



УДК 577.152.1.042 + 577.152.3 + 577.158.52.02a

ПЕРОКСИДАЗНОЕ ОКИСЛЕНИЕ 3,3',5,5'-ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА В ПРИСУТСТВИИ 2,4-ДИНИТРОЗОРЕЗОРЦИНА И ПОЛИДИСУЛЬФАНОВ РЕЗОРЦИНА И 2,4-ДИНИТРОЗОРЕЗОРЦИНА

© 2002 г. Е. И. Карасёва*, Ю. П. Лосев**, Д. И. Метелица**

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

Поступила в редакцию 28.02.2001 г. Принята к печати 10.05.2001 г.

Проведено сравнительное кинетическое изучение пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензида (ТМБ) в присутствии 2,4-динитрозорезорцина (DNR), его полидисульфана (poly(DNR-DS)) и полидисульфана резорцина (poly(RDS)), которые ингибируют образование продукта превращения ТМБ по конкурентному типу. Определены константы ингибирования K_i , равные при 20°C и pH 6.4 для DNR, poly(DNR-DS) и poly(RDS) соответственно 110, 13.5 и 0.78 мкМ. Стехиометрические коэффициенты ингибирования равны 0.38 и 76 для poly(DNR-DS) и poly(RDS). С ростом pH в интервале 6.4–7.0 значительно уменьшаются начальные скорости пероксидазного окисления ТМБ, его смесей с DNR и poly(DNR-DS), а также величины K_i для poly(RDS). По кинетическим параметрам (K_i 0.22–0.78 мкМ и f 76) poly(RDS) является самым эффективным ингибитором пероксидазного окисления ТМБ и полностью останавливает этот процесс в микромолярных концентрациях, что может быть использовано в иммуоферментном анализе.

Ключевые слова: пероксидаза; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ингибирование; 2,4-динитрозорезорцин; полидисульфан 2,4-динитрозорезорцина; полидисульфан резорцина; сопряженное окисление; константы ингибирования.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема сопряженного пероксидазного окисления аминов в присутствии различных фенолов имеет не только фундаментальный характер, но и большое практическое значение. Этот процесс широко используется для количественного фотометрического определения фенолов и нафтолов [1] и в иммуоферментном анализе многих белковых антигенов [2–4]. В нашей лаборатории детально изучен механизм пероксидазного окисления 4-аминоантипирина в присутствии галоидзамещенных фенолов [5–7]. Особенный интерес представляют пары субстратов люминол–галоидзамещенные фенолы. Последние многократно усиливают хемилюминесценцию, сопровождаю-

щую пероксидазное окисление люминола, что широко используется в хемилюминесцентном варианте ИФА множества антигенов [8–11].

В то время как пероксидазное окисление 4-аминоантипирина [5–7] и люминола [8–13] в парах с фенолами различной природы характеризуется ростом скорости превращения аминов, окисление ТМБ в присутствии галловой кислотой и ее (S → 6)поли(2-дисульфана) (poly(GA-DS)) [14–16]*, 2-амино-4-нитрофенола (ANP) и его (S → 6)поли(N²-дисульфана) (poly(ANP-DS)) [17], 1-амино-2-нафтол-4-сульфоокислоты (ANSA) и ее поли(N¹-дисульфана) (poly(ANSA-DS)) [18] отличается четко выраженным ингибированием. Эффективность ингибирования пероксидазного окисления ТМБ охарактеризована нами константами ингибирования K_i , характеризующими снижение активности пероксидазы в присутствии фенолов, и стехиометрическими коэффициентами ингибирования f , отражающими число катион-радика-

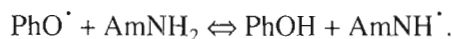
Сокращения: ANSA и poly(ANSA-DS) – 1-амино-2-нафтол-4-сульфоокислота и ее (S → 1)поли(N¹-дисульфана); ANP и poly(ANP-DS) – 2-амино-4-нитрофенол и его (S → 6)поли(N²-дисульфана); DNR и poly(DNR-DS) – 2,4-динитрозорезорцин и его (S → 5)поли(6-дисульфана); GA и poly(GA-DS) – галловая кислота и ее (S → 6)поли(2-дисульфана); poly(RDS) – (S → 6)поли(резорцин-2-дисульфана); ПХ – пероксидаза хрена; ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФБ – 0.01 М фосфатный буфер, pH 6.4; IINH – ингибитор радикальных реакций.

* Автор для переписки (факс: (375)–(172) 63-72-74; эл. почта: enzyme@ns.iboch.ac.by).

* Ранее [14–19] соединения общей формулы H(R-SS)_nН были названы полидисульфидами. В настоящей работе номенклатура и аббревиатура таких соединений пересмотрены в соответствии с рекомендациями номенклатурной комиссии IUPAC (правила B515-2).

