

*Ключевые слова:* пероксидаза; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ингибирование; 2-амино-4-нитрофенол; поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенол); сопряженное окисление, константы ингибирования.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возросло число публикаций, посвященных разнообразным реакциям пероксидаз и механизму их действия [1–4]. В большой степени это связано с широким применением пероксидазы хрена (далее – пероксидаза, ПХ) в иммуноферментном анализе [5–7], что обусловило рост промышленного производства пероксидаз и получение рекомбинантных ферментов [3]. Несмотря на громадное число исследований пероксидаз из разных природных источников, до сих пор остаются нерешенными некоторые важные проблемы пероксидазного катализа. Одна из них – относительно невысокая операционная стабильность пероксидаз, обусловленная их инактивацией в ходе ферментативного процесса, так как пероксидазы, как и многие другие ферменты, функционирующие в присутствии пероксида водорода (цитохромы Р-450, глюкозооксидазы, ка-

талазы), являются самоинактивирующимися биокатализаторами [2]. Мы считаем, что главными деструктурирующими агентами в присутствии  $H_2O_2$  являются свободные радикалы  $HO^\bullet$  и  $HO_2^\bullet$ , которые, к сожалению, образуются при гомолитическом распаде пероксидных комплексов пероксидаз и каталаз наряду с гетеролитическими превращениями этих комплексов, ведущими к образованию известных Соединений (I) и (II) – активных действующих частиц в пероксидазных и каталазных процессах [2, 8].

Повысить операционную устойчивость пероксидаз и каталаз можно было бы с помощью эффективных ингибиторов (InH), которые акцептируют активные свободные радикалы. Хорошо известно, что такими ингибиторами (антиоксидантами) являются многие ароматические амины и фенолы [9, 10], однако они же одновременно наиболее часто используются как восстанавливающие субстраты пероксидаз.

Стабилизация пероксидаз антиоксидантами ароматического ряда тесно связана с другой важной проблемой пероксидазного катализа – направленным ингибированием пероксидаз. Все известные ингибиторы пероксидаз можно разделить на две большие группы: к первой относятся анионы  $F^-$  [11],  $CN^-$  [12] и  $N_3^-$  [13], которые могут

Сокращения: АНФ – 2-амино-4-нитрофенол; ГА – галловая кислота; poly(ADSNP) – поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенол); poly(DSGA) – поли(дисульфид галловой кислоты); ПХ – пероксидаза хрена; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФБ – 0.01 М фосфатный буфер, рН 6.4; PDA – орто-фенилендиамин;  $f$  – стехиометрический коэффициент ингибирования; InH – ингибитор радикальных реакций.

# Автор для переписки (факс: (0172) 63-72-74; e-mail: enzyme@ns.iboch.ac.by).

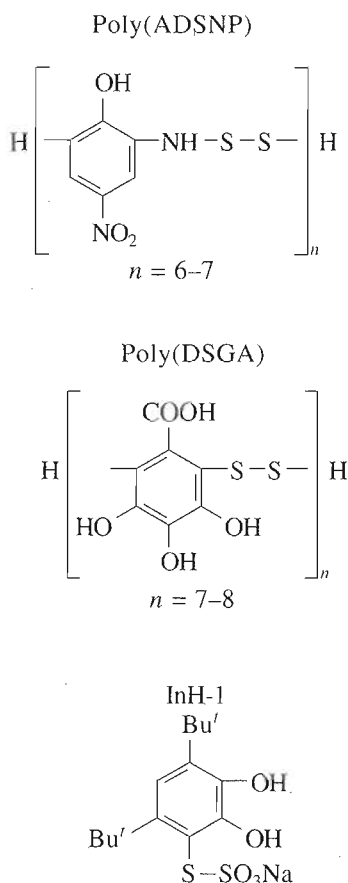


Рис. 1. Структурные формулы ингибиторов.

быть лигандами гемового железа и которые активно конкурируют с  $H_2O_2$  (окисляющим субстратом пероксидазы) за связывание с ним; ко второй группе относятся многочисленные ароматические соединения, которые могут быть потенциальными конкурентами восстанавливающих субстратов пероксидазы [14–16]. С точки зрения операционной стабилизации пероксидазы идеальным ингибитором был бы антиоксидант, полностью подавляющий побочное образование свободных кислородсодержащих радикалов, но никак не конкурирующий с окисляющим и восстанавливающим субстратами фермента. При подборе ингибиторов пероксидазных реакций очень важен также практический аспект, связанный с возможностью остановки реакции при использовании пероксидазы в качестве фермента-маркера в иммуоферментном анализе, что совершенно необходимо при проведении массовых и автоматизированных аналитических определений вирусов, лекарств, гормонов, наркотиков и многих других объектов [5–7, 16].

