



УДК 577.152.1+577.114.012.6

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОНЪЮГАТОВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ С ДЕКСТРАНАМИ

© 1995 г. А. Н. Еремин, Д. И. Метелица*

Институт биоорганической химии АН Белоруссии, 220141, Минск, ул. Жодинская, 5/2

Поступила в редакцию 30.06.94 г.

С целью оптимизации получения конъюгатов супероксиддисмутазы и каталазы с декстранами, активированными методом периодатного окисления, изучено влияние на каталитическую активность конъюгированных ферментов начальных соотношений $[\text{NaIO}_4]/[\text{декстран}]$, $[\text{фермент}]/[\text{альдегиддекстран}]$ и $[\text{супероксиддисмутаза}]/[\text{каталаза}]$, а также pH и молярности буферных сред, в которых проводится конъюгирование. Показано влияние последовательности связывания ферментов с альдегиддекстранами в биферментных конъюгатах на каталитическую активность каждого из них. Констатировано снижение операционной устойчивости каталазы при ее конъюгировании с альдегиддекстранами совместно с супероксиддисмутазой. Обсуждена проблема взаимного влияния на операционную устойчивость каждого из ферментов в составе биферментных конъюгатов при их использовании в циклических биокаталитических процессах.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, каталаза, соиммобилизация ферментов, альдегиддекстраны, антиоксидантная система, операционная устойчивость ферментов.

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6) и глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9) – компоненты эффективной защитной системы организмов человека и животных от токсичных метаболитов кислорода – его активированных форм, супероксидного аниона, $\text{O}_2^{\cdot-}$, и пероксида водорода [1 - 3]. Одной из важнейших задач современной инженерной энзимологии и биотехнологии является создание антиоксидантных комплексов названных ферментов для их использования в медицинской практике в двух направлениях: 1) приготовление конъюгатов ферментов с водорастворимыми биополимерами для внутреннего применения; 2) конструирование экстракорпоральных ферментных реакторов, заполненных соиммобилизованными ферментами на подходящем носителе, для очистки биологических жидкостей от токсичных агентов ($\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2) при ряде заболеваний и особенно при радиотерапии больных с различными формами патологий [3 - 5].

Практика показала, что наиболее подходящие носители для супероксиддисмутазы и каталазы –

Сокращения: АД15, АД40, АД70 – альдегиддекстраны с мол. массой 15 - 20, 40 и 70 кДа соответственно; E_1 – супероксиддисмутаза; E_2 – каталаза; E_1 -АД – конъюгат супероксиддисмутаза-альдегиддекстран; ЕДА – этилендиамин; РЕИ – полиэтиленгликоль; ОА – овалбумин; АОТ – натриевая соль ди-2-этилгексилевого эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ); буферные растворы: 50 мМ бикарбонатный буфер, pH 9 (А), 50 мМ фосфатный буфер, pH 8 (Б), 10 мМ ацетатный буфер, pH 4.5 (В).

* Автор для переписки.

полисахариды: первый фермент конъюгирован с декстранами [6], второй иммобилизован на формованных ацетил- и фосфоцеллюлозных носителях [7], а вместе ферменты иммобилизованы на декстранах после активации последних известным методом периодатного окисления [8]. При иммобилизации ферментов очень важно сохранение ими максимально высокой активности и термостабильности [9]. В большинстве работ, выполненных до настоящего времени, мало внимания уделяется операционной устойчивости ферментных препаратов, т.е. их стабильности в ходе каталитического процесса в реальных условиях использования. Фактор операционной устойчивости особенно важен для окислительно-восстановительных ферментов.

Активность и стабильность ферментов антиоксидантной системы взаимозависимы [2]: супероксидный анион подавляет активность каталазы и глутатионпероксидазы [2, 10], пероксид водорода вызывает фрагментацию супероксиддисмутазы [11] и инактивирует глутатионпероксидазу; образующийся в результате вторичных реакций гидроксильный радикал HO^{\cdot} эффективно разрушает практически все белки [12, 13].

Показано, что модифицирование ферментов антиоксидантной системы полиэтиленоксидами, полисахаридами, низко- и высокомолекулярными амфифильными соединениями придает им некоторые ценные свойства при использовании их в качестве медицинских препаратов [2, 3, 14].

Совместное введение животным модифицированных супероксиддисмутазы и каталазы усиливает эффективность действия обоих биокатализаторов. В настоящее время созданы антиоксидантные комплексы, содержащие супероксиддисмутазу и каталазу в составе липосом [15]. Эти же ферменты, соиммобилизованные на декстранах, применяются при экспериментальном силикозе легких [8]. Полисахаридные носители для ферментов антиоксидантной системы весьма перспективны, так как позволяют создавать как водорастворимые, так и связанные с твердым носителем препараты.