лов (ТМВ)^{•+}, “гибнущих” на одной молекуле фенола [14–18]. Эффективность действия полидисульфанных ингибиторов намного выше, чем у аналогов их мономерных звеньев [14–18]. Недавно мы показали, что некоторые изменения среды могут наоборот – активировать пероксидазное превращение ТМВ в присутствии ANP и его полидисульфана [19]. Эффективная активация пероксидазного окисления ТМВ наблюдается также в присутствии 4,4'-дигидроксидифенилсульфона и его полидисульфана в водной среде и в обращенных мицеллах аэрозоля ОТ в гептане [19].

На основании данных [5–19] можно сделать вывод о том, что сложный процесс сопряженного пероксидазного окисления ароматических аминов в присутствии фенолов представляет собой совокупность последовательно-параллельных реакций ферментативной и неферментативной природы. По нашему мнению, особо важная роль в этом процессе принадлежит неферментативной обменной реакции, открытой академиком Н.М. Эмануэлем и его сотр. при жидкофазном окислении углеводов, ингибированном смесями амин–фенол [20, 21]:



Характер влияния фенола на пероксидазное окисление амина зависит от состояния равновесия этой реакции: если реакция смещена вправо, то наблюдается ускоренное окисление амина и регенерация фенола; в противном случае наблюдается ускоренное окисление фенола и регенерация амина. Первый вариант реализуется при пероксидажном окислении пар ААР–фенолы [5–7] и люминол–фенолы [8–13], второй – при окислении ТМВ в присутствии галловой кислоты, ANP, ANSA и их полидисульфанов [14–18], сопровождающимся ингибированием процесса, степень которого зависит от природы фенола.

К ингибированию пероксидазных процессов применима теория метода ингибиторов, разработанная Н.М. Эмануэлем и его учениками [22, 23]: при постоянной скорости образования радикалов субстратов v_i и линейном обрыве радикальных цепей на ингибиторе его текущая концентрация описывается уравнением:

$$[\text{InH}] = [\text{InH}]_0 - (v_i/f)t,$$

где v_i – скорость образования радикалов, f – стехиометрический коэффициент ингибирования, t – время. Для условий полного расходования ингибитора, т.е. при $[\text{InH}] = 0$ уравнение принимает вид:

$$[\text{InH}]_0 = (v_i/f)\Delta t, \quad (1)$$

где $t = \Delta t$ – величина периода индукции в образовании продукта окисления амина. В условиях разившейся реакции окисления субстрата (амина)

начальная скорость его превращения близка к скорости образования радикалов фенолов:

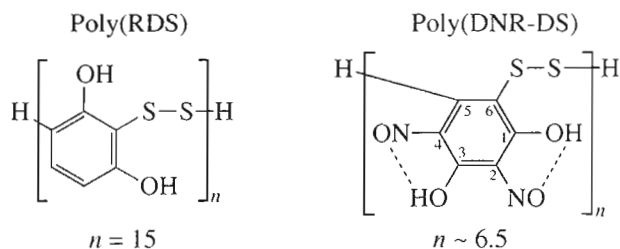
$$v_0 \approx v_i = f(v_i/f). \quad (2)$$

Определив по уравнению (1) величину (v_i/f) , из соотношения (2) можно получить значение коэффициента f , измерив v_0 , т.е. скорость окисления субстрата в отсутствие ингибитора. В наших работах [14–19] доказана корректность применения теории метода ингибиторов [22, 23] к процессу пероксидазного окисления ТМВ в присутствии различных фенолов в разных условиях.

Ясно, что изменение структуры фенольных компонентов и условий их сопряженного окисления с одним и тем же амином (ТМВ) даст новую информацию об особенностях совместного пероксидазного окисления пар ароматические амины–замещенные фенолы. На пероксидазные реакции сильно влияет кислотность среды, роль которой может быть также велика в отношении направления и скорости обменной неферментативной реакции фенолов с аминами (см. выше).

Сопряженное пероксидазное окисление ароматических аминов в присутствии фенолов имеет также важное практическое значение, связанное с разработкой эффективных стоп-реагентов для автоматизированного ИФА множества биологически активных веществ.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение кинетики пероксидазного окисления ТМВ в присутствии 2,4-динитрозорезорцина (DNR), его (S → 5)поли(6-дисульфана) (poly(DNR-DS)) и полидисульфана резорцина (poly(RDS)) при разных значениях pH водных растворов.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование пероксидазного окисления ТМВ 2,4-динитрозорезорцином и его (S → 5)поли(6-дисульфаном)

Из кинетических кривых образования продукта пероксидазного окисления ТМВ (в терминах его оптического поглощения A_{655}) в присутствии 0.1 мМ DNR видно (рис. 1), что при всех использованных значениях pH (5.8–7.8) отсутствуют периоды индукции, а скорость накопления продукта реакции может быть корректно определена по начальным линейным участкам кривых. Кинетические кривые образования продукта окисления

ТМВ в присутствии 20 и 50 мкМ poly(DNR-DS) характеризуются небольшими периодами индукции, после чего также имеют линейный характер (данные не представлены). Во всех случаях начальная скорость окисления ТМВ уменьшается с ростом рН.