К ингибированию пероксидазных процессов можно применить теорию метода ингибиторов, разработанную Н.М. Эмануэлем и его учениками для жидкофазных цепных радикальных реакций

[17, 18]. В соответствии с этой теорией при постоянной скорости инициирования радикалов  $v_i$  и линейном обрыве цепей на ингибиторе продолжительность периода индукции определяется уравнением (1) при условии  $[InH] = 0$ :

$$\Delta\tau = f[InH]_0/v_i, \quad (1)$$

где  $f$  – стехиометрический коэффициент ингибитора, означающий число радикалов, гибнущих на одной его молекуле. По уравнению (1) можно оценить скорость инициирования радикалов с точностью до коэффициента  $1/f$ .

При стационарном режиме окисления субстрата начальная скорость реакции близка к скорости инициирования радикалов:

$$v_0 \approx v_i = f(v_i/f). \quad (2)$$

Определив по уравнению (1) величину  $(v_i/f)$ , из соотношения (2) легко получить значение стехиометрического коэффициента  $f$ , измерив  $v_0$ . Чем выше величина  $f$ , тем эффективнее действие антиоксиданта в конкретных условиях радикального процесса. Чаще всего ингибиторы радикальных реакций характеризуются величинами  $f \approx 2$  [9, 10, 17, 18]. Однако недавно нами показано, что при пероксидазном окислении 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) необычно высокую эффективность в ингибировании реакции обнаружил поли(дисульфид галловой кислоты) (poly(DSGA)), стехиометрический коэффициент которого оказался равным 17.8 [19]. Эффективность ингибирующего действия poly(DSGA) в пероксидазном окислении ТМБ еще более возросла при проведении ферментативного процесса в среде обращенных мицелл аэрозоля ОТ в гептане [20]. Все преимущества poly(DSGA) как ингибитора радикальных реакций связаны с его полимерной природой: этот ингибитор содержит 7–8 мономерных звеньев, каждое из которых характеризуется относительно высокой антирадикальной активностью [19, 20]. Poly(DSGA) (рис. 1) оказался также высокоэффективным ингибитором супероксиддисмутазы (СОД), субстрат которой  $O_2^{\cdot-}$  является анион-радикалом [21]. В связи с вышеизложенным необходимо было продолжить исследование других дисульфидных ингибиторов полимерной природы.

Цель настоящей работы – сравнительное кинетическое исследование ингибирующих свойств поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенола) (poly(ADSNP)) и аналога его мономерного звена 2-амино-4-нитрофенола (АНП) в пероксидазном окислении ТМБ в буферной среде и определение характера и констант ингибирования  $K_i$ , а также стехиометрических коэффициентов ингибирования  $f$  для обоих антиоксидантов в этой пероксидазной реакции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование пероксидазного окисления ТМВ  
2-амино-4-нитрофенолом

Субстрат пероксидазы ТМВ ограниченно растворим в буферных растворах [6]; растворимость полимерного ингибитора  $\text{poly(ADSNP)}$  в водной среде также невелика. По этой причине в качестве реакционной среды использовали 0.01 М фосфатный буфер, рН 6.4 (ФБ), содержащий 10% DMF (буфер А). Органический соразворитель в такой концентрации обеспечивает полную гомогенность реакционной смеси, однако оказывает инактивирующее влияние на пероксидазу хрена; при этом наблюдается снижение величины  $k_{\text{cat}}$  при сохранении значения  $K_m$  (показано при пероксидазном окислении *o*-фенилендиамина [22]). В стандартных условиях пероксидазного окисления ТМВ (20°C, буфер А, 1 нМ ПХ, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) изучены зависимости начальной скорости окисления субстрата от его начальной концентрации (при  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  1 мМ) и от начальной концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  (при  $[\text{TMB}]$  0.5 мМ). В обоих случаях зависимости описываются уравнением Михаэлиса-Ментен, линеаризация которого в координатах Лайнуивера-Берка позволила вычислить кинетические параметры окисления ТМВ:  $k_{\text{cat}}$  1050  $\text{с}^{-1}$ ,  $K_m$  0.13 мМ (по ТМВ) и  $k_{\text{cat}}$  910  $\text{с}^{-1}$ ,  $K_m$  0.09 мМ (по  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Все последующие кинетические эксперименты проведены в той же среде как при использовании антиоксидантов, так и в их отсутствие.

На рис. 2 показаны зависимости начальной скорости пероксидазного окисления ТМВ от концентрации ANP в среде. Видно, что при малых концентрациях (до  $1.5 \times 10^{-5}$  М, кривая 1) ANP незначительно активирует окисление ТМВ, однако при дальнейшем увеличении его содержания скорость превращения ТМВ снижается, приближаясь к нулю при  $[\text{ANP}] > 8 \times 10^{-4}$  М, что превышает начальную концентрацию субстрата ( $5 \times 10^{-4}$  М). Таким образом, ANP при концентрациях, сопоставимых с содержанием ТМВ и даже много меньших, существенно тормозит накопление продукта окисления ТМВ. Что касается некоторой активации окисления ТМВ при малых концентрациях ANP, то это явление характерно для сопряженного пероксидазного окисления многих пар "амины-фенолы" [19, 23–26] и наблюдалось в реакциях окисления пар: алюминол-галоидзамещенные фенолы [23, 25, 26], 4-аминоантипирин-фенолы [24], PDA-poly(DSGA) [19], PDA-галловая кислота и в других случаях. Причины этого интересного явления будут рассмотрены при обсуждении результатов.