Цель настоящей работы состояла в оптимизации синтеза конъюгатов супероксиддисмутазы и каталазы с альдегиддекстранами (АД), изучении их кинетических свойств и операционной устойчивости полученных соиммобилизованных ферментов для дальнейшего использования в виде препаратов медицинского назначения. Фундаментальным аспектом работы является поиск путей оптимальной соиммобилизации субъединичных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) и повышения их операционной устойчивости с учетом суицидной природы обоих биокатализаторов.

При исследовании супероксиддисмутазы и ее модифицированных форм большое значение имеет способ определения активности фермента. Поскольку прямые методы связаны с измерением текущей или стационарной концентрации $O_2^{\cdot -}$, присущая им чувствительность ниже, чем чувствительность косвенных химических методов, в которых определяется все количество $O_2^{\cdot -}$, генерированное в ходе реакции [1]. Поэтому в данной работе для определения активности фермента мы использовали косвенный метод, в котором автоокисляющийся эпинефрин (адреналин) является (при pH > 8.5) эффективной ловушкой радикалов $O_2^{\cdot -}$, участвующих в цепном процессе. При автоокислении адреналина образуется адренохром, за накоплением которого следят спектрофотометрически [1, 16], а активность супероксиддисмутазы определяется по ее способности ингибировать реакцию автоокисления.

При синтезе конъюгатов супероксиддисмутазы использовали окисленные альдегиддекстраны [17] с возрастающей молекулярной массой 15 - 20, 40 и 70 кДа. Увеличение концентрации $NaIO_4$ и времени окисления декстранов первоначально приводило к снижению ферментативной активности полученных конъюгатов (рис. 1). Ковалентное связывание супероксиддисмутазы с альдегиддекстраном можно совместить с периодатным окислением декстрана, т.е. одновременно проводить активацию матрицы и взаимодействие белка с ней (рис. 1, 2). В этом случае приходится примерно в 10 раз увеличить концентра-

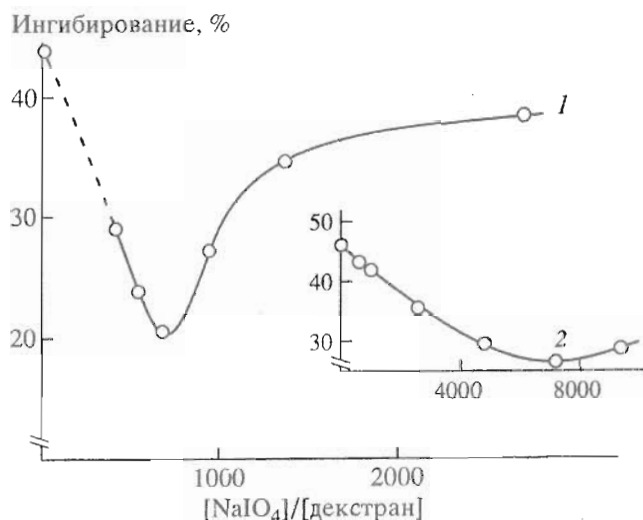


Рис. 1. Ингибирование автоокисления адреналина конъюгатом супероксиддисмутазы (E_1) – АД70 при концентрации E_1 –АД 0.53 (1) и 0.57 мг/мл (2). Условия получения конъюгата: 1 – [декстран] 37.6 – 251 мкМ, $[NaIO_4]$ 0.1 М, инкубация 30 мин, затем добавление фермента в соотношении $[E_1]/[АД] = 2$, инкубация 24 ч; 2 – [декстран] 10 мкМ, $[NaIO_4]$ 5 – 94 мМ, $[E_1]$ 20 мкМ, 2 ч.

цию окислителя по сравнению с условиями для предварительной активации полисахарида (зависимость 1). При дальнейшем увеличении соотношения $[NaIO_4]/[декстран]$ до значений 600 (кривая 1) и 7000 (кривая 2) наблюдался рост ферментативной активности синтезированных конъюгатов. Это, возможно, связано с деструкцией альдегиддекстрана в щелочной среде и снижением молекулярной массы образующихся фрагментов окисленного полисахарида [6]. Действительно, из таблицы следует, что с уменьшением молекулярной

Зависимость степени ингибирования конъюгатами супероксиддисмутазы и каталазы с альдегиддекстранами реакции автоокисления адреналина от состава конъюгатов

