

2

АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
Институт биоорганической химии

На правах рукописи

ЛИТВИНЧУК  
Александра Васильевна

УДК 577.152.193:57.037.

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ БИСУБСТРАТНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ РЕАКЦИИ

02.60.10 - биоорганическая химия, химия природных и  
физиологически активных веществ

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Минск - 1993

Работа выполнена в ла  
Института биоорг

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00760733 (Q)

Научный руководитель

доктор х  
профессор Л. Н. Литвинко

Официальные оппоненты - доктор химических наук

- П. А. Киселев  
кандидат биологических наук
- В. П. Курченко

Ведущая организация - Химический факультет Московского  
государственного Университета  
им. М.В. Ломоносова, кафедра  
химической энзимологии

Защита диссертации состоится " " 1993 года на  
заседании специализированного совета Д 006.22.01 при  
Институте биоорганической химии АН Беларуси по адресу:  
220141, г. Минск, ул. Жодинская, 5/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
биоорганической химии АН Беларуси

Автореферат разослан " " 1993 года.

Ученый секретарь  
специализированного совета,  
кандидат химических наук

Н. М. Литвинко

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Исследования кинетики и механизма действия пероксидаз обусловлены прикладными целями их использования в иммуоферментном анализе (ИФА) и фундаментальными проблемами катализа окислительно-восстановительных реакций гем-содержащими белками. Пероксидаза хрена (ПХ) наиболее широко используется в качестве маркера в методах ИФА.

ИФА представляет собой одну из важнейших областей биотехнологии. Особенно актуальной задачей является создание гомогенных методов ИФА. В 1985 году японскими исследователями разработан гомогенный ИФА α-фетопротейна с использованием пероксидазного окисления пары субстратов - 4-аминоантипирина и фенола - в условиях избытка перекиси водорода, когда антитела против анализируемого антигена снимают ингибирование пероксидазного конъюгата избытком окислителя. Реакции совместного каталитического окисления 4-аминоантипирина (ААП) и 4-диметиламиноантипирина (ДМААП) с фенолом мало изучены, хотя давно используются в аналитической химии.

В этой связи актуальной задачей является изучение кинетики и механизма сопряженного окисления аминов и фенолов, катализируемого ПХ и ее иммунными комплексами, при разных концентрациях окислителя - перекиси водорода.

Расширение круга субстратов ПХ позволит выбрать наиболее приемлемые для анализа пары, так как важным для практики является создание чувствительных гомогенных ИФА и других аналитических методов.

Весьма актуальной является также проблема модуляции белками реакционной способности гема. В связи с этим особый интерес представляет исследование влияния антител на пероксидазу в катализированных ею реакциях.

Цели исследования состояли в следующем:

- изучить кинетику и механизм пероксидазного деметилирования третичных аминов;
- изучить кинетику и механизм пероксидазного сопряженного окисления фенолов с 4-аминоантипирином и п-йодфенола с луминолом в широком диапазоне концентраций перекиси водорода;
- исследовать влияние специфичных антител к пероксидазе на процессы сопряженного пероксидазного окисления аминов и



фенолов при разных концентрациях перекиси водорода;

- разработать с использованием бисубстратных реакций пероксидазы гомогенный иммуноферментный анализ иммуноглобулинов G человека.

Положения выносимые на защиту:

- проведение сравнительного пероксидазного деметилирования третичных аминов (4-аминоантипирина, 4-диметиламиноантипирина и диметиланилина (ДМА));

- исследование кинетики и механизма совместного окисления пероксидазой аминов (ААП, ДМААП и луминола) с галоидзамещенными фенолами;

- изучение влияния специфических к пероксидазе поликлональных и моноклональных антител на реакции совместного пероксидазного окисления пар "ААП - фенолы" и "люминол - п-йодфенол" в широком интервале концентраций перекиси водорода;

- изучение влияния избытка перекиси водорода на константу диссоциации пероксидазы на гем и апобелок;

- разработка гомогенного хемиллюминесцентного ИФА иммуноглобулинов G человека с использованием пары "люминол - п-йодфенол".

Научная новизна. Методом остановленной струи измерены константы скорости элементарных стадий окисления 4-аминоантипирина с участием пероксидазы и ее иммунного комплекса.

Предложен механизм совместного пероксидазного окисления 4-аминоантипирина и фенолов, в котором главная роль принадлежит неферментативным реакциям регенерации фенолят-ионов аминами.

Доказано, что константа диссоциации пероксидазы на гем и апобелок с увеличением концентрации перекиси водорода сильно возрастает, а образование иммунных комплексов пероксидазы с поликлональными антителами предотвращает диссоциацию фермента и сохраняет его каталитическую активность в реакции сопряженного окисления пар "ААП - фенолы" и "люминол - п-йодфенол".

Разработан хемиллюминесцентный иммуноферментный анализ иммуноглобулинов G человека на основе сохранения пероксидазной активности иммунного комплекса конъюгата ПХ-IgG с антителами, специфичными к IgG, при высоких концентрациях перекиси водорода в реакции сопряженного окисления луминола с п-йодфенолом.

