



УДК 577.152.1.042

## ТИРЕОИДПЕРОКСИДАЗА ЧЕЛОВЕКА: ИНГИБИРОВАНИЕ ОКИСЛЕНИЯ ИОДИД-ИОНА И 3,3',5,5'-ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА ФЕНОЛЬНЫМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

© 2000 г. Е. Э. Гринцевич, В. В. Сенчук\*, А. В. Пучкаев, О. И. Шадыро\*\*, Д. И. Метелица#

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича 5/2, Беларусь;

\* Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск;

\*\* Белорусский государственный университет, химический факультет, Минск

Поступила в редакцию 25.02.2000 г. Принята к печати 18.05.2000 г.

Проведено сравнительное кинетическое исследование ингибирования процессов окисления иона Г поли(дисульфидом галловой кислоты) и окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидаина (ТМВ) 2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутил-*N*-фениланилином (бутаминофеном) с участием тиреоидпероксидазы человека (ТПЧ) и пероксидазы корней хрена (ПХ). Процессы ингибирования охарактеризованы константами ингибирования  $K_i$  и стехиометрическими коэффициентами ингибиторов ( $f$ ), означающими число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле ингибитора. Величины  $K_i$  окисления иодида поли(дисульфидом галловой кислоты) для ТПЧ и ПХ равны 0.60 и 0.04 мкМ, а коэффициенты  $f$  – 13.6 и 16.5, соответственно, что свидетельствует о регенерации полимерного ингибитора и его высокой эффективности. Величины  $K_i$  окисления ТМВ бутаминофеном равны для ТПЧ и ПХ 38 и 46 мкМ, а коэффициенты  $f$ , равные 1.33 и 1.47, свидетельствуют об отсутствии регенерации бутаминофена в этом процессе. Обсуждены механизмы ингибирования процессов окисления иодида и ТМВ с участием двух пероксидаз.

**Ключевые слова:** тиреоидпероксидаза человека; пероксидаза хрена; иодид, окисление; тетраметилбензидин, окисление; поли(дисульфид галловой кислоты); 2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутил-*N*-фениланилин; антиоксиданты.

### ВВЕДЕНИЕ

Тиреоидпероксидаза человека (ТПЧ) играет главную роль в биосинтезе гормонов щитовидной железы, катализируя подирование остатков тирозина с образованием иодтирозидов и иодтирозинов [1, 2]. По данным электрофореза, ТПЧ имеет молекулярную массу около 200 кДа и содержит в качестве простетической группы железопропорфирина IX. Несмотря на важную физиологическую роль окисления иодид-иона и иодирования тирозина с участием ТПЧ, механизм этих реакций изучен недостаточно: остаются нерешенными вопросы субстратной специфичности ТПЧ и количественной характеристики ее активности в окислении иодида и других потенциальных субстратов; отсутствуют систематические

исследования активации и ингибирования ТПЧ, хотя установлено сильное антииреоидное действие полиароматических и фенольных соединений, входящих в состав угля и сланцев [3]. ТПЧ легко подвергается воздействию самых разных ксенобиотиков – анилина и производных мочевины [4], сульфаниламидов, биотрансформация которых приводит к образованию высокотоксичных соединений [5]. Недавно нами показана биотрансформация аминобифенилов с участием солюбилизированной ТПЧ [6].

Практическая целесообразность изучения активации и ингибирования ТПЧ совершенно очевидна. Не менее важными представляются фундаментальные аспекты механизмов регуляции функциональной активности ТПЧ, расшифровать которые можно было бы с использованием ингибиторного анализа и сопоставления количественных параметров действия ингибиторов разной природы на ТПЧ и более изученные пероксидазы, в первую очередь, пероксидазу из корней хрена (ПХ). До сих пор важнейшими проблемами процессов иодирования с участием различных пероксидаз (ТПЧ, лактопероксидаза) остаются свя-

Сокращения: бутаминофен – 2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутил-*N*-фениланилин; poly(DSGA) – поли(дисульфид галловой кислоты); ПХ – пероксидаза хрена; ТПЧ – тиреоидпероксидаза человека; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ЩЖЧ – щитовидная железа человека; IniI – ингибитор радикальных реакций.

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

зывание иодида с пероксидазами, стабильность окисления иодида и механизм этой реакции, роль неферментативных стадий в превращениях иодида, молекулы  $I_2$  и тримера  $I_3$ , а также кинетика и механизм межмолекулярного переноса иода на акцепторы различной химической природы – тирозин, тиронин, 3-иодтирозин, индол, пиррол и многочисленные фенолы [7, 8].