На кинетических кривых роста оптического поглощения продукта пероксидазного окисления ТМВ (рис. 3а) четко проявляется период индукции ( $\Delta t$ ) в трансформации ТМВ, продолжительность которого возрастает с увеличением содер-

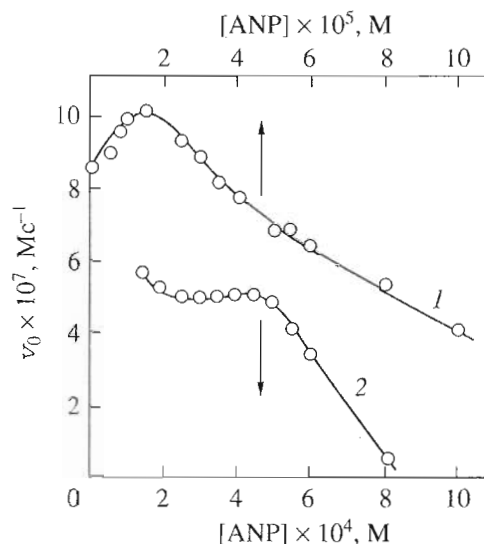


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления 0.5 мМ ТМВ в буфере А от концентрации ANP до 0.1 мМ (1) и выше 0.1 мМ (2). Условия: 20°C, 1 нМ ПХ, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

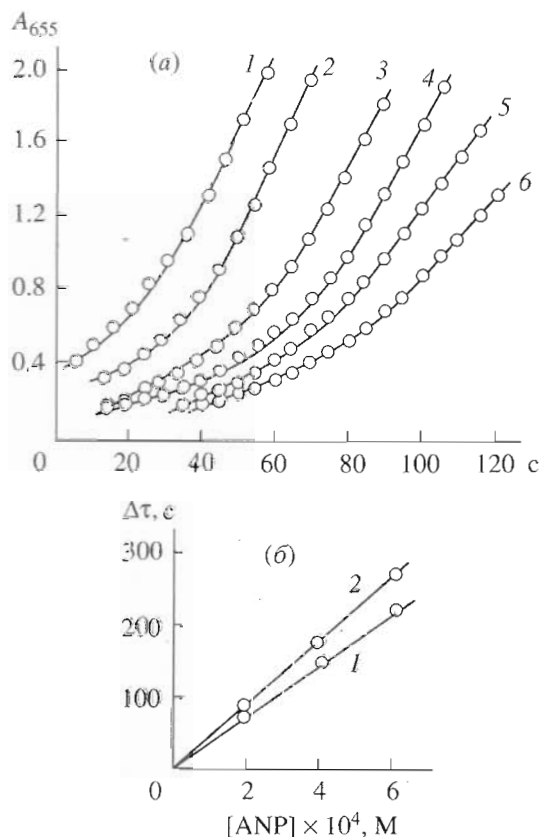


Рис. 3. Кинетические кривые образования продукта пероксидазного окисления ТМВ (а) и зависимости периода индукции  $\Delta t$  от концентрации ANP (б). Условия: буфер А, 20°C, 1 нМ ПХ, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а, б);  $[\text{TMB}]$  – 0.5 мМ,  $[\text{ANP}]$  – 0.15 (1), 0.20 (2), 0.30 (3), 0.40 (4), 0.45 (5) и 0.50 мМ (6) (а);  $[\text{TMB}]$  0.15 (1) и 0.06 мМ (2) (б).

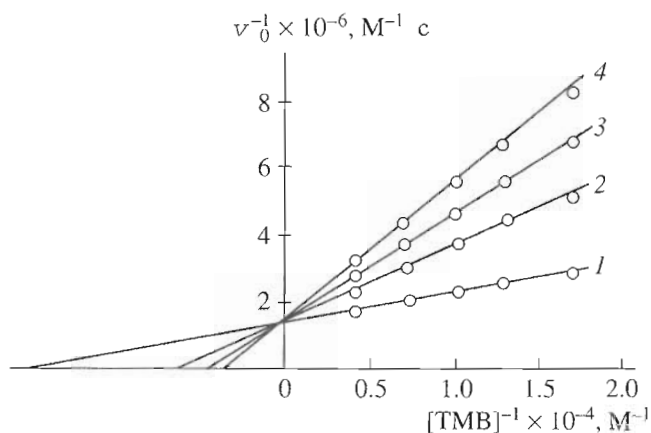


Рис. 4. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления ТМВ от концентрации субстрата в двойных обратных координатах. Условия: 20°C, 1 нМ ПХ, 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, [ANP] – 0 (1), 0,2 (2), 0,4 (3) и 0,6 мМ (4).