Практическая значимость. Доказано, что образование продукта

при сопряженном пероксидазном окислении 4-аминоантипирина и фенола лимитируется скоростью окисления фенола и эта реакция может быть успешно использована для количественного определения фенолов в аналитических методах.

Применение 4-диметиламиноантипирина в качестве аминной компоненты в реакции совместного пероксидазного окисления аминов и фенолов для аналитических целей нецелесообразно в связи с малой скоростью деметилирования этого амина.

Реакция совместного пероксидазного окисления 4-аминоантипирина и п-йодфенола успешно применена в твердофазном иммуоферментном анализе кортизола с использованием набора реактивов "ИФА - КОРТИЗОЛ-АС", разработанного в лаборатории прикладной энзимологии Института биоорганической химии АН Беларуси.

Пероксидазное окисление пары субстратов "л-аминол - п-йодфенол" при избытке перекиси водорода использовано в гомогенном хемиллюминесцентном иммуоферментном анализе иммуноглобулинов G человека.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены и представлены на VII Международной конференции молодых ученых по органической и биологической химии, (Варна, Болгария, 1990); VII Всесоюзном симпозиуме "Инженерная энзимология" (Москва, 1991); Международном симпозиуме по биотехнологии "Новое поколение моноклональных антител в диагностике и терапии" (Генуя, Италия, 1992); VIII Международном симпозиуме по гомогенному катализу (Амстердам, Голландия, 1992).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей и тезисы 4-х докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), выводов, списка опубликованных работ и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 165 страницах, содержит 29 рисунков и 13 таблиц. Библиография - 165 наименований работ отечественных и зарубежных авторов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИИ

Объект исследования - пероксидаза хрена, ее иммунные комплексы с поликлональными и моноклональными антителами, конъюгат пероксидазы с иммуноглобулинами G человека.

В работе использовали пероксидазу хрена ( $EZ=2.7$ ) производства "Биолар" (Олайне, Латвия). Поликлональную антисыворотку к пероксидазе и IgG получали иммунизацией кроликов, смесью 1 мл ПХ или IgG в 0.5 мл физиологического раствора и 0.5 мл полного адьюванта Фрейнда. Моноклональные антитела, специфичные к пероксидазе (2С, 3Е, 9В), были предоставлены канд. хим. наук Т.В. Чередниковой (Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН). Иммуноглобулины G человека получены из сыворотки крови путем осаждения насыщенным раствором сульфата аммония, хроматографированы на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и тестированы по Уохтерлони. Конъюгат пероксидазы хрена с IgG человека синтезирован метапериодатным способом, очищен гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-150.

Реакции окислительного деметилирования третичных аминов проводили в термостате. Концентрацию образующегося формальдегида определяли по методу Наша.

Сопряженное окисление ААП и ДМААП с фенолами проводили в термостатированной кювете прибора "Spekol-211", образующиеся антипирилхинониманы определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции, определенные экспериментально в данной работе.

Сопряженное окисление люминола и фенола проводили в термостатированной кювете флуориметра марки ФМ-Ц-2, который использовали в режиме люминометра для регистрации хемилюминесценции с помощью двухкоординатного самописца, выражая интенсивность хемилюминесценции (I) в условных единицах, соответствующих показанию рекордера в вольтах.

Для определения констант скорости элементарных стадий пероксидазного процесса в работе использовали установку "остановленной струи" RA-401 (Union Giken, Япония). Спектрофотометрические измерения проводили в изобестической точке форм ПХ E и E<sub>1</sub> ( $\lambda_{\text{макс}}=426\text{nm}$ ). В работе использовали такие концентрации реагентов, которые обеспечивали псевдопервый порядок реакции по субстрату - восстановителю. Концентрация пероксидазы составляла  $10^{-6}\text{M}$ . В случае изучения кинетики реакции восстановления E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> выбирали концентрацию перекиси водорода, намного большую концентрации фермента ( $10^{-3}\text{M}$ ), а в случае изучения кинетики восстановления E<sub>1</sub> до E концентрация раствора перекиси водорода

выбиралась равной начальной концентрации фермента. Концентрацию ААП варьировали в диапазоне, ограниченном необходимостью выполнения условия псевдопервого порядка реакции по субстрату и невозможностью регистрации быстрых процессов, выходящих за "мертвое время" установки.

Ферментативную активность характеризовали начальными скоростями реакций в М/с, а кинетические характеристики ( $V, K_M$ ) получали из трансформации зависимостей начальных скоростей реакции от начальных концентраций субстратов по методу Лайнуивера-Берка.

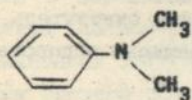
#### КИНЕТИКА ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПАР СУБСТРАТОВ

##### Пероксидазное деметилирование третичных аминов

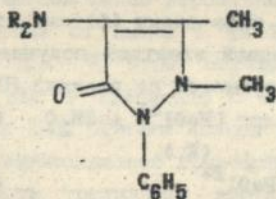
(диметиланилин, 4-аминоантипирин, 4-диметиламиноантипирин)

Окислительное деметилирование третичных аминов происходит при воздействии на них перекиси водорода или органических гидроперекисей в сочетании с различными гемопротеидами. Деметилирование ДМАП представляет интерес в связи с широким применением этого анальгетика.