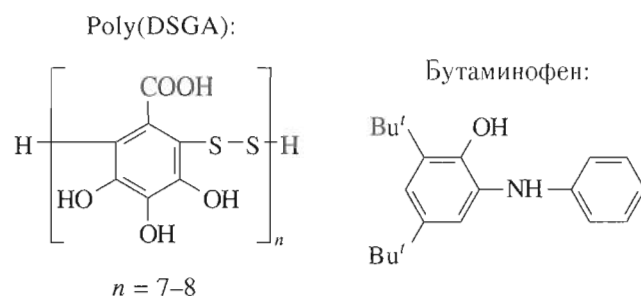
Недавно методами кристаллографического анализа,  $^1H$ - и  $^{127}I$ -ЯМР-спектроскопии изучено связывание иодида с пероксидазой *Arthromyces ramosus* [9]: иод локализуется у входа в доступный канал с дистальной стороны гема и располагается между двумя пептидными сегментами на расстоянии 12.8 Å от гемового железа. Начиная с ранних работ и до сих пор считается, что ион  $I^-$  окисляется по двухэлектронному механизму до иона  $I^+$  (или молекулы  $I_2$ ) [8, 10–12]. В то же время показано, что ароматические амины и разнообразные фенолы связываются с пероксидазами на некотором расстоянии от гемовой группы в гидрофобном канале апофермента, а само пероксидазное окисление ароматических субстратов происходит по одноэлектронному (радикальному) механизму в две стадии: с первой молекулой субстрата реагирует Комплекс I и превращается в Комплекс II, который реагирует со второй молекулой субстрата с регенерацией исходного фермента [7, 10–12].

Таким образом, пероксидазное окисление иодида, с одной стороны, и ароматических субстратов – с другой, происходит по принципиально различным механизмам. По этой причине актуально сопоставление каталитических характеристик пероксидазного окисления  $I^-$  и ароматического амина в аналогичных условиях и ингибирования этих двух процессов одними и теми же антиоксидантами, например замещенными фенолами.

Недавно мы провели сравнительное кинетическое исследование окисления иодида и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) с участием ТПЧ и ПХ и изучили ингибирование этих двух процессов одним и тем же антиоксидантом – пропилгаллатом [13]. Полученные нами данные [13] свидетельствуют о том, что ингибирование пероксидазного окисления иодида и ТМВ пропилгаллатом представляет собой сопряженный процесс превращения субстратов ( $I^-$  или ТМВ) и фенольного ингибитора. При пероксидажном окислении иона  $I^-$  пропилгаллат может иодироваться ферментативным и неферментативным путем, что осложняет интерпретацию полученных данных. Для исключения этих осложнений мы использовали в качестве ингибитора поли(дисульфид галловой кислоты). Молекула этого полимерного ингибитора не имеет свободных положений в ароматических кольцах для атаки иодином-катионом  $I^+$ , атомом

$I^-$  или молекулой  $I_2$ . Кроме того, poly(DSGA) – высокоэффективный ингибитор свободно-радикальных процессов [14] и сильно тормозит пероксидазное окисление ТМВ в разных средах [15, 16] и системах [17–19].

Для расширения круга ингибиторов пероксидазного окисления ТМВ в настоящей работе использован еще один фенольный антиоксидант – бутаминофен, обнаруживший высокую эффективность при торможении перекисного окисления липидов в общем гомогенате мозга крыс, намного превосходящую антирадикальную активность таких известных антиоксидантов, как природный  $\alpha$ -токоферол и синтетический ионол (2,6-ди-*tert*-бутил-4-метилфенол) [20, 21].