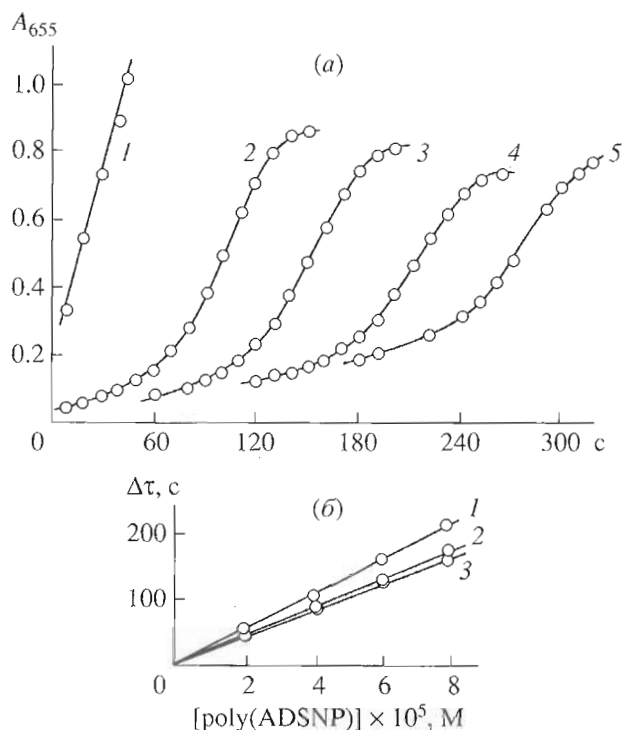


Рис. 5. Кинетические кривые образования продукта пероксидазного окисления ТМВ (а) и зависимости периода индукции ( $\Delta t$ ) от концентрации poly(ADSNP) (б). Условия: буфер А, 20°C, 1 нМ ПХ, 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (а, б), [ТМВ] 1 мМ, [ANP] – 0 (1), 0,02 (2), 0,04 (3), 0,06 (4) и 0,08 мМ (5) (а); [ТМВ] – 0,1 (1), 0,2 (2) и 0,3 мМ (3) (б).

нами оценен стехиометрический коэффициент  $f$  для ANP в процессе пероксидазного окисления ТМВ, который составил  $\sim 0.162$ , т.е. только каждый шестой радикал субстрата реагирует с молекулой ANP. Для характеристики типа ингибирования изучены зависимости начальной скорости окисления ТМВ от его концентрации при возрастающих концентрациях ингибитора ANP: линейные анаморфозы этих зависимостей в координатах Лайнуивера–Берка [27] показали, что ANP действует по механизму конкурентного ингибирования (рис. 4) с  $K_i = 1.6 \times 10^{-4}$  М, т.е. ANP характеризуется относительно невысокой эффективностью ингибирующего действия в пероксидажном окислении ТМВ.

#### Ингибирование пероксидазного окисления ТМВ поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенолом)

Скорость накопления продукта пероксидазного окисления ТМВ сильно снижается в присутствии poly(ADSNP). На рис. 5а показаны кинетические кривые роста оптического поглощения продукта трансформации ТМВ при растущих концентрациях полимерного ингибитора в среде: период индукции в накоплении продукта реакции сильно возрастает с увеличением концентрации ингибитора. Между величиной  $\Delta t$  и концентрацией poly(ADSNP) обнаруживается линейная зависимость (рис. 5б). Используя величину  $v_0$  окисления ТМВ без полимерного ингибитора и данные рис. 5б, мы оценили стехиометрический коэффициент ингибирования для poly(ADSNP), который в среднем равняется  $\sim 1.34$ , т.е. с одной молекулой полимерного ингибитора в пероксидажном процессе взаимодействуют 1–2 радикала субстрата. Из зависимостей Лайнуивера–Берка для пероксидажного окисления ТМВ в присутствии различных концентраций poly(ADSNP) (рис. 6) следует конкурентный характер ингибирования процесса полимерным антиоксидантом с константой ингибирования  $K_i 1.8 \times 10^{-5}$  М, т.е. полимерный антиоксидант на порядок эффективнее, чем его мономерный аналог ANP.