При всех значениях рН DNR и poly(DNR-DS) существенно снижают начальную скорость окисления ТМВ (рис. 2а, б), хотя и не меняют характер ее зависимости от величины рН (ср. кривые 1 и 2, 3). Начальные скорости окисления ТМВ во всех случаях снижаются с ростом рН, а точка излома линейных зависимостей приходится при рН 7.4.

Характер зависимостей начальных скоростей окисления ТМВ от его концентрации в двойных обратных координатах в присутствии различных концентраций DNR (рис. 3а) однозначно доказывает для DNR конкурентный тип ингибирования. Обработка полученных данных в координатах Диксона (рис. 3б) позволила определить константу ингибирования K_i , равную 1.1×10^{-4} М.

Ингибирование окисления ТМВ в присутствии poly(DNR-DS) также носит четко выраженный конкурентный характер (данные в координатах Лайнуивера–Берка не показаны). Определенная для poly(DNR-DS) величина K_i равна 1.3×10^{-5} М (рис. 4), т.е. полидисульфат как ингибитор окисления ТМВ почти в 10 раз эффективнее, чем аналог его мономерного звена DNR.

С использованием уравнений (1) и (2), экспериментальных значений v_0 в отсутствие ингибитора и периодов индукции Δt в присутствии poly(DNR-DS) был вычислен стехиометрический коэффициент ингибирования f , равный 0.38. Таким образом, только каждая третья активная частица (катион-радикал ТМВ^{•+}) реагирует с poly(DNR-DS), приводя к регенерации амина и окислению ингибитора. Полученные значения K_i и f свидетельствуют о том, что при пероксидазном окислении ТМВ DNR является слабым, а его полидисульфат – средним по эффективности ингибитором процесса.

Ингибирование пероксидазного окисления ТМВ полидисульфатом резорцина

Из кинетических кривых образования продукта пероксидазного окисления ТМВ (в терминах его оптической плотности A_{655}) в присутствии возрастающих концентраций poly(RDS) (рис. 5а) видно, что ингибитор вызывает появление периодов индукции Δt , продолжительность которых линейно возрастает с увеличением его концентрации (рис. 5б) в полном соответствии с теорией метода ингибиторов [22, 23]. С использованием уравнения (1) определена величина (v_i/f) , равная 1.95×10^{-8} М с⁻¹. Начальная скорость окисления ТМВ в условиях эксперимента (рис. 5) равна $7.4 \times$

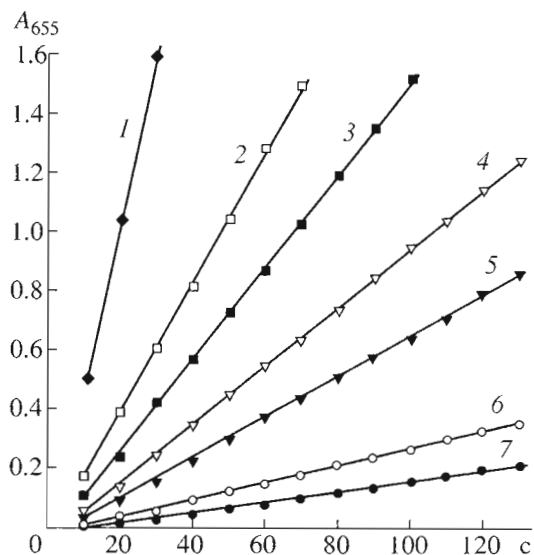


Рис. 1. Кинетические кривые образования продукта пероксидазного окисления ТМВ в присутствии 0.1 мМ DNR при значениях рН 5.8 (1), 6.4 (2), 6.6 (3), 6.8 (4), 7.0 (5), 7.4 (6), 7.8 (7). Здесь и далее условия стандартные (см. “Эксперимент. часть”).