Главной задачей исследования было получение количественных характеристик пероксидазного деметилирования ДМА, ДМААП и ААП, различающихся окружением третичного азота.



ДМА



R=H : ААП

R=CH<sub>3</sub> : ДМААП

Таблица 1. Кинетические параметры пероксидазного деметилирования ДМА (0.1 мкМ ПХ) и ДМААП (0.02 мкМ ПХ) при 25° и pH 7.0

Субстрат (S)	$V \cdot 10^7$ , М/с		$10^3 \cdot K_M$ , М		$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	
	по S	по H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	по S	по H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	по S	по H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ДМА	3.70	10.00	0.20	2.50	3.70	10.00
ДМААП	0.28	1.25	16.6	0.43	1.43	6.25

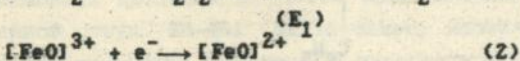
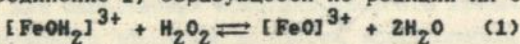
Для превращения обоих субстратов характерно ингибирование большими концентрациями окислителя: в случае ДМА при H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > 1.0 мМ и в случае ДМААП при H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > 0.4 мМ. В аналогичных условиях ДМА деметилируется в 2.6 раза быстрее, чем ДМААП.

Изучение деметилирования ААП при 25°С и начальных концентрациях реагентов ПХ - 0.1 мкМ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 1.0 мМ и ААП - 0.05 М показало, что этот процесс мало зависит от pH (в интервале 5.0 - 7.0), сильно самотормозится и происходит до небольших глубин превращения субстрата, составляющих 0.37%, т.е. деметилирование третичного азота в положении 2 молекулы ААП сильно затруднено в условиях пероксидазной трансформации этого субстрата.

На примере ДМА изучено влияние температуры в интервале 11 - 40°С на скорость деметилирования при окислении этого субстрата. Линейному участку на Аррениусовской зависимости каталитических констант соответствует энергия активации, равная (15.4 ± 2.0) ккал/моль.

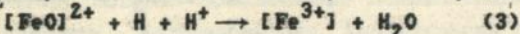
Возможные пути окислительного деметилирования третичных аминов представлены в виде схемы (1) (см. стр. 9).

По этой схеме первый электрон получает сильный окислитель - соединение I, образующееся по реакции ПХ с перекисью водорода:



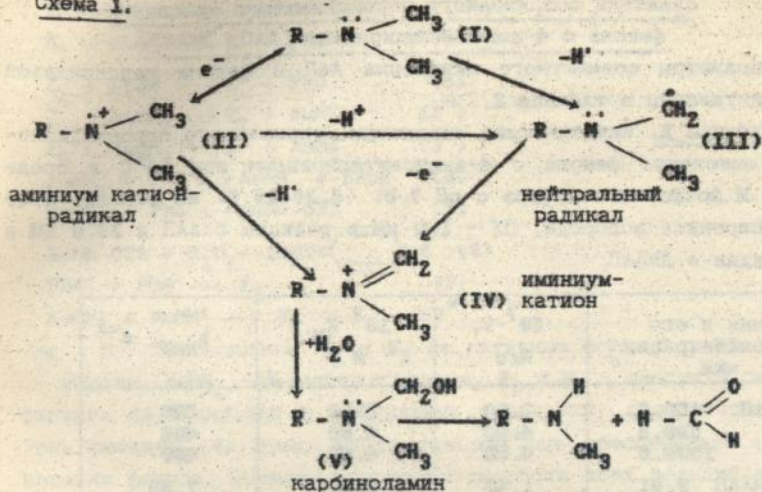
(E<sub>2</sub>)

E<sub>2</sub> отрывает атом Н от аминий катион-радикала II по реакции 3:



исходный фермент

Схема 1.



Соединение  $E_1$  является намного более сильным окислителем, чем  $E_2$ , поэтому лимитирующей стадией всего процесса может быть отрыв атома водорода от аминиум катион-радикала II. Это подтверждается значениями внутримолекулярных изотопных эффектов при окислении ДМА разными формами пероксидазы (8.72-10.0), т. е. в лимитирующей стадии происходит отрыв атома водорода. Второй путь процесса с отрывом H на первой стадии менее вероятен из-за больших прочностей C-H - связей в метильных группах третичного амина I. Мы считаем более вероятным первый путь реакции с переносом электрона от амина I на  $E_1$  и образование аминиум катион-радикала II. В этом случае более высокая реакционная способность ДМА в сравнении с ДМААП объясняется более высокой основностью ДМА. Причины низкой реакционной способности ААП в процессе пероксидазной трансформации может быть две: во-первых, основность третичного азота в положении 2 понижена, во-вторых, с  $E_1$  может легко реагировать свободная  $NH_2$  - группа в молекуле ААП, чем объясняется сильное торможение окислительного деметилирования ААП в процессе пероксидазной трансформации.

Особый интерес представляет совместное окисление третичных аминов с легкоокисляемыми субстратами ПХ - фенолами.

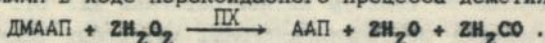
Кинетика сопряженного пероксидазного окисления  
фенола с 4-аминоантипиринами (ААП, ДМААП)

Параметры совместного окисления ААП и фенола пероксидазой представлены в таблице 2.