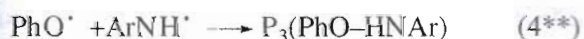
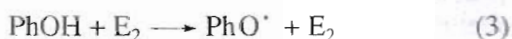
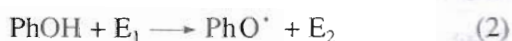
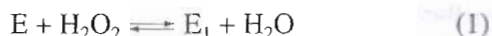
Сравнительные данные по эффективности различных ингибиторов в пероксидажных реакциях окисления нескольких субстратов (DA, PDA и ТМВ) представлены в таблице. Видно, что наиболее эффективный ингибитор – поли(дисульфид галловой кислоты) (poly(DSGA)), характеризующийся минимальным значением  $K_i$  (1,3 мкМ) и максимальной величиной  $f$  (17,8). Другой полимерный ингибитор poly(ADSNP) менее эффективен, так как для него величина  $K_i$  в 13,8 раза выше, а величина  $f$  в 13,3 раза ниже, чем соответствующие значения для poly(DSGA). Примерно такие же соотношения констант наблюдаются для мономерных аналогов – галловой кислоты и ANP (таблица). Примечательно, что возрастаю-

жания ANP. В соответствии с теорией метода ингибиторов радикальных реакций [17, 18] между продолжительностью периода индукции  $\Delta t$  и концентрацией ANP наблюдается линейная зависимость (рис. 3б). Используя значение  $v_0$  для окисления ТМВ в отсутствие ANP и данные рис. 3б,

шим значениям  $K_i$  для указанных четырех ингибиторов соответствуют уменьшающиеся величины  $f$  (таблица).

Отметим, что при пероксидазном окислении структурного аналога ТМВ – *o*-дианизидина – анионы  $N_3^-$ ,  $HO^-$  и  $F^-$  (потенциальные конкуренты  $H_2O_2$  за связывание с гемовым железом) сильно уступают по эффективности ингибирующего действия ароматическим фенолам – GA, poly(DSGA), ANP и poly(ADSNP) и в меньшей степени InH-1.

Для объяснения ингибирующего действия ANP и poly(ADSNP) на пероксидазу необходимо обсудить схему пероксидазного окисления, принимая во внимание тот факт, что одновременное присутствие ароматических аминов ( $ArNH_2$ ) и фенолов ( $PhOH$ ) в пероксидазных системах предопределяет сопряженный характер этого сложного процесса. На основании работ [19, 23–26] можно рассмотреть простейшую схему сопряженного окисления пар амины–фенолы с участием пероксидазы:



Процесс включает ферментативные стадии (1)–(3) (3\*) и неферментативные реакции (4)–(4\*)–(4\*\*)–(5).

В том случае, если фенол окисляется намного быстрее амина, т.е.  $k_2 \gg k_{2^*}$  и  $k_3 \gg k_{3^*}$ , вначале преимущественно будет расходоваться фенол, а продукт окисления амина будет появляться с большим периодом индукции, продолжительность которого определяется начальной концентрацией фенола. Именно такой вариант реализуется при пероксидазном окислении пар ТМВ–poly(ADSNP) и ТМВ–ANP, когда концентрация ANP превышает определенную величину (рис. 2 и 3). Как объяснить характер ингибирования пероксидазного окисления ТМВ 2-амино-4-нитрофенолом и его полимерным производным – poly(ADSNP)?

Прогресс в области белковой инженерии и расшифровки третичных структур пероксидаз растений в последние годы [3, 4, 29, 30] дал возможность конкретизировать молекулярный ме-

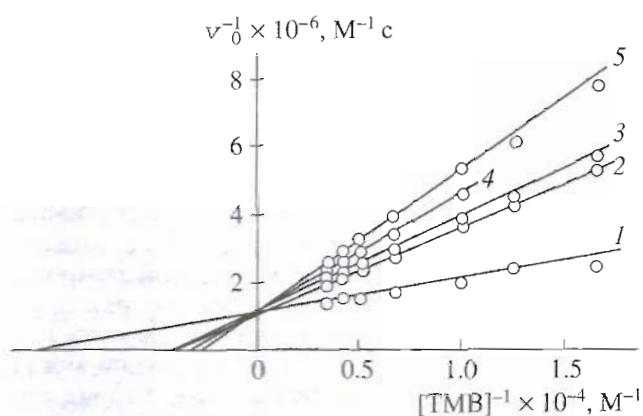


Рис. 6. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления ТМВ от его концентрации в двойных обратных координатах. Условия: 20°C, 1.0 нМ ПХ, 1.0 мМ  $H_2O_2$ ; [poly(ADSNP)] – 0 (1), 0.02 (2), 0.04 (3), 0.06 (4) и 0.08 мМ (5).

ханизм определенных элементарных стадий пероксидазного процесса. В настоящее время ясно, что в гетеролитическом расщеплении пероксида водорода, координированного по аксиальному положению Fe(III) протопорфирина IX, активно участвуют два дистальных аминокислотных остатка – His42 и Arg38: гистидин депротонирует координированную молекулу  $H_2O_2$ , выступая в роли основания, а аргинин перераспределяет электронную плотность между атомами кислорода, обеспечивая гетеролиз связи  $-O-O-$ . Затем гистидин возвращает протон гидроксилу, связанному с аргинином, и молекула воды, образующаяся по реакции (1), покидает активный центр перок-

Количественные параметры ингибирования пероксидазных реакций

Субстрат	Ингибитор	$K_i$ , мкМ	$f$	Литературный источник
ТМВ	poly(DSGA)	1.3	17.8	[19]
	GA	13.3	1.60	[28]
	poly(ADSNP)	18.0	1.34	данная работа
	ANP	160	0.16	данная работа
<i>o</i> -Дианизидин	Тиомочевина	9.0		[16]
	$NaN_3$	320		[16]
	NaOH	4000		[16]
	NaF	36200		[16]
PDA	InH-1*	470		[19]

\* InH-1 – *S*-(2,3-дигидрокси-4,6-ди-*трет*-бутилфенил)тиосульфат натрия (рис. 1).