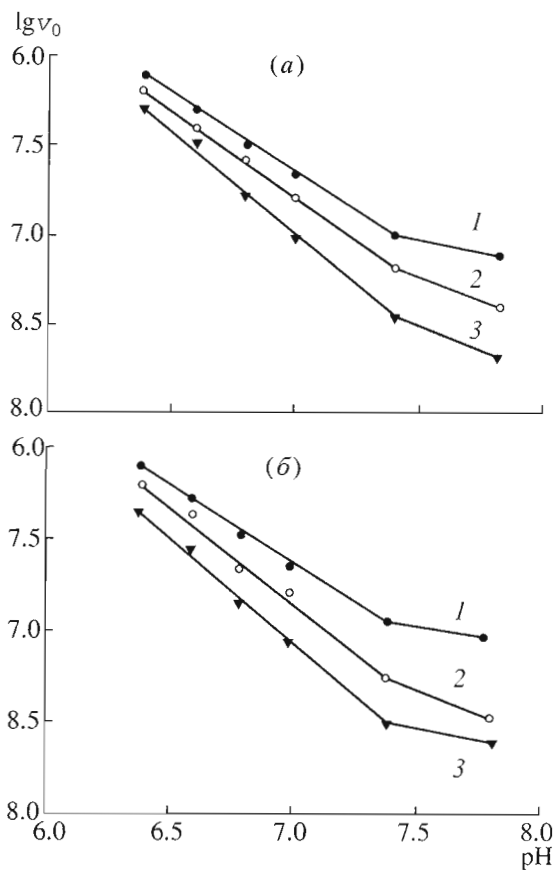


Рис. 2. Зависимости от рН начальной скорости (\lg) пероксидазного окисления ТМВ без ингибиторов (1) и в присутствии (а) – 0.1 (2) и 0.5 мМ DNR (3); (б) – 20 (2) и 50 мкМ poly(DNR-DS) (3).

где [S] – концентрация субстрата, а K_m – константа Михаэлиса при окислении субстрата в отсутствие ингибитора. Зная концентрацию субстрата и K_m , легко вычислить K_i . С этой целью при разных значениях pH нами были определены величины K_m для пероксидазного окисления ТМВ в отсутствие ингибитора в стандартных условиях (табл. 1). Как следует из табл. 1 и рис. 8, эффективность ингибирования (K_i) сильно зависит от величины pH и минимальна при его значении 6.4. Как снижение pH, так и особенно его повышение приводит к росту эффективности ингибирования окисления ТМВ, т.е. к уменьшению величины K_i , которая на участке pH 6.4–7.0 линейно зависит от концентрации водородных ионов (рис. 8). Сравнение рис. 8 и рис. 3а, б показывает, что в диапазоне pH 6.4–7.0 с ростом концентрации ионов H^+ линейно возрастают как начальные скорости окисления ТМВ в отсутствие и в присутствии ингибиторов (рис. 2, кривые 2, 3), так и величина K_i для ингибирования poly(RDS) процесса окисления ТМВ (рис. 8). Из проведенного сравнения можно заключить, что эти эффекты в первую очередь связаны с изменением состояния пероксидазы при увеличении величины pH.

С другой стороны, увеличение концентрации ионов H^+ приводит к подавлению диссоциации фенолов и тормозит реакцию (4):



т.е. препятствует регенерации амина (ТМВ), а, значит, снижает продолжительность периода индукции и эффективность ингибирования, что согласуется с ходом зависимости $\lg K_i - pH$ (рис. 8).

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные согласуются с воздействием ионов водорода как на саму пероксидазу, с кислотной изоформой которой мы работаем, так и на состояние ингибиторов и обменную реакцию (4), которая замедляется с ростом концентрации ионов H^+ .

Ингибирующая способность фенолов и их дисульфанов

В табл. 2 сопоставлены количественные параметры ингибирования пероксидазного окисления ТМВ различными фенолами и их дисульфанами. Как правило, все перечисленные фенолы ингибируют пероксидазное окисление ТМВ по конкурентному типу, что объясняется двумя причинами: во-первых, замещенные фенолы конкурируют с ТМВ за связывание с пероксидазой, которое происходит в ее дистальной области в гидрофобном канале, формируемом с участием последовательности $^{138}LPAPEF^{143}$ [30, 31]; во-вторых, каждый из перечисленных фенолов (табл. 2) может быть потенциальным субстратом ПХ и реагировать с ее активными формами – комплексами I и