Конъюгат (система)	Исходное мольное соотношение компонентов	Ингибирование, %
E_1 –АД15 (I)	1 : 0.5	32.4
E_1 –АД40 (II)	1 : 0.5	27.5
E_1 –АД70 (III)	1 : 0.5	21.1
E_1 –АД15–EDA (IV)	1 : 0.5 : 2500	42.0
E_1 –АД40–EDA (V)	1 : 0.5 : 2500	35.8
E_1 –АД70–EDA (VI)	1 : 0.5 : 2500	27.5
E_1 –АД15– E_2 (VII)	1 : 0.5 : 0.5	52.7
E_1 –АД40– E_2 (VIII)	1 : 0.5 : 0.5	53.0
E_1 –АД70– E_2 (IX)	1 : 0.5 : 0.5	38.1
E_2 –АД15– E_1 (X)	0.5 : 0.5 : 1	56.8
E_2 –АД40– E_1 (XI)	0.5 : 0.5 : 1	56.9
E_2 –АД70– E_1 (XII)	0.5 : 0.5 : 1	56.0

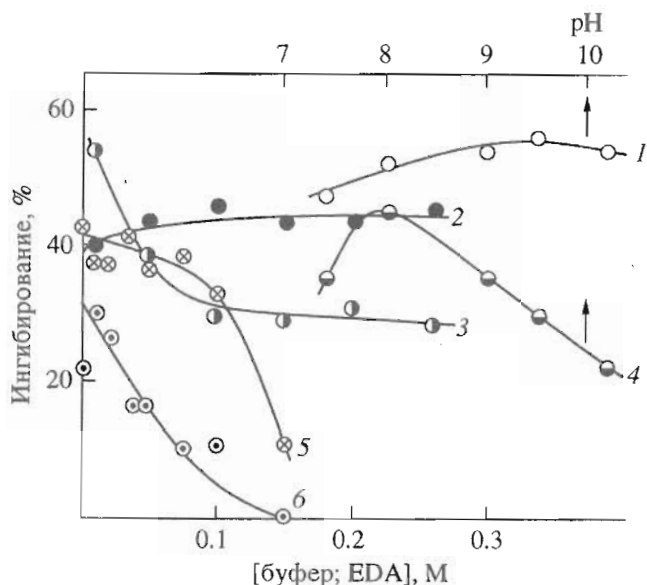


Рис. 2. Влияние условий синтеза конъюгатов (III) (2 - 4) и (VI) (5, 6) на их ингибирующее действие в реакции автоокисления адреналина в сравнении с действием супероксиддисмутазы (1). Условия: $[E_1]/[AD] = 2$; 1, 4 - буфер Б (pH 7.4 - 8.0), буфер А (pH 9.0 - 10.2); 2 - буфер Б; 3, 6 - буфер А; 5 - 0.25 M буфер Б.

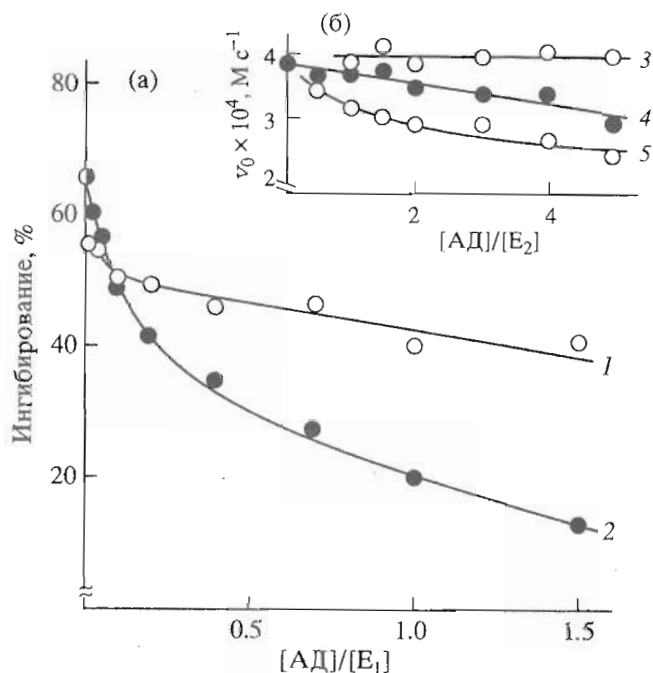


Рис. 3. Влияние соотношения $[AD]/[E]$ и исходной концентрации $NaIO_4$ при синтезе конъюгатов супероксиддисмутазы (а) и каталазы (б) на их активность. а - $[E_1-AD] = 0.53$ мкг/мл, $[E_1] = 5$ мкМ, $[AD] = 0.1 - 7.5$ мкМ, буфер А, $[NaIO_4] = 10$ (1) или 100 (2) мкМ, время реакции 2 ч; б - $[E_2] = 2.6$ мкМ, $[AD] = 0.13 - 1.3$ мкМ, буфер А, [декстран] = 10 мкМ, $[NaIO_4] = 10$ (3), 50 (4) или 100 (5) мкМ, время реакции 2 ч.

массы исходных декстранов активность конъюгатов, полученных на их основе, существенно возрастает (системы I-III), т.е. молекулярная масса ковалентно связанного с ферментом модификатора не должна быть слишком высокой. Эта же закономерность прослеживается для конъюгатов E_1-AD , модифицированных этилендиамином (системы IV-VI), конъюгатов, содержащих наряду с супероксиддисмутазой каталазу (системы VII-IX).

Активность конъюгатов E_1-AD (здесь и далее $AD = AD70$) существенно зависит от значения pH буфера, в котором проводили синтез конъюгата (рис. 2, 4). При $pH < 8$ скорость реакции между свободными аминогруппами белка и альдегидными группами модификатора снижается. Конъюгаты E_1-AD , синтезированные при pH 8, по электрофоретической подвижности практически не отличались от исходного немодифицированного фермента, что свидетельствует о модификации относительно небольшого числа аминогрупп. Существенное снижение активности конъюгата E_1-AD , полученного при pH 10.2, указывает на значительную степень модификации фермента. Учитывая эти данные, в дальнейшем проводили синтез конъюгатов супероксиддисмутазы при pH 9.

Изменение концентрации фосфатного буфера не влияло на активность синтезированных конъюгатов, а увеличение концентрации бикарбонатного буфера снижало их активность (рис. 2, 2, 3). В качестве оптимальной среды при синтезе E_1-AD выбрали 50 мМ буфер А. При модификации конъюгатов аминами емкость буфера оказалась недостаточной; увеличение концентрации буфера частично предотвращало снижение активности E_1-AD (рис. 2, 5, 6).

Изменение начального соотношения $[AD]/[E_1]$ при синтезе конъюгатов сильно влияет на их ферментативную активность [6, 8]. Из рис. 3 видно, что активность конъюгата (III) снижается с увеличением отношения $[AD]/[E_1]$ и числа альдегидных групп в окисленном полисахариде [3, 18]. Каталаза при конъюгировании с активированным декстраном в меньшей степени теряет исходную активность (рис. 3б).

Был проведен двухстадийный синтез конъюгатов. На первой стадии получали конъюгат (III) при соотношении $[AD]/[E_1]$, равном 0.1 (рис. 4, 1, 2) или 0.3 (рис. 4, 3, 4). В этих условиях происходит наложение полисахаридных "сшивок" на глобулу супероксиддисмутазы, сопровождающееся "закреплением" ее конформации, а часть свободных аминогрупп на поверхности белка экранируется [6]. На второй стадии конъюгат (III) модифицировали еще раз высокоокисленным декстраном, полиэтиленмином с молекулярной массой 60 кДа, овальбумином или каталазой (рис. 4). Двухстадийный синтез с высокомолекулярным декстраном имеет некоторые преимущества перед

одностадийным и приводит к повышению каталитической активности фермента в конъюгатах (ср. рис. 3 и 4, 1). Модификация конъюгата (III) полиэтиленимином сильно снижала активность супероксиддисмутазы (рис. 4, 2). Связывание инертного овальбумина не влияло на активность фермента в конъюгате, тогда как связывание каталазы даже при малых отношениях $[E_2]/[E_1]$ повышало активность супероксиддисмутазы в конъюгатах (IX) почти до уровня активности нативного фермента (рис. 4, 4).

Последовательная модификация конъюгата (III) сначала глицином или 1,2-диаминопропаном, а затем высокоокисленным декстраном (2 сут, 20°C) приводила к инаktivации фермента в конъюгате. При сокращении продолжительности синтеза аминопроизводных конъюгатов E_1 -АД наблюдается увеличение их активности. В этом случае модификация свободных альдегидных групп в конъюгате E_1 -АД глицином, лизином, этаноламином, этилендиамином благоприятно влияла на активность фермента (таблица, IV - VI).

При проведении соиммобилизации супероксиддисмутазы и каталазы на декстранах были учтены данные, полученные при ковалентном связывании с полисахаридом каждого из ферментов (рис. 3), а также результаты работы [8]. Получены биферментные конъюгаты E_1 -АД- E_2 (таблица, VII - IX) и более активные конъюгаты E_2 -АД- E_1 (X - XII). Сиятезированные конъюгаты очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-75 или G-150. Электрофоретическая подвижность конъюгатов супероксиддисмутазы и каталазы превышает подвижность немодифицированных ферментов.

На рис. 5 приведены результаты экспериментов по определению каталитической активности супероксиддисмутазы и каталазы в различных препаратах. Конъюгат E_2 -АД- E_1 характеризуется более низкой активностью супероксиддисмутазы, чем конъюгат E_1 -АД- E_2 (рис. 5а, 4 и 5), так как при синтезе этих конъюгатов использованы разные начальные соотношения между ферментами.

Из рис. 5б видно, что каталаза более активна в составе конъюгатов, т.е. соиммобилизация с супероксиддисмутазой повышает каталитическую активность каталазы. Важным фактором эффективности ферментного препарата является устойчивость фермента в реальном биокаталитическом процессе. Было проведено сравнение констант скоростей реакции в трех последовательных циклах с участием свободной каталазы и ее конъюгатов (рис. 6). Из приведенных данных следует, что каталитическая активность каталазы в составе биферментных конъюгатов уменьшается быстрее, чем активность растворенной исходной каталазы. Это позволяет сделать заключение, что

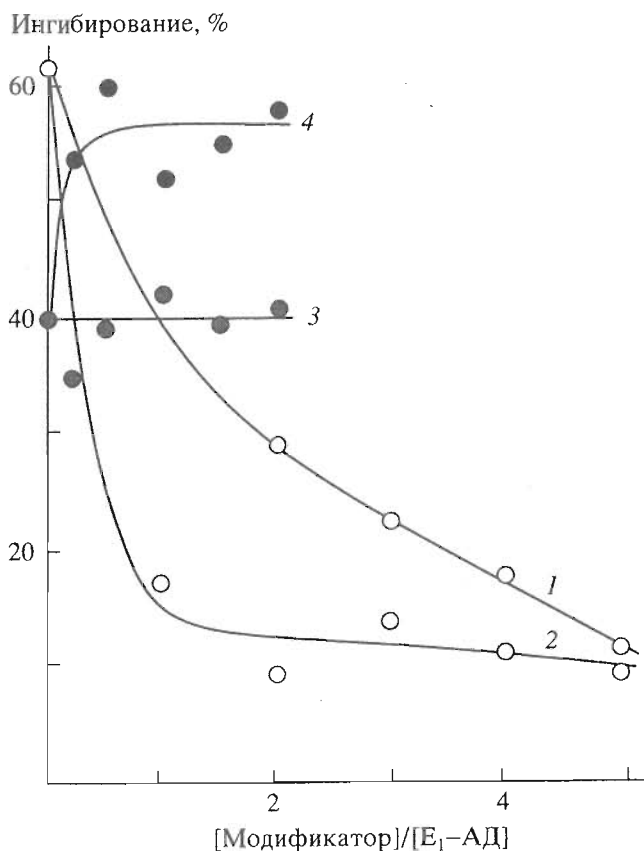


Рис. 4. Ингибирование окисления адреналина конъюгатами (III), модифицированными альдегиддекстраном (III-АД) (1), полиэтиленимином (III-PEI) (2), овальбумином (III-ОА) (3) и каталазой (III- E_2) (4).

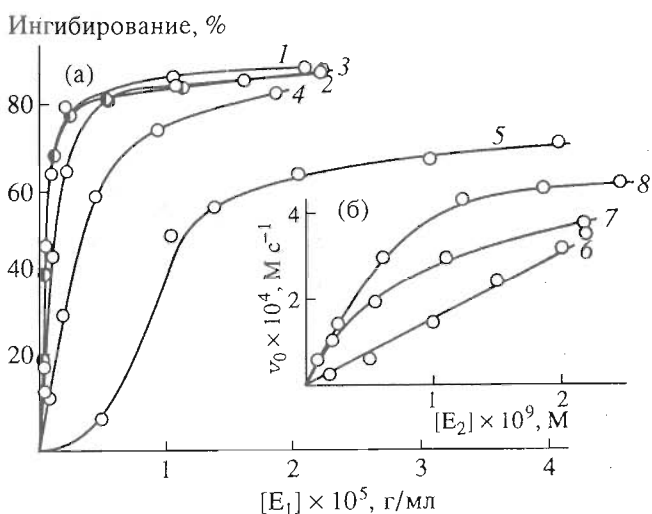


Рис. 5. Зависимость активности супероксиддисмутазы (а) и каталазы (б) от концентрации белка в реакционной смеси. 1 - E_1 , 2 - E_1 -АД, 3 - E_1 -АД-EDA, 4, 7 - E_1 -АД- E_2 , 5, 8 - E_2 -АД- E_1 , 6 - E_2 . Определенные активности см. в "Экспер. части".

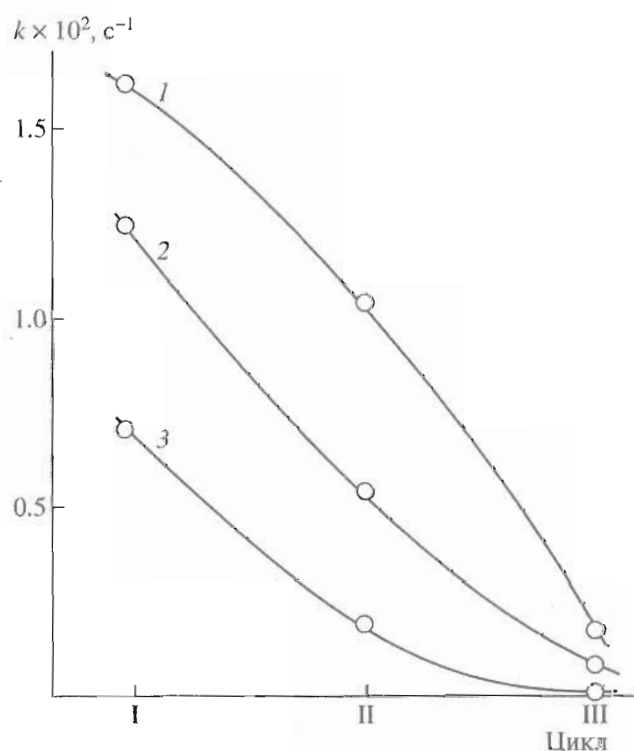


Рис. 6. Изменение активности нативной каталазы (1) и ее конъюгатов E_1 -АД- E_2 (2) и E_2 -АД- E_1 (3) в последовательных циклах (I-III) определения активности. Условия определения: $[E_2] = [\text{конъюгаты}] = 1 \text{ мМ}$, $[H_2O_2] = 50 \text{ мМ}$, 10 мМ буфер Б, pH 7.4 (1, 2) или 8 (3).

соиммобилизация супероксиддисмутазы с каталазой не приводит к увеличению операционной стабильности последней. Известно, что каталаза стабилизирует соиммобилизованную с ней супероксиддисмутазу [19]. Из представленных выше и литературных [3, 6, 8, 19] данных можно сделать два вывода: во-первых, повышение каталитической активности одного из соиммобилизованных ферментов в биферментных конъюгатах не означает, что оно будет сопровождаться повышением его операционной устойчивости; во-вторых, взаимное влияние соиммобилизованных ферментов на операционную устойчивость друг друга может быть разнонаправленным.

Стабилизирующее действие соиммобилизованной каталазы на супероксиддисмутазу вполне понятно: каталаза эффективно расходует пероксид водорода, который может инициировать деструкцию супероксиддисмутазы активными радикалами HO^\bullet и HO_2^\bullet , образующимися на медьсодержащем активном центре супероксиддисмутазы [20]. Снижение операционной стабильности каталазы при ее соиммобилизации с супероксиддисмутазой также может быть связано с действием активных радикалов, ведущим к деструкции обоих ферментов. Следует отметить, что каталаза заметно саморазрушается под влиянием повышенных концен-

траций своего субстрата – пероксида водорода. При $[H_2O_2] > 0.04 \text{ М}$ наблюдается значительное снижение активности растворенной каталазы и ее конъюгатов E_1 -АД- E_2 и E_2 -АД- E_1 . Такое воздействие высоких концентраций пероксида водорода обусловлено возможностью осуществления двух параллельных маршрутов расходования H_2O_2 [20]: продуктивный маршрут процесса включает гетеролитические (двухэлектронные) стадии, а непродуктивный – гомолитические (одноэлектронные) стадии. Как следует из представленных экспериментальных данных, соиммобилизация каталазы и супероксиддисмутазы на одном полимерном носителе снижает операционную стабильность каталазы, т.е. относительная роль второго маршрута процесса (гомолитического распада H_2O_2) возрастает.