сидазы, а в результате перераспределения электронов образуется Соединение I ( $E_1$ ), представляющее собой оксиферрилгем с  $\pi$ -катион-радикалом на порфириновом цикле [2, 4]. Методами белковой инженерии для пероксидазы хрена доказано непосредственное участие в связывании и гетеролизе  $H_2O_2$  остатков дистального гистидина [31] и дистального аргинина [32]. Используемые нами ингибиторы ароматической природы (ANP, poly(ADSNP), GA, poly(DSGA)) никак не могут повлиять на первую реакцию пероксидазного процесса. На скорость этой реакции могут воздействовать экстралиганды (азид, фторид, гидроксил), конкурирующие с пероксидом водорода за координацию с гемовым железом по шестому аксиальному положению, что приводит к ингибированию пероксидазного окисления многих субстратов [1–3, 16].

Доступ субстратов и/или ингибиторов в дистальную область пероксидазы осуществляется через канал, размеры которого могут лимитировать этот процесс. В формировании этого канала у пероксидазы участвует последовательность  $^{138}LPAPF^{143}$ , которая, как считается, существенным образом влияет на субстратную специфичность фермента [33, 34]. Используемые нами ингибиторы ароматической природы могут конкурировать с TMB за связывание с пероксидазой в дистальной области, что определяет конкурентный тип ингибирования, обнаруженный для ANP и poly(ADSNP), а ранее для GA [28] и poly(DSGA) [19] в пероксидажном окислении TMB. Как следует из таблицы, полимерные ингибиторы значительно эффективнее, чем аналоги их мономерных звеньев, т.е. увеличение размеров ингибиторов ароматической природы не становится препятствием для их проникновения в дистальную область пероксидазы через гидрофобный канал. Следует отметить, что проблема комплексообразования пероксидазы с восстанавливающими субстратами в настоящее время далека от решения [35]. Определенно можно утверждать только, что связывание ароматических субстратов (или ингибиторов) происходит не по гемину, а на некотором расстоянии от него, что означает наличие у пероксидазы системы транспорта, переносящей электроны от субстрата к Соединениям I или II, т.е. реализуется так называемый дистанционный механизм передачи электрона от восстанавливающего субстрата на гемин.

Еще одна нерешенная проблема пероксидазного катализа – возможный выход радикалов субстрата (или ингибитора) из дистальной полости пероксидазы в объем растворителя. Неферментативные реакции (4), (4\*) и (4\*\*) (см. схему) могут происходить не только в гидрофобном канале фермента, но и вне его. Это же относится к обменной реакции (5), которая играет ключевую

роль при объяснении синергизма в действии аминов и фенолов как ингибиторов жидкофазного окисления углеводов [36, 37] и синергизма при пероксидажном окислении пар амины–фенолы [19, 23–26]. Как показано нами, при определенном соотношении концентраций [ANP]/[TMB] наблюдается активация окисления TMB (рис. 2); активация пероксидажного окисления PDA наблюдается также при определенных соотношениях концентраций [poly(DSGA)]/[PDA] [19] и [GA]/[PDA], т.е. явление синергического возрастания скорости окисления аминов (TMB, PDA) характерно для окисления их в паре с некоторыми фенолами (ANP, GA) или их полимерными производными (poly(DSGA)). Если обменная реакция (5) идет преимущественно слева направо, то наряду с регенерацией фенола наблюдается ускорение расхода амина (увеличение скорости образования  $ArNH^*$ , рекомбинация которого по реакции (4\*) приводит к росту концентрации  $P_2$ ). Именно такая схема реализуется при относительно малых концентрациях ANP в процессе пероксидажного окисления TMB (рис. 2).

Из схемы сопряженного окисления пар “ароматический амин (субстрат)–фенол (ингибитор)” даже в ее сильно упрощенном виде следует, что общий характер пероксидажного окисления таких пар определяется многими факторами: во-первых, реакционной способностью аминов и фенолов по отношению к пероксидажным Соединениям I и II (константами скорости реакций (2) и (2\*), (3) и (3\*)); во-вторых, начальными концентрациями PhOH и  $ArNH_2$  или их соотношением [PhOH]/[ $ArNH_2$ ]; в-третьих, реакционной способностью феноксильных ( $PhO^*$ ) и аминильных ( $ArNH^*$ ) радикалов в обменной реакции (5), т.е. значениями констант скорости  $k_5$  (реакция слева направо) и  $k_{-5}$  (реакция справа налево); в-четвертых, стационарными концентрациями активных Соединений I и II в конкретном пероксидажном процессе сопряженного окисления пар амины–фенолы. Ясно, что даже зная величины констант скорости элементарных стадий (1), (2), (2\*), (3) и (3\*), трудно составить пару амин–фенол, в которой заведомо один из компонентов был бы эффективным ингибитором пероксидажного окисления другого, так как необычайно велика роль неферментативной реакции (5), сведения о константах скорости которой в обоих направлениях, как правило, отсутствуют. Поэтому в настоящее время вопрос об эффективном ингибировании окисления ароматических аминов фенолами и наоборот может быть решен только экспериментально: poly(DSGA) с высокой эффективностью ингибирует пероксидажное окисление TMB при pH 6.4 (таблица), но малоэффективен при окис-