Цель настоящей работы – сравнительное кинетическое изучение ингибирующих свойств поли(дисульфида галловой кислоты) в окислении иона  $I^-$ , бутаминофена – в окислении тетраметилбензидина с участием ТПЧ и ПХ в сопоставимых условиях. Главными количественными параметрами ингибирующей активности антиоксидантов в обоих процессах были константы ингибирования  $K_i$  и стехиометрический коэффициент ингибирования  $f$ , означающий число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле ингибитора. Определение  $f$  и  $K_i$  описано в “Эксперимент. части”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Ингибирование окисления иодид-иона поли(дисульфидом галловой кислоты).** На рис. 1а представлены кинетические кривые накопления продукта окисления иодида (в терминах оптического поглощения  $I_3^-$ ) в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии возрастающих концентраций poly(DSGA) (2–7) при катализе процесса ТПЧ (1 мкМ). Видно, что при возрастающих концентрациях ингибитора проявляется период индукции в образовании продукта окисления иодида, а сам ингибитор отличается высокой эффективностью, так как при концентрациях 0.1–1.2 мкМ сильно тормозит, а при больших концентрациях полностью останавливает окисление 1.0 мМ иодид-иона.

В соответствии с теорией метода ингибиторов свободно-радикальных реакций в жидкой фазе



акад. Н.М. Эмануэля и сотр. [22–24], между продолжительностью периода индукции  $\Delta t$  и растущей концентрацией ингибитора наблюдается четкая прямопропорциональная зависимость (рис. 1б), из которой, как описано в “Эксперимент. части”, вычислена величина  $v_i/f$  ( $3.63 \times 10^{-9} \text{ M c}^{-1}$ ), где  $v_i$  – скорость инициирования радикалов при стационарном протекании процесса в системе ТПЧ– $\text{H}_2\text{O}_2$ – $\text{I}^-$ – $\text{InH}$ . Сопоставляя эту величину с начальной скоростью окисления иодида в отсутствие ингибитора ( $v_0$   $4.93 \times 10^{-8} \text{ M c}^{-1}$ , см. таблицу) легко получить значение коэффициента  $f$ , которое соответствует числу радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле poly(DSGA) – 13–14. Полученная величина  $f$  подтверждает высокую эффективность полимерного ингибитора в пероксидазном окислении иона  $\text{I}^-$ , которая еще более высока при окислении ТМВ с участием ПХ (таблица).

Аналогичный анализ кинетических кривых накопления  $\text{I}_3^-$  для процесса, катализируемого ПХ (рис. 2), показывает, что ингибитор в концентрациях 0.1 – 0.4 мкМ подавляет процесс, а зависимость между концентрацией poly(DSGA) и продолжительностью периода индукции нелинейна, что свидетельствует о сложном влиянии на фермент высоких концентраций ингибитора и продуктов его трансформации. Оценку  $f$  можно сделать только для узких интервалов концентраций ингибитора: при концентрации  $\text{InH}$ , равной 0.3–0.4 мкМ, по данным рис. 2б,  $v_i/f$  равна  $0.025 \times 10^{-7} \text{ M c}^{-1}$ , а так как  $v_0 = 2.97 \times 10^{-7} \text{ M c}^{-1}$ , коэффициент  $f$  равен 118.8, т. е. аномально велик. При концентрации  $[\text{InH}] < 0.2 \text{ мкМ}$   $v_i/f = 0.18 \times 10^{-7} \text{ M c}^{-1}$  и  $f = 16.5$ .

Очень важно, в какой степени меняется скорость окисления иона  $\text{I}^-$  после израсходования ингибитора, т.е. после завершения периода индукции (рис: 1 и 2). На рис. 3а представлена зависимость  $v/v_0$  от соотношения концентраций poly(DSGA) и ТПЧ, где  $v$  – начальная скорость ингибированной реакции после периода индукции: видно, что с увеличением соотношения  $[\text{InH}]/[\text{белок}]$  величина  $v/v_0$  монотонно снижается. На рис. 3б та же зависимость в координатах Диксона [25] представляет собой два линейных участка, разделенных точкой излома, приходящейся на концентрацию ингибитора ~1 мкМ. Такая зависимость может означать, что poly(DSGA) связывается с ТПЧ по двум центрам, отличающимся сродством к полимерному ингибитору. Легко показать, что в случае обратимого конкурентного ингибирования величина отрезка  $[\text{InH}]^*$ , отсекаемого на оси абсцисс прямой линии