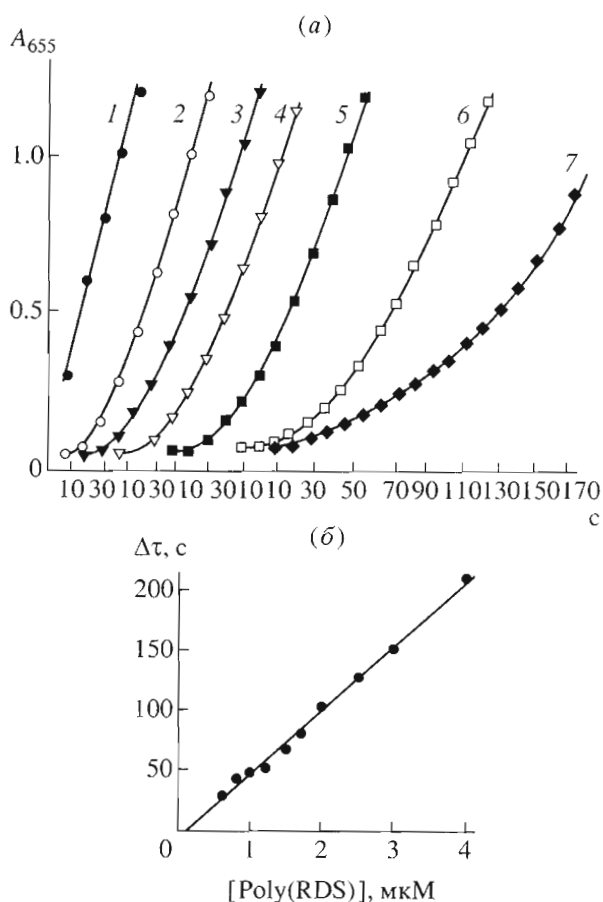


Рис. 5. Кинетические кривые образования продукта пероксидазного окисления ТМВ в присутствии 0 (1), 0.6 (2), 0.8 (3), 1.0 (4), 1.2 (5), 1.7 (6) и 2.5 μM poly(RDS) (7) (а) и зависимость периода индукции $\Delta\tau$ от концентрации poly(RDS) (б).

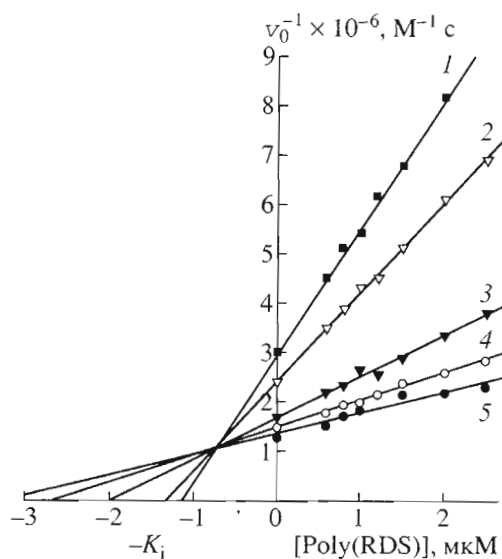


Рис. 6. Зависимости обратной скорости пероксидазного окисления 0.08 (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.3 (4) и 0.5 mM ТМВ (5) от концентрации poly(RDS).

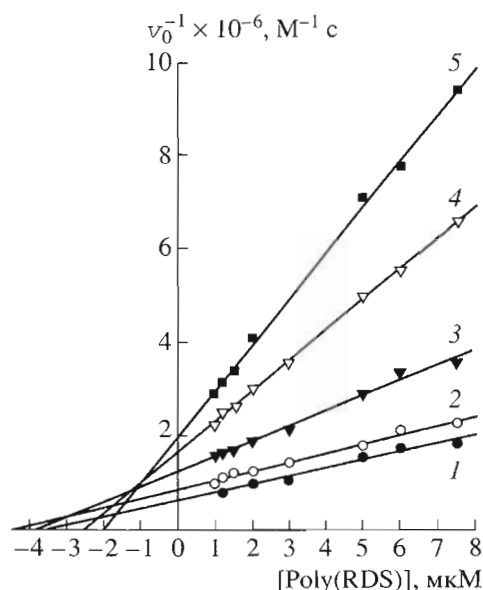


Рис. 7. Зависимости обратной скорости пероксидазного окисления 0.6 мМ ТМБ от концентрации poly(RDS) при значениях pH 6.2 (1), 6.4 (2), 6.6 (3), 6.8 (4) и 7.0 (5).

II, конкурируя с ТМБ (или другими аминами). Таким образом, для конкурентного характера совместного окисления ТМБ и замещенных фенолов с участием ПХ имеются весо́мые основания.