лении другого субстрата пероксидазы – *o*-фенилендиамин при pH 5.8 [19].

Проведенная работа и ранее полученные нами данные [19] свидетельствуют о том, что полимерные ингибиторы poly(ADSNP) и poly(DSGA) являются намного более эффективными антиоксидантами, чем аналоги их мономерных звеньев (ANP и GA), так как антирадикальная активность мономеров многократно умножается при их поликонденсации. Однако увеличение молекулярной массы потенциальных полимерных биоантиоксидантов полимерной природы, к сожалению, сопровождается снижением их растворимости, что существенно осложняет совместимость полимерных биоантиоксидантов с биохимическими системами. Высокая антирадикальная активность и малая токсичность полимерных биоантиоксидантов дисульфидной природы обеспечили их успешное практическое использование как ингибиторов перекисного окисления липидов и перспективных препаратов при лечении черепно-мозговых травм и других патологиях [38]. Мы считаем, что полимерные биоантиоксиданты дисульфидной природы имеют большое будущее. Однако при их использовании для ингибирования пероксидазных реакций необходимо учитывать некоторые особенности сопряженного окисления полимерных биоантиоксидантов фенольной природы и субстратов пероксидазы, так как при определенных условиях возможно снижение ингибирующего эффекта или даже активация окисления субстрата. Следует учитывать также, что при pH > 7 возрастает скорость окисления фенольных ингибиторов молекулярным кислородом, что приводит к генерированию супероксидных анион-радикалов  $O_2^{\cdot-}$ , т.е. ингибитор сам становится источником потенциально активных форм кислорода [21].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** В работе использовали пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) марки А с оптическим показателем чистоты RZ 2.75 производства НПО “Бюлар” (Олайне, Латвия). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы Core (403 нм), равный  $102000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [6]. В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию  $H_2O_2$  спектрофотометрически с использованием  $\epsilon(230 \text{ нм}) 72.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [39]. В качестве восстанавливающего субстрата пероксидазы применяли ТМВ (Serva, Германия).

**Ингибиторы.** Использовали 2-амино-4-нитрофенол (ANP) с молекулярной массой 216 производства “Реахим” (Россия). ANP характеризовался тремя максимумами поглощения в УФ-спектрах

в буфере А (0.01 М фосфатного буфера, pH 6.4, содержащего 10% DMF)  $\epsilon_1(260 \text{ нм}) = 70800$ ,  $\epsilon_2(320 \text{ нм}) = 26900$ ,  $\epsilon_3(440 \text{ нм}) = 39700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенол) (poly(ADSNP)) имел среднюю молекулярную массу ~1400 Да (6–7 мономерных звеньев) и был получен по описанной ранее методике [40].

Исходные растворы фосфатного буфера, pH 6.4, пероксида водорода и пероксидазы готовили в дистиллированной воде, а растворы ТМВ, ANP и poly(ADSNP) – в диметилформамиде. Конечные концентрации реагентов в разных сериях экспериментов указаны в подписях к рисункам и в тексте статьи.

**Пероксидазное окисление ТМВ без ингибиторов и в их присутствии** проводили при 20°C в буфере А, содержащем 1 нМ ПХ, 1 мМ  $H_2O_2$ , 0.5 мМ ТМВ (в опытах с ANP) или 1.0 мМ ТМВ (в опытах с poly(ADSNP)). Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл. Реакцию начинали добавлением раствора  $H_2O_2$  и следили за ней спектрофотометрически, регистрируя рост оптической плотности продукта окисления ТМВ в максимуме его светопоглощения на длине волны 655 нм. Для расчета начальной скорости окисления ТМВ использовали коэффициент его молярного поглощения, равный  $39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [19]. Все реакции проводили в термостатируемой кювете прибора “Specol-211” (Carl Zeiss, Германия).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frew J.E., Jones P. Adv. Inorg. Bioinorg. Mechanisms. Vol. 3. New York: Acad Press, 1984. P. 175–212.
2. Метелица Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. 293 с.
3. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов/ Ред. Егоров А.М. М.: ВИНТИ, 1992. 170 с.
4. Газарян И.Г. Пероксидазы растений – механизм действия и белковая инженерия. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1996. 305 с.
5. Иммуноферментный анализ / Под ред. Нго Т.Т., Ленхоффа Г. М.: Мир, 1988. 444 с.
6. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. С. 116–124.
7. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
8. Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 1672–1686.
9. Еришов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. М.: Химия, 1972. С. 321–327.
10. Denisov E.T. Handbook of Antioxidants: Bond Dissociation Energies, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions. CRC Press, 1995. 256 p.
11. Dunford H.B., Aiberty R.A. // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 447–451.