Важной задачей повышения операционной устойчивости каталазы, как и других гемсодержащих ферментов (пероксидаз и цитохромов Р-450), является подавление непродуктивных маршрутов процессов и стимулирование продуктивных маршрутов биокаталитических процессов (гетеролитических по своей природе в случае каталазы). Таким образом, решение практической задачи создания биферментных препаратов супероксиддисмутазы и каталазы с высокой операционной устойчивостью связано с фундаментальной проблемой регулирования окислительно-восстановительных процессов с участием оксидоредуктаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали каталазу из печени быка в 30% водном глицерине с 10% этанола (Fluka, Швейцария). Концентрацию каталазы определяли спектрофотометрически по поглощению в максимуме полосы Сорэ ($\epsilon_{405} 324000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [21]). Применяли декстраны с молекулярной массой 15 - 20, 40 и 70 кДа и адреналин (Fluka, Швейцария), метапериодат натрия, глицин, лизин и набор реактивов для диск-электрофореза в ПААГ (Reanal, Венгрия), 1,2-диаминопропан (Loba Chemie, Австрия), кумасси G-250, PEI-600 и AOT (Serva, Германия), сефадексы G-75 и G-150 (Pharmacia, Швеция). Остальные реактивы – отечественного производства.

Выделение и очистку супероксиддисмутазы из гемолизата эритроцитов крови крупного рогатого скота проводили по методикам [16, 22], в которых последняя хроматографическая стадия была заменена экстракцией сопутствующих белков обращенными мицеллами АОТ в гептане. Ацетоновый порошок фракции, содержащей супероксиддисмутазу, суспендировали в 20 мМ буфере Б и диализовали против воды, осадок белка отделяли центрифугированием, а супернатант разбавляли до 1.5 мг/мл белка буфером В, содержавшим 0.3 М NaCl.

Полученный раствор смешивали с 50 мМ АОТ в гептане (35°C, $v/v = 1 : 1$) и интенсивно перемешивали 5 мин при 35°C. Образовавшуюся микроэмульсию центрифугировали 5 мин (5000 об/мин), верхний гептановый и интерфазный слой удаляли. Нижний слой, содержащий супероксиддисмутазу (0.35 - 0.40 мг/мл), концентрировали ультрафильтрацией на РМ-10 (Amicon, США) и диализовали против 30% глицерина. Концентрация фермента в полученном препарате составляла ~86 мкМ. При электрофорезе в ПААГ белок проявляется в виде двух рядом расположенных полос, что характерно для супероксиддисмутазы из эритроцитов крови крупного рогатого скота [23].

Активация декстранов. 0.12 мМ декстран окисляли метапериодатом натрия (0.12 М) в воде (30 мин, 20°C), затем к смеси добавляли 1.6 М этиленгликоль и выдерживали 20 - 30 мин (20°C) для дезактивации непрореагировавшего NaIO_4 .

Ковалентное связывание супероксиддисмутазы с альдегиддекстранами проводили в 50 - 76 мМ буфере А (6 ч, 20°C, $[\text{E}_1]$ 50 мкМ, $[\text{АД}]$ 25 мкМ).

При модификации E_1 -АД этилендиамином смесь, содержащую 42.8 мкМ E_1 -АД и 85.7 мМ EDA в 0.11 М буфере А, выдерживали в течение ночи при 20°C.

Для ковалентного связывания каталазы с E_1 -АД смесь 25 мкМ E_1 -АД и 8.33 мкМ каталазы в буфере А выдерживали в течение ночи при 20°C.

При получении биферментного конъюгата E_2 -АД- E_1 сначала связывали 14.6 мкМ каталазу с 14.6 мкМ АД в буфере А (6 ч, 20°C), а затем к реакционной смеси добавляли равный объем 14.6 мкМ супероксиддисмутазы и выдерживали в течение ночи при 20°C.

Гель-фильтрацию конъюгатов E_1 -АД и E_1 -АД-EDA проводили на сефадексе G-75 (1.2 × 15.5 см), а конъюгатов E_1 -АД- E_2 и E_2 -АД- E_1 - на сефадексе G-150 (1.8 × 13.0 см) в буфере А, содержащем 19.5% глицерин.

Диск-электрофорез в 5% ПААГ конъюгатов, обработанных боргидридом натрия (1.5 мг/мл), проводили при pH 8.9 (1 ч, ток 4.0 - 4.5 мА). Белки окрашивали амидочерным 10В и детектировали по оптическому поглощению при 715 нм.

Концентрацию белков определяли по методу Седмака [24], используя кумасси G-250. Все спектрофотометрические измерения проводили на приборе Specord UV VIS (Германия).

Каталитическую активность супероксиддисмутазы характеризовали по ингибированию ею автоокисления адреналина в щелочной среде [1, 16, 22, 23]. 1.0 мМ адреналин инкубировали в 0.1 М буфере А (pH 10.2) в присутствии 0.53 мкМ супероксиддисмутазы. За накоплением продукта окисления, адренохрома, следили по величине оп-

тического поглощения при 490 нм. Степень ингибирования автоокисления адреналина определяли, сравнивая тангенсы углов наклона начальных участков кинетических кривых накопления адренохрома без фермента и в его присутствии, и выражали в процентах. В отдельных случаях сравнивали величины оптического поглощения растворов через 2 мин реакции с участием фермента и без него.