Среди мономерных замещенных фенолов наиболее эффективна галловая кислота (K_i 13.3 мкМ), а все мономерные ингибиторы образуют ряд по их убывающей ингибирующей активности: GA > пропилгаллат > ANP > ANSA > бутаминофен. Антирадикальная активность трехатомных и двухатомных фенолов выше, чем у одноатомных. Стехиометрические коэффициенты ингибирования f меняются в пределах 0.9–3.2, что типично для многих ингибиторов радикальных реакций, для большинства которых значение f составляет 1–2 [32]. Аномально низкое значение f для ANP (0.32) объясняется тем, что обменная реакция (4)

Таблица 1. Количественные характеристики ингибирования poly(RDS) пероксидазного окисления ТМБ (0.6 мМ) при разных значениях pH

pH	[InH]*, мкМ	K_m , мкМ	K_i , мкМ
6.2	3.5	172.0	0.71
6.4	4.1	147.0	0.78
6.6	3.8	95.2	0.52
6.8	2.7	83.3	0.33
7.0	1.9	76.9	0.22

* Величина отрезка, отсекаемого на оси ординат в координатах Диксона [25].

между катион-радикалами (ТМБ)^{•+} и 2-амино-4-нитрофенолом идет медленно, а в случае с DNR в условиях эксперимента не идет вообще, так что величину f даже не удалось измерить (отсутствуют периоды индукции на кинетических кривых образования продукта окисления ТМБ (см. рис. 1)). Очень низкая реакционная способность DNR по отношению к (ТМБ)^{•+} объясняется внутримолекулярными водородными связями 2,4-динитрозо-резорцина; полидисульфид этого двухатомного фенола характеризуется низким значением f (0.38), т.е. в составе полимерного ингибитора большинство внутримолекулярных водородных связей сохраняется.

Как следует из табл. 2, все полидисульфидные ингибиторы значительно активнее аналогов их мономерных звеньев. Их антирадикальная активность должна увеличиваться в сравнении с активностью мономерного ингибитора по крайней мере в n раз, где n – число мономерных звеньев в полидисульфиде. Однако в действительности ингибирующая эффективность полимеров возрастает в большее, чем n , число раз. Сравнение величин K_i для мономерных и полимерных ингибиторов показывает, что в случае poly(DNR-DS) ингибирующая активность в 8.1 раза выше, чем у DNR при $n \sim 6.5$; в случае poly(GA-DS) – в 10.2 раза выше, чем у GA при $n = 7.5$ [14, 15]; в случае poly(ANP-DS) – в 8.8 раза выше, чем у ANP при $n = 6.5$ [17]. Отношения коэффициентов f полимерных ингибиторов и соответствующих им мономеров также всегда больше числа мономерных звеньев. Такое явление называется внутримолекулярным синергизмом ингибирующего действия и характерно также для полидисульфидов биурета, мочевины и тиомочевины, использованных в качестве ловушек радикалов HO[•] [33].

Внутримолекулярный синергизм ингибирующего действия полидисульфидов замещенных фенолов объясняется двумя причинами: во-первых, дисульфидные группы в полимерных ингибиторах могут служить ловушками свободных радикалов; во-вторых, большие размеры полимерных ингибиторов в сравнении с мономерными в большей степени обеспечивают перекрывание центров зарождения радикальных частиц (в гидрофобном канале пероксидазы, например, куда они попадают беспрепятственно, как следует из экспериментальных данных этой работы и предыдущих исследований [14–18, 26]).

Анализ коэффициентов f (табл. 2) показывает, что наиболее эффективную регенерацию ТМБ в процессе пероксидазного окисления обеспечивают полидисульфиды резорцина (76) и галловой кислоты (35.6), хотя можно было бы ожидать обратной зависимости, так как галловая кислота – трехатомный фенол, а резорцин – двухатомный.

Однако значение f для poly(RDS) в ~2 раза выше, чем для poly(GA-DS) в связи с тем, что число мономерных звеньев в первом случае ~15, а во втором – 7.5, что и объясняет приблизительно двухкратную разницу коэффициентов f .

Полидисульфид резорцина обнаружил аномально высокие ингибирующие параметры в пероксидазном окислении ТМВ: K_i 0.78 мкМ, а при pH 7.0 – 0.22 мкМ (см. табл. 1); стехиометрический коэффициент ингибирования равен 76. Показателей такого уровня не имеет ни один из известных нам ингибиторов пероксидазы хрена. ТМВ является одним из самых используемых субстратов пероксидазы в практике иммуноферментного анализа, автоматизация которого требует применения стоп-реагентов пероксидазных реакций [34]. До сих пор для остановки пероксидазного окисления ТМВ используют раствор 2 М H_2SO_4 , что связано с большими неудобствами. Изученный нами полимерный ингибитор пероксидазного окисления ТМВ является лучшим стоп-реагентом для ИФА, так как полидисульфид резорцина в микромолярных концентрациях полностью останавливает пероксидазный процесс и абсолютно безопасен и удобен в работе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) марки А с RZ 2.75 производства НПО “Биолар” (Олайне, Латвия). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы Сорс (403 нм), равный $102000 M^{-1} cm^{-1}$ [35]. В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически с использованием $\epsilon_{230 nm} 72.4 M^{-1} cm^{-1}$ [36]. В качестве восстанавливающего субстрата ПХ применяли ТМВ (Serva, Германия).