12. Ellis W.D., Dunford H.B. // *Biochemistry*. 1968. V. 7. P. 2054–2062.
13. Morishima I., Ogawa S., Yonezawa T. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. V. 537. P. 293–303.
14. Morishima I., Ogawa S. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. P. 2814–2820.
15. Paul K., Ohlsson P.J. // *Acta. Chem. Scand.* 1978. V. B32. P. 395–404.
16. Савенкова М.И., Шибяев В.А., Метелица Д.И. // *Изв. АН БССР. Сер. хим. наук*. 1987. № 3. С. 85–89.
17. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. 375 с.
18. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
19. Карасева Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 1255–1263.
20. Карасева Е.И., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1999. Т. 64. С. 68–75.
21. Еремин А.Н., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 894–904.
22. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // *Изв. АН Беларуси. Сер. хим. наук*. 1992. № 1. С. 78–83.
23. Власенко С.Б. Изучение механизма катализируемых пероксидазой реакций окисления люминола и создание методов люминесцентного анализа на их основе. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1989. 132 с.
24. Metelitz D.I., Litvinchuk A.V., Savenkova M.I. // *J. Mol. Catalysis*. 1991. V. 67. P. 401–411.
25. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. // *Биохимия*. 1992. Т. 57. С. 103–113.
26. Литвинчук А.В., Метелица Д.И., Савенкова М.И., Чередникова Т.В., Ким Б.Б., Писарев В.В. // *Биохимия*. 1992. Т. 57. С. 604–616.
27. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–223.
28. Карасева Е.И., Никуфорова Т.В., Метелица Д.И. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1999. Т. 35 (в печати).
29. Schuller D.J., Van N., van Huystee R.B., McPherson A., Poulos T.I. // *Structure*. 1996. V. 4. P. 311–321.
30. Газарян И.Г., Упоров И.В., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Мареева Е.А., Лагримини Л.М. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 708–715.
31. Newmeyer S.L., Ortiz de Montellano P. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 14891–14896.
32. Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Thorneley R.N.F. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 4023–4030.
33. Welinder K.G. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992. V. 2. P. 388–393.
34. Gazaryan I.G., Egorov A.M. // *Adv. Mol. Cell. Biol.* V. 15A. 1996. P. 59–68.
35. Ким Б.Б. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов / Ред. Егоров А.М. М.: ВИНТИ, 1992. С. 126–146.
36. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // *Докл. АН СССР*. 1963. Т. 152. С. 110–114.
37. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // *Докл. АН СССР*. 1965. Т. 160. С. 158–162.
38. Федулов А.С. Очаговые травматические повреждения головного мозга: клинико-экспериментальное обоснование применения антиоксидантов в комплексной терапии. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Минск: БелГИУВ, 1996. 36 с.
39. Справочник химика / Под ред. Никольского Б.П. Т. 4. М.: Химия, 1967. С. 919.
40. Лосев Ю.П., Лосев В.И., Шоноров В.И., Иванова Н.И., Лебедев В.Т. А. с. 1621484 СССР, МКИ С 08, L 23/06, С 08 К 5/37.

## Inhibition of Peroxidase Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine with 2-Amino-4-nitrophenol and its Polydisulfide

E. I. Karasyova\*, T. V. Nikiforova\*, Yu. P. Losev\*\*, and D. I. Metelitz\*\*#

\*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,  
ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

\*\*Belarussian State University, Chemical Faculty, ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220080 Belarus

A comparative kinetic study of the inhibition of peroxidase oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) with 2-amino-4-nitrophenol (ANP) and its polymeric derivative, poly(2-aminodisulfide-4-nitrophenol) (poly(ADSNP)) containing 6–7 monomeric units, was carried out. Both inhibitors function according to a competitive mechanism with inhibition constants  $K_i$  of 160 and 18  $\mu\text{M}$ , respectively. The polymeric inhibitor is much more efficient in the peroxidase oxidation of TMB than its monomeric analogue, and has a stoichiometric factor of inhibition  $f$  8.4 times higher than that for ANP. A scheme of the peroxidase co-oxidation of the aromatic amine (substrate)–phenol (inhibitor) pairs and general grounds for the selection of inhibitors of peroxidase oxidation of aromatic substrates were discussed.

*Key words:* peroxidase, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, inhibition, 2-amino-4-nitrophenol, poly(2-aminodisulfide-4-nitrophenol), conjugated oxidation, inhibition constants

# To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (0172) 62-7274; e-mail: enzyme@ns.iboch.ac.by.