Каталитическую активность каталазы характеризовали начальными скоростями распада 30 мМ пероксида водорода в 10 мМ буфере Б, pH 7.4, по величине оптического поглощения при 230 нм (ϵ_{230} 72.4 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). При изучении операционной стабильности каталазы определяли константы скорости распада пероксида водорода путем анализа кинетических кривых расходования H_2O_2 .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фридович И. Свободные радикалы в биологии. Т. 1. М.: Мир, 1979. С. 272 - 314.
2. Дубинина Е.Е. // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 108. С. 3 - 18.
3. Максименко А.В. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. С. 351 - 365.
4. Ларионова Н.И., Торчилин В.П. // Введение в прикладную энзимологию. / Ред. И.В. Березин, К. Мартинек. М.: МГУ, 1982. С. 284 - 305.
5. Ларионова Н.И., Торчилин В.П. // Химическая энзимология / Ред. И.В. Березин, К. Мартинек. М.: Изд. МГУ, 1983. С. 115 - 153.
6. Максименко А.В., Григорьева Е.Л., Морозкин А.Д., Тищенко Е.Г., Минковский Е.Б., Торчилин В.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1330 - 1336.
7. Метелица Д.И., Плюгачева Е.И., Ермоленко И.Н., Люблинер И.П., Капуцкий Ф.Н., Праценко В.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. С. 531 - 538.
8. Максименко А.В., Безрукавникова Л.М., Григорьева Е.Л., Тищенко Е.Г., Архипова О.Г., Яглов В.В., Торчилин В.П. // Вопр. мед. химии. 1992. Т. 28. С. 4 - 8.
9. Мартинек К. // Успехи биоорганического катализа. / Ред. И.В. Березин, К. Мартинек. М.: Изд. МГУ, 1979. С. 105 - 157.
10. Fridovich I. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 247. P. 1 - 11.
11. Tomoni O., Naohisa K., Yasaguki K., Naoyuki T. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 18505 - 18510.
12. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. С. 71 - 81.
13. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. С. 442 - 455.
14. Топчиева И.Н. // Хим.-фарм. журн. 1989. Т. 23. С. 719 - 725.

15. Freeman B.A., Turrens G.F., Mirza Z., Crapo J.D., Young S.L. // Fed. Proc. 1985. V. 44. P. 2591 - 2595.
16. McCord J.M., Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 6049 - 6055.
17. Sanderson C.J., Wilson D.V. // Immunology. 1971. V. 20. P. 1061 - 1065.
18. Banci L., Bertini I., Caliceti P., Monsu' Scolaro L., Schiavon O., Veronese F.M. // J. Inorg. Biochem. 1990. V. 39. P. 149 - 150.
19. Турков М.И. // Успехи соврем. биологии. 1976. Т. 81. С. 341 - 354.
20. Метелица Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984.
21. Miyahara T., Takeda A., Hashimori A., Samejima T. // J. Biochem. 1978. V. 84. P. 1267 - 1276.
22. Симо́нян М.А., Налбандян Р.М. // Биохимия. 1975. Т. 40. С. 726 - 732.
23. Fridovich I. // Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. / Ed. O. Hayaishi. N.Y.: Acad. Press, 1974. P. 453 - 477.
24. Sedmak J.J., Grossberg S.E. // Anal. Biochem. 1977. V. 79. P. 544 - 552.

Synthesis and Properties of Conjugates of Superoxide Dismutase and Catalase with Dextrans

A. N. Eremin and D. I. Metelitsa¹

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

Abstract – To optimize obtaining the conjugate of superoxide dismutase and catalase with dextrans activated by periodate oxidation, the effects of the initial ratios $[\text{NaIO}_4]/[\text{dextran}]$, $[\text{enzyme}]/[\text{aldehydedextran}]$, and $[\text{superoxide dismutase}]/[\text{catalase}]$, pH, and the molarity of buffers in which the conjugation occurs on the catalytic activity of conjugated enzymes were studied. The effect of the sequence of binding the enzymes with aldehydedextrans of bienzyme conjugates on the catalytic activity of each was shown. The decreasing operating stability of catalase upon its conjugation with aldehydedextranes together with superoxide dismutase was revealed. The problem of the interference of each enzyme in the bienzyme conjugates in cyclic biocatalytic processes was discussed.

Key words: superoxide dismutase, catalase, coimmobilization of enzymes, aldehydedextrans, antioxidant system, operating stability of enzymes.

¹ To whom correspondence should be addressed.