Ингибиторы. Использовали 2,4-динитрозорезорцин (DNR) и резорцин производства “Реахим” (Россия). Полидисульфиды резорцина (poly(RDS)) и 2,4-динитрозорезорцина (poly(DNR-DS)) были получены по описанной ранее методике [37]. Poly(RDS) имел молекулярную массу ~2600 Да и содержал ~15 мономерных звеньев; УФ-спектр этого полидисульфида в 0.01 М фосфатном буфере (ФБ), pH 6.4, содержащем 10% ДМФ, характеризовался максимумами поглощения 252 и 287 нм с коэффициентами молярного поглощения 85000 и 43900 $M^{-1} cm^{-1}$ соответственно. Poly(DNR-DS) имел среднюю молекулярную массу ~1300 Да и содержал ~6.5 мономерных звеньев; УФ-спектр в той же среде характеризовался максимумами поглощения 277 и 324 нм и коэффициентами поглощения 58300 и 43200 $M^{-1} cm^{-1}$ соответственно.

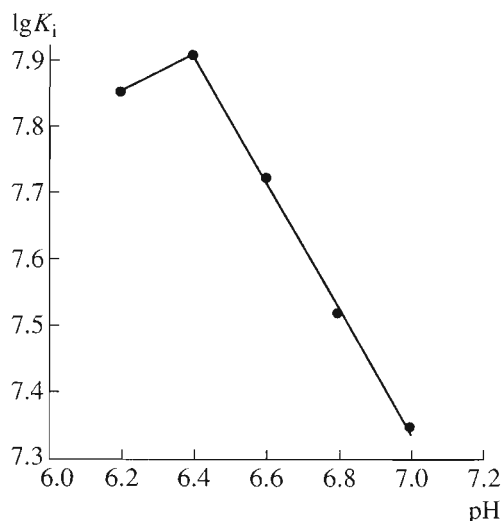


Рис. 8. Зависимость от pH константы ингибирования poly(RDS) пероксидазного окисления 0.6 мМ ТМВ.

Исходные растворы ФБ, H_2O_2 и ПХ готовили в дистиллированной воде, а растворы ТМВ и всех ингибиторов – в свежеперегнанном ДМФ. Конечные концентрации реагентов в разных сериях экспериментов указаны в подписях к рисункам.

Пероксидазное окисление ТМВ без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатируемых кюветах спектрофотометра “Spectol-211” (Carl Zeiss, Германия). В стандартных условиях 1 мл 0.01 М ФБ, pH 6.4 с 10% ДМФ содержал 1 нМ ПХ, 1 мМ ТМВ, 1 мМ H_2O_2 и разные концентрации ингибиторов. Реакцию начинали добавлением раствора H_2O_2 и регистрировали изменение оптического поглощения при длине

Таблица 2. Количественные параметры ингибирования пероксидазного окисления ТМВ фенолами и их дисульфидами

Ингибитор	K_i , мкМ	f	Литературный источник
Бутаминофен*	–	1.47	[26]
ANSA	–	0.90	[18]
Poly(ANSA-DS)	–	6.75	[18]
ANP	160.0	0.32	[17]
Poly(ANP-DS)	18.0	2.68	[17]
DNR	110.0	–	данная работа
Poly(DNR-DS)	13.5	0.38	данная работа
GA	13.3	3.2	[14]
Poly(GA-DS)	1.3	35.6	[15, 16]
Пропилгаллат	42.0	1.3	[27]
Poly(RDS)	0.78	76.0	данная работа

* 2-Гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутил-*N*-фениланилин.

волны 655 нм, что соответствовало максимуму поглощения продукта окисления ТМВ.

Начальные скорости окисления ТМВ (v_0 , $M\ c^{-1}$) определяли по линейным участкам кинетических зависимостей оптического поглощения A_{655} от времени, используя для расчета молярный коэффициент поглощения продукта окисления ТМВ, равный при 655 нм $39000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ [35].

Количественные характеристики ингибиторов. Константы ингибирования K_i определяли по методу Диксона [25]. Стехиометрические коэффициенты ингибирования рассчитывали, используя уравнения (1) и (2).