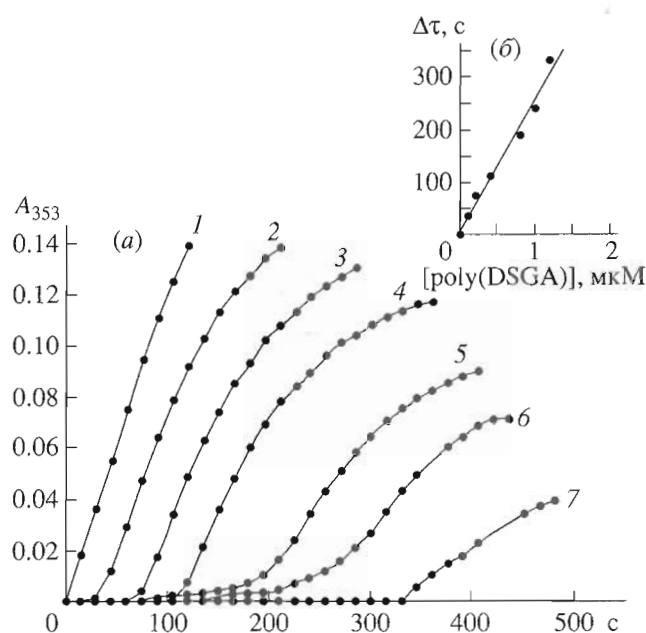


Рис. 1. Кинетические кривые образования продукта окисления иодида пероксидом водорода при участии ТПЧ (а) и зависимость периода индукции  $\Delta t$  от концентрации poly(DSGA) (б). Условия: буфер А, 25°C, 1 мМ ТПЧ, 1 мМ иодид, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $[\text{poly(DSGA)}] = 0$  (1), 0.1 (2), 0.2 (3), 0.4 (4), 0.8 (5), 1.0 (6) и 1.2 (7) мкМ.

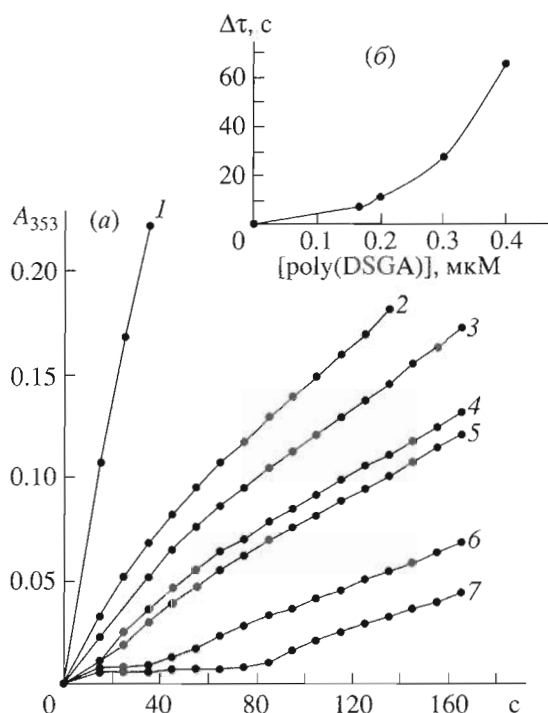


Рис. 2. Кинетические кривые образования продукта окисления иодида пероксидом водорода при участии ПХ (а) и зависимость периода индукции  $\Delta t$  от концентрации poly(DSGA) (б). Условия: буфер А, 25°C, 10 нМ ПХ, 1 мМ иодид, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $[\text{poly(DSGA)}] = 0$  (1), 0.1 (2), 0.13 (3), 0.167 (4), 0.2 (5), 0.3 (6) и 0.4 (7) мкМ.

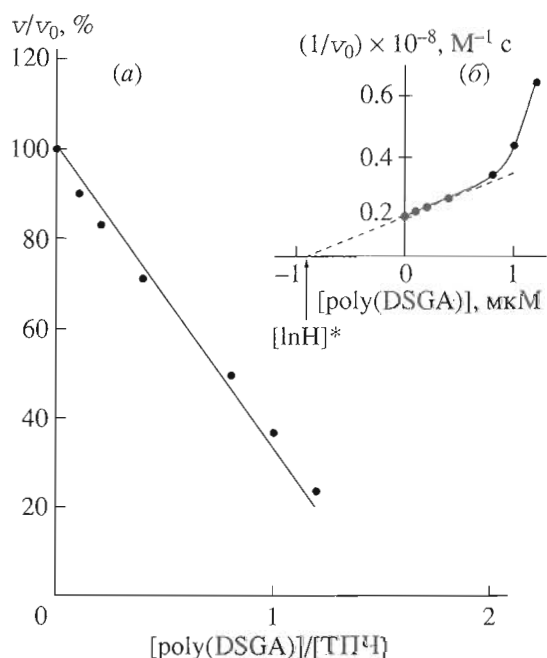