Таблица 2. Кинетические параметры сопряженного пероксидазного окисления фенола с 4-аминоантипиринами при 25°C в среде 0.1 М фосфатного буфера с pH 7.0: (0.10-10.0) мМ фенола, 0.43 мМ перекиси водорода, ПХ - 1.0 нМ в реакции с ААП и 20.0 нМ в реакции с ДМААП.

Амин и его концентрация, мкМ	$10^7 v$ , Н/с	$10^3 K_M$ , М	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>
ААП 100.0	2.00	2.50	200
500.0	4.00	4.00	400
1000.0	4.00	4.00	400
ДМААП 0.01	1.43	0.80	7.35
1.00	1.43	0.80	7.35
100.0	3.70	3.92	18.50

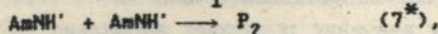
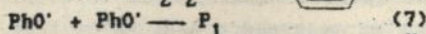
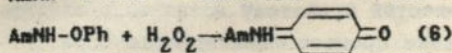
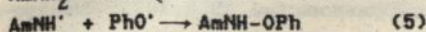
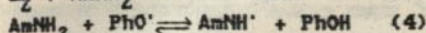
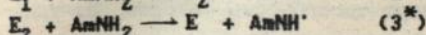
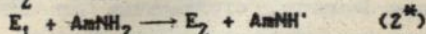
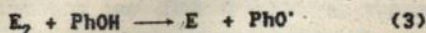
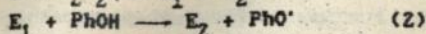
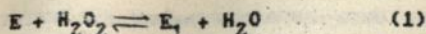
ДМААП в ходе пероксидазного процесса деметилируется:



Образовавшиеся при пероксидажном окислении фенола радикалы PhO<sup>•</sup> реагируют с амином и дают регистрируемый спектрально антипирилкинонимин (АХИ). В случае пары "фенол - ДМААП" накопление АХИ лимитируется окислительным деметилированием ДМААП с образованием ААП, а не окислением самого фенола. При сопряженном окислении ААП и фенола скорость накопления АХИ не зависит от содержания амина, а определяется только концентрацией фенола и ПХ и спектральная регистрация АХИ отражает скорость окисления фенола, поэтому для дальнейших исследований был выбран ААП.

Кинетика сопряженного пероксидазного окисления  
4-аминоантипирина и галоидзамещенных фенолов.

Исследовано сопряженное окисление ААП с фенолами (фенол, п-крезол, п-хлорфенол, п-бромфенол, п-йодфенол, 2,4-дихлорфенол и пирокатехин). Предложена схема сопряженного пероксидазного окисления ААП и фенолов:



где - E - пероксидаза, E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> ее активные формы I и II, PhOH - фенолы, AmNH<sub>2</sub> - 4-аминоантипирин, P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> - продукты рекомбинации феноксильных и аминильных радикалов, соответственно. Роль реакции (4) очень важна, так как она обеспечивает регенерацию фенола. Оценены константы скорости всех реакций кроме реакции 4.

Можно считать, что в присутствии ААП большая часть феноксилов превращается последовательно по реакциям 4, 5 и 6 в антипирилхинонимин, который в определенных условиях можно считать единственным продуктом реакции.

В таблице 3 представлены значения V, K<sub>M</sub> по фенолу, k<sub>кат</sub> для 8 пар субстратов.

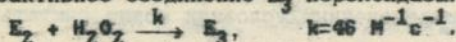
Таблица 3. Кинетические характеристики процесса образования антипирилхинонимининов при пероксидазном окислении фенолов и 4-аминоантипирина (25<sup>0</sup>С, 0.1 М фосфатный буфер, рН<sup>0</sup> 7.0).

Фенол	10 <sup>7</sup> V, М/с	10 <sup>2</sup> K <sub>M</sub> , М	k <sub>кат</sub> , с <sup>-1</sup>
фенол	5.44	0.54	544
п-крезол	4.08	3.20	407
п-Сl-фенол	9.59	1.08	959
п-Br-фенол	9.58	0.68	958
п-I-фенол	13.84	0.10	1384
о-I-фенол	0.22	4.00	22
2-4-Сl-фенол	35.30	2.63	3526
пирокатехин	11.70	1.40	1170

Не измерив константу скорости реакции 4 в прямом и обратном направлениях, нельзя сделать окончательное заключение о природе лимитирующей стадии процесса, поэтому полученные нами ката-

литические константы не могут быть выражены через константы скорости элементарных стадий. Учитывая эффективный характер  $k_{кат}$  для реакций галоидзамещенных фенолов с ААП, мы условно сопоставили их с  $\rho$ -константами Гаммета, отражающими влияние пара-заместителей на реакционную способность фенолов. Из уравнения Гаммета  $\log k_{кат}^x / k_{кат}^H = \rho \sigma$ , где  $M$  - заместитель в пара-положении, получено значение  $\rho$ , равное  $(+1.15 \pm 0.20)$ . Электрофильный характер  $E_1$  и  $E_2$  известен и поэтому можно было ожидать отрицательных значений  $\rho$ , если процесс лимитируется образованием феноксильных радикалов или их реакцией с ААП. Мы считаем, что полученное положительное значение объясняет аномально высокую реакционную способность галоидфенолов в сопряженном пероксидазном окислении их с ААП. Это явление аналогично роли фенолов в процессе усиленной хемилюминесценции при их совместном окислении с люминолом.

В изученном нами пероксидазном процессе сопряженного окисления фенолов с ААП наблюдается ингибирующее действие избытка перекиси водорода. Известно, что в этих условиях образуется неактивное соединение  $E_3$  пероксидазы:



Эта реакция может конкурировать с реакцией 3, (см. схему процесса) при использованных нами концентрациях фенола и  $H_2O_2$ .

Влияние антител, специфичных к пероксидазе,  
на пероксидазное окисление пар субстратов.

Изучено влияние поликлональной антисыворотки и моноклональных антител 2С, 3Е, 9В и их бинарных и тройных смесей на начальные скорости окисления фенолов с ААП и люминола с п-йодфенолом. Антитела предварительно инкубировали с пероксидазой в 0.1 М фосфатном буфере с рН 7.0 в течение 1.5 часов до достижения равновесия при образовании иммунных комплексов. При пероксидазном окислении ААП и галоидфенолов образование иммунного комплекса ПК снимает ингибирование реакции избытком  $H_2O_2$ , увеличивая максимально достижимую скорость образования АХИ: для пары ААП с п-хлорфенолом в 5 раз (рис. 1), п-бромфенолом - в 3 раза, п-йодфенолом - в 2 раза, для пары ААП - фенол - в 3.7 раза. Для пары "ААП - крезол" наблюдается снижение образования АХИ в 1.5 раза. Все типы моноАТ ингибируют окисление пары "ААП

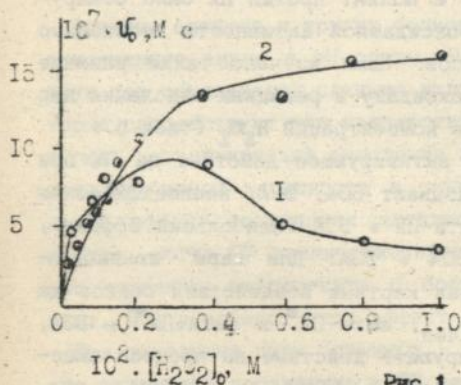
- *p*-Йодфенол" при оптимальной концентрации  $H_2O_2$  (1 мМ) и при ее избытке (10.0 мМ).

Смеси моноАТ в широком интервале концентраций  $H_2O_2$  (1.0 - 10.0 мМ) активируют окисление пары "ААП - фенолы".

Изучено влияние моноАТ, а также их смесей и поликлональной антисыворотки на окисление пары "люминол - *p*-Йодфенол", которая широко используется в ХИФА методах. При высоких концентрациях  $H_2O_2$  (0.01 - 0.10 М), в отсутствие анти-ПХ наблюдается интенсивное снижение хемиллюминесценции. Иммунный комплекс [ПХ + анти-ПХ] сохраняет каталитическую активность ПХ при избытке перекиси водорода.

Исследовано влияние pH, концентрации АТ, природы амина и фенола на их совместное окисление. Активация ПХ антисывороткой против нее наблюдается только при высоких концентрациях  $H_2O_2$ , при низких концентрациях окислителя анти-ПХ ингибирует фермент. pH реакционной смеси в сильной степени определяет активирующее действие анти-ПХ на пероксидазу.

Большие концентрации анти-ПХ в одних случаях ингибируют процесс окисления, а в других активируют. Активирующее действие анти-ПХ ярче выражено для пар ААП с разными фенолами в сравнении с парами "люминол - фенолы".



Зависимости начальных скоростей образования АХИ от начальной концентрации  $H_2O_2$  при сопряженном окислении *p*-С1-фенола и ААП (0.5 мМ) перекисью водорода: ПХ (1 нМ) (1) и ПХ с полиАТ (2) ( $4.8 \cdot 10^{-4}$  мг белка/мл).

Рис. 1

При сопряженном окислении ААП с фенолами активирующее действие анти-ПХ зависит от фенола и существенно усиливается в ряду: PhOH < *p*-С1-PhOH < *p*-Br-PhOH < *p*-I-PhOH.

МоноАТ активирует процесс усиленной хемилюминесценции в возрастающих концентрациях, бинарные и тройные смеси моноАТ ингибируют окисление этой пары субстратов, в то время как полиАТ активирует окисление люминола и п-йодфенола при концентрациях  $H_2O_2$ , больше 5.0 мМ.

Таблица 4. Влияние антител на окисление пар субстратов.

Антитела	ААП - п-И-фенол		люминол - п-И-фенол	
	1мМ $H_2O_2$	10мМ $H_2O_2$	5мМ $H_2O_2$	10мМ $H_2O_2$
без АТ	14.60	2.70	5.20	2.60
2С+3Е	22.15	3.80	2.20	3.40
9D+2С	16.78	3.47	3.10	1.96
3Е+9D	29.00	4.31	4.00	1.66
2С+3Е+9D	30.80	4.71	4.00	2.50
полиАТ	53.60	36.50	3.80	3.24
	$v_0 \cdot 10^7$ М/с		$I_{\text{макс}}$	

Результаты исследования влияния специфичных к ПХ антител представлены в таблице 4.

Влияние инертных белков на пероксидазное окисление пар субстратов

При изучении влияния моноАТ и полиАТ против ПХ было обнаружено, что для сохранения пероксидазной активности необходимо образование иммунных комплексов. Нами изучено также влияние неспецифических белков на пероксидазу в реакциях окисления пар субстратов в широком интервале концентраций  $H_2O_2$  (табл. 5).

Для пары "ААП - п-И-фенол" активирующее действие на ПХ при избытке перекиси водорода оказывают БСА, ОВА, неспецифическая сыворотка, анти-ПХ\*, смесь анти-ПХ + БСА (наибольший эффект), поликлональная сыворотка к БСА + БСА. Для пары "люминол - п-И-фенол" наблюдается обратная картина воздействия белков на активность ПХ. БСА, ОВА,  $IgG_{\text{чел}}$ , анти-ПХ\* и анти-ПХ\* + БСА, полиАТ к БСА оказывают ингибирующее действие на процесс окисления люминола и п-И-фенола.

Таблица 5. Влияние инертных белков на окисление пар субстратов "ААП - п-І-фенол" и "лмминол - п-І-фенол".

Белок	ААП - п-І-фенол		лмминол - п-І-фенол	
	1мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	10мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	1мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	10мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>
БСА	102	106	98	98
ОВА	110	126	100	103
IgG <sub>чел</sub>	73	35	99	99
неспец. сыворотка	105	114	98	104
IgG <sub>чел</sub> +	105	98	115	147
БСА				
анти-ПХ*	102	225	27	33
поликлон. сыв. к БСА	58	42	57	44
анти-ПХ*+	86	320	32	9
БСА				
поликлон. сыв. к БСА + БСА	68	140	53	51
	%-активности		%-активности	

Примечание: активность указана в % к ее значению для ПХ без белков; анти-ПХ\* - очищена на ДЭАЭ-целлюлозе; белки добавляли в буферный раствор ПХ и выдерживали в течении 1.5 часов при комнатной температуре.

Влияние антител и других белковых молекул зависит от природы окисляемого амина и рН среды. Различие эффектов на окисление двух пар объясняется разными условиями реакции (рН и др.), которые способствуют или препятствуют диссоциации ПХ на апобелок и гем, катализирующий окисление лмминола (рН 9.0), но лишенный каталитической активности в окислении ААП (рН 7.0). Максимальный эффект сохранения активности при избытке Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> наблюдается, когда ПХ взаимодействует со специфическими IgG, которые способны реагировать с большинством антигенных детерминант, БСА усиливает этот эффект.

При окислении пары "лмминол - п-І-фенол" активирующее действие оказывает добавление к ПХ неспецифических IgG<sub>чел</sub> и БСА, которые взаимодействуют с апобелком. Можно предположить, что в данном случае возможен выход гема, который эффективно катализирует окисление лмминола, что подтверждается влиянием специфических АТ к ПХ, оказывающих ингибирующее действие в

этом случае.

Механизмы действия антител на пероксидазное окисление пар субстратов.

Проведены эксперименты по влиянию порядка внесения различных компонентов в реакционную среду, позволяющие определить важность образования иммунного комплекса ПХ с антителами. Если антитела вносятся в реакционную среду через 30 секунд после начала пероксидазной реакции, эффект защиты ПХ от избытка перекиси водорода снижается. Таким образом, необходимо полное образование иммунного комплекса ПХ, которое приводит к активации фермента в 10 раз при  $[H_2O_2] > 2.5$  мМ.

Измерены константы скорости элементарных стадий ( $k_2$  и  $k_3$ ) (см. стр. 11) окисления ААП, люминола и п-И-фенола формами  $E_1$  и  $E_2$  пероксидазы и ее иммунных комплексов. ПолиАТ снижают константы скорости  $k_2$  и  $k_3$  (см. табл. 6).

Таблица 6. Константы скорости  $k_2$  и  $k_3$  элементарных стадий пероксидазного окисления ААП, люминола и п-И-фенола в отсутствие и присутствии полиАТ к ПХ.

Биокатализатор	Субстрат	$10^{-6} k_2, \text{с}^{-1}$	$10^{-4} k_3, \text{с}^{-1}$	Условия реакции
ПХ	ААП	0.85	2.75	pH 7.0
[ПХ+полиАТ]	ААП	0.61	2.40	-//-
ПХ	люминол	2.30	7.20	pH 8.0
ПХ	люминол	0.80	1.20	pH 8.5
[ПХ: полиАТ]	люминол	0.43	0.30	-//-
ПХ	п-И-PhOH	28.10	341	pH 8.5
[ПХ: полиАТ]	п-И-PhOH	10.00	19	-//-
[ПХ+полиАТ]	п-И-PhOH	10.00	-	pH 7.0

Примечание: [ПХ: полиАТ] - пероксидаза связана ковалентно в комплекс с полиАТ; [ПХ+полиАТ] - иммунный комплекс, образованный в растворе.

Можно полагать, что именно с ингибированием реакции 3 (см. схему процесса, стр. 11) связано влияние моноАТ на окисление ААП и п-И-фенола. Такой эффект наблюдается для смесей моноАТ при окислении люминола и п-И-фенола.

Активирующее воздействие антител, как уже понятно, не связано с реакциями 2,2\* и 3,3\*, которые тормозятся антителами, а

объясняется другими причинами.

Главной из них может быть диссоциация ПХ на гем и апобелок, которая сильно возрастает с увеличением концентрации  $H_2O_2$ . При рН 7.0 константа диссоциации ПХ увеличивается в 22 раза с увеличением концентрации  $H_2O_2$  от 5.0 до 50 мМ, что вызывает потерю каталитической активности фермента.

Суммируем возможные факторы, обуславливающие характер влияния антител на совместное окисление аминов и фенолов:

1) При оптимальных концентрациях  $H_2O_2$  антитела ингибируют процесс, что связано с их воздействием на константы скорости реакций  $k_2$  и  $k_3$ , которые снижаются;

2) Активирующее действие антител наблюдается только при избыточных концентрациях  $H_2O_2$ , когда образуется неактивное соединение  $E_3$  и усиливается диссоциация фермента на гем и апобелок;

3) Активирующему действию АТ благоприятствуют все факторы, снижающие диссоциацию ПХ: рН, близкие к 7.0, завершение образования иммунного комплекса [ПХ+полиАТ], природа субстратов - аминов и фенолов;

4) Воздействие АТ на окисление ААП и п-И-фенола (рН 7.0) может быть противоположным их влиянию на окисление пары "люминол - п-И-фенол", так как в последнем случае диссоциация ПХ благоприятна из-за высокой каталитической активности свободного гема в этом процессе;

5) Комплексы [ПХ+полиАТ] намного прочнее комплексов [ПХ+моноАТ] и отличаются по молекулярному составу, что обуславливает их различную способность к освобождению гема;

6) Антитела в большом избытке могут реагировать с активными радикалами, оказывая ингибирующее действие на процесс;

7) Добавление различных по своей природе белков в среду подтверждает выдвинутые выводы.

Гомогенный хемиллюминесцентный ИФА  
иммуноглобулинов G человека.

В гомогенном ИФА активность в растворе измеряется без разделения меченых и немеченых антигенов.

Найдено, что сопряженное пероксидазное окисление луминола и п-И-фенола ингибируется избытком  $H_2O_2$  (50 мМ). Ферментативная



активность конъюгата [ПХ-IgG] при концентрации  $H_2O_2$  (50 мМ) равна 20% от его активности при оптимальной концентрации перекиси водорода (5 мМ). Антитела, специфичные к IgG<sub>чел</sub>, восстанавливают пероксидазную активность до 90% от начального уровня. На основании этого явления был разработан гомогенный ИФА IgG человека.

Получена калибровочная зависимость, которая линейна для концентраций IgG от 50 нМ до 1 мкМ. Предел определения - 50 нМ. Физиологическая концентрация IgG в крови человека - 70 мкМ. Коэффициенты вариации: *intra* - 5.2%, *interassay* - 1.6%, (рис. 2).

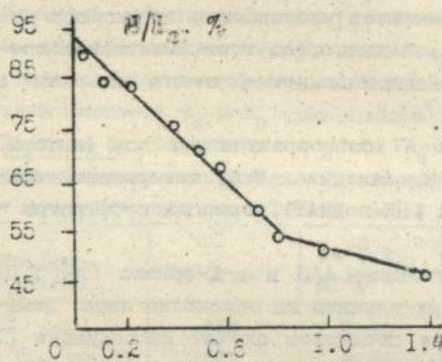


Рис. 2

Калибровочная зависимость гомогенного ИФА IgG человека: 0.5 нМ [ПХ-IgG], анти-IgG - (1:400).

В/В, % - отношение интенсивности хемиллюминесценции в присутствии модулятора к ее величине в отсутствии модулятора.

Принцип гомогенного ИФА IgG<sub>чел</sub> может быть использован для анализа других белковых антигенов.

#### ВЫВОДЫ

1. Пероксидазное деметилирование диметиланилина, 4-аминоантипирина, 4-диметиламиноантипирина, различающихся окружением третичного азота, происходит с невысокими скоростями. Реакционная способность аминов уменьшается в ряду: диметиланилин > 4-диметиламиноантипирин > 4-аминоантипирин.

2. Показано, что при сопряженном пероксидазном окислении пары "4-аминоантипирин - фенол" процесс образования антипирилхинонимина определяется скоростью окисления фенола, в то время как при окислении пары "4-диметиламиноантипирин - фенол" этот процесс лимитируется деметилированием амина.

3. При сопряженном пероксидазном окислении 4-аминоантипирина и фенолов, катализируемом пероксидазой и ее иммунными комплек-

сами, важную роль в механизме реакций играет неферментативная регенерация фенолят-ионов в реакции феноксилов с амином.

4. Методом остановленной струи измерены константы скорости  $k_2$  и  $k_3$  окисления 4-аминоантипирина соединениями  $E_1$  и  $E_2$  пероксидазы и ее иммунного комплекса с поликлональными антителами. Показано, что поликлональные антитела снижают константы скорости элементарных стадий пероксидазного процесса -  $k_2$  и  $k_3$ .

5. Показана корреляция каталитических констант окисления пероксидазой 4-аминоантипирина и галоидзамещенных фенолов с  $\sigma$ -константами Гаммета. Полученное значение  $\rho = 1.15 \pm 0.2$  доказывает аномально высокую реакционную способность галоидфенолов в пероксидажном процессе.

6. Изучено влияние поликлональных и моноклональных антител, специфичных к пероксидазе, на окисление пар субстратов "4-аминоантипирин - фенолы" и "люминол - пара-йодфенол". Показано активирующее действие антител на сопряженное окисление аминов и фенолов в условиях избытка перекиси водорода, которое зависит от значения pH, концентрации антител, природы окисляемого амина и реакционной способности фенолов.

7. Доказано, что увеличение концентрации перекиси водорода сильно повышает константу диссоциации пероксидазы на гем и апобелок в реакции совместного окисления 4-аминоантипирина и фенола.

8. При невысоких и оптимальных концентрациях перекиси водорода влияние антител на пероксидазу носит ингибирующий характер, так как связано с уменьшением констант скорости элементарных стадий взаимодействия соединений  $E_1$  и  $E_2$  с субстратами.

9. Активирующее действие антител на пероксидазу наблюдается только при высоких концентрациях перекиси водорода, когда увеличивается константа диссоциации фермента на гем и апобелок и антитела препятствуют этому процессу.

Активирующему действию антител на пероксидазу благоприятствуют все факторы, снижающие диссоциацию пероксидазы на апофермент и гем (pH, близкие к 7.0, завершение образования иммунных комплексов пероксидазы с поликлональными антителами и природа субстратов - аминов и фенолов).

10. Разработан гомогенный хемилюминесцентный иммунофермент-

ный анализ иммуноглобулинов  $\Theta$  человека на основе явления активации конъюгата "пероксидаза -  $Ig\Theta_{\text{чел}}$ " антителами, специфичными к  $Ig\Theta$ , в реакции окисления пары "луминол - пара-йодфенол" при избытке перекиси водорода. Чувствительность метода - 50 нМ.

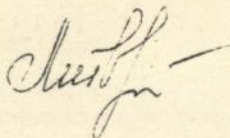
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. Пероксидазное деметилирование некоторых третичных аминов. // Изв. АН БССР., сер хим. наук. -1990. -№5. -С.50-55.
2. Litvinchuk A.V., Savenkova M.I. Peroxidase-catalyzed demethylation of some tertiary amines and their cooxidation with phenol. VIIIth Inter. conferences of young scientists on org. and biol. chemistry. Varna, Bulgaria. -1990. -P.145-147.
3. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. Кинетика сопряженного пероксидазного окисления фенола с 4-аминоантипиринами. // Кинетика и катализ. -1991. -Т.32. -№3. С.535-540.
4. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. Катализируемое пероксидазой сопряженное окисление галоидзамещенных фенолов и 4-аминоантипирин. // Изв. АН БССР. -1991. -№2. -С.75-82.
5. Metelitz D.I., Litvinchuk A.V., Savenkova M.I. Peroxidase-catalyzed co-oxidation of halogen-substituted phenols and 4-aminoantipyrine. // J. Molecular Catalysis. -1991. -V.67. -P.401-411.
6. Литвинчук А.В., Савенкова М.И., Метелица Д.И. Влияние специфичных антител на пероксидазное окисление различных пар субстратов. В сб. Материалов VII Всесоюзного симпозиума по инженерной энзимологии. Москва, -1991. -С.141.
7. Метелица Д.И., Литвинчук А.В., Савенкова М.И. Сопряженное окисление галоидзамещенных фенолов и луминола, катализируемое пероксидазой в присутствии антител против нее. // Биохимия. -1992. -Т.57. -№1. С.103-113.
8. Литвинчук А.В., Метелица Д.И., Савенкова М.И., Чередникова Т.В., Ким Е.Б., Писарев В.В. Влияние моноклональных и поликлональных антител к пероксидазе на сопряженное пероксидазное окисление 4-йодфенола с луминолом и

4-аминоантипирином. // Биохимия. -1992. -Т.57. -№4.  
-С.604-615.

9. Savcnkova M.I., Litvinchuk A.V., Metelitzka D.I. The peroxidase-specific antibodies in the mechanism study of the excess  $H_2O_2$  inhibition of the peroxidase-catalyzed co-oxidation of p-I-phenol with 4-aminoantipyrine (AAP) or luminol. Inter. Symp. "Biotech RIA'92". Genua, Italy. -1992.-P.88.

10. Save nkova M.I., Litvinchuk A.V., Metelitzka D.I. Peroxidase-catalyzed co-oxidation of halogen-substituted phenols with 4-aminoantipyrine or luminol in the presence of the peroxidase-specific antibodies. VIII Inter. Symp. on homogeneous catalysis. Amsterdam, The Netherlands. -1992.-P.256.



Подписано в печать 6.08.93. Формат 60x84/16. Зек.38. Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротапринте Института геологии, геохимии и геофизики АН  
Беларуси. 220141. Минск, ул. Жодинская,7.





AB 36.495