Данная работа выполнена при финансовой поддержке INTAS по проекту 99-01768.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. С. 74–79.
2. Hoshino N., Hama M., Suzuki R., Kataoka Yu., Soe G. // J. Biochem. 1985. V. 97. P. 113–118.
3. Hoshino N., Nakajima R., Yamazaki I. // J. Biochem. 1987. V. 102. P. 785–791.
4. Савенкова М.И. // Прикл. биохим. микробиол. 1991. Т. 27. С. 265–273.
5. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. // Кинетика и катализ. 1991. Т. 32. С. 535–540.
6. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. // Изв. АН БССР. Сер. хим. наук. 1991. № 2. С. 75–82.
7. Metelitz D.I., Litvinchuk A.V., Savenkova M.I. // J. Mol. Cat. 1991. V. 67. P. 401–411.
8. Kricka L.J., Stott R.A., Thorpe G.H.G. // Complementary Immunoassays / Ed. Collins W.P. Chichester: John Wiley, 1988. P. 169–179.
9. Гаврилова Е.М. // Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 3. М.: ВИНТИ, 1987. С. 6–65.
10. Vlasenko S.B., Arefyev A.A., Klimov A.D., Kim B.B., Gorovits E.I., Osipov A.P., Gavrilova E.M., Egorov A.M. // J. Biolum. Chemilum. 1989. V. 4. P. 164–176.
11. 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.
12. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 103–113.
13. 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.
14. Карасёва Е.И., Никифорова Т.В., Метелица Д.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. (в печати).
15. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1255–1263.
16. Карасёва Е.И., Метелица Д.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 68–75.
17. Карасёва Е.И., Никифорова Т.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 665–672.
18. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т. 37. (в печати).
19. Карасёва Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 751–761.
20. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 152. С. 110–114.
21. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1965. Т. 160. С. 158–162.
22. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. 375 с.
23. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
24. Josephy P.D., Eling T., Mason R.P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 3669–3675.
25. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–223.
26. Гринцевич Е.Э., Сенчук В.В., Пучкаев А.В., Шадыро О.И., Метелица Д.И. // Биоорганич. химия. 2000. Т. 26. С. 825–837.
27. Гринцевич Е.Э., Сенчук В.В., Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 1088–1098.
28. Divi R.L., Doerge D.R. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 9668–9674.
29. Tsukamoto K., Itakura H., Fukuyama K., Miura S., Takahashi S., Ikezawa H., Hosoya T. // Biochemistry. 1999. V. 38 (39). P. 12558–12568.
30. Welinder K.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1992. V. 2. P. 388–393.
31. Gazaryan I.G., Egorov A.M. // Adv. Mol. Cell. Biol. 1996. V. 15 A. P. 59–68.
32. Denisov E.T. Handbook of Antioxidants: Bond Dissociation Energies, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions. L.: CRC Press, 1995. 256 p.
33. Метелица Д.И., Арапова Г.С., Ерёмин А.Н., Лосев Ю.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1420–1431.
34. Sigma ImmuNotes. Immunoperoxidase Substrates. 1991. № 5. P. 3–7.
35. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохим. микробиол. 1987. Т. 23. С. 116–124.
36. Справочник химика / Ред. Никольский Б.П. Т. 4. Ленинград: Химия, 1967. С. 919.
37. Лосев Ю.П., Лосев В.И., Бирюкова Н.М., Зайцев А.А., Матюхин Н.Н. Полимерная композиция (полирезорцин-дисульфид) А.с. 536205 СССР // Б.И. 1986.

Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in the Presence of 2,4-Dinitrosoresorcinol and Polydisulfide Derivatives of Resorcinol and 2,4-Dinitrosoresorcinol

E. I. Karaseva*, Yu. P. Losev**, and D. I. Metelitsa**

#Fax: (375-172) 63-7274; e-mail: enzyme@ns.iboch.ac.by

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

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

A comparative study of the kinetics of peroxidase-catalyzed oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of 2,4-dinitrosoresorcinol (DNR), its polydisulfide derivative [poly(DNRDS)], and resorcinol polydisulfide [poly(RDS)], substances that competitively inhibit the formation of TMB conversion product, was carried out. The inhibition constants K_i for DNR, poly(DNRDS), and poly(RDS) were determined at 20°C and pH 6.4 to be 110, 13.5, and 0.78 μM , respectively. The stoichiometric coefficients of inhibition were calculated to be 0.38 and 76 for poly(DNRDS) and poly(RDS), respectively. In the pH range 6.4–7.0, the initial rates of the peroxidative oxidation of TMB, and its mixtures with DNR and poly(DNRDS) and the K_i value for poly(RDS) substantially decreased with increasing pH. The kinetic parameters of poly(RDS) (K_i 0.22–0.78 μM and f 76) suggest that it is the most efficient inhibitor of peroxidase oxidation of TMB: in micromolar concentrations, it completely stops this process and can be used in EIA. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: conjugated oxidation, 2,4-dinitrosoresorcinol, 2,4-dinitrosoresorcinol polydisulfide, inhibition, inhibition constants, peroxidase, resorcinol polydisulfide, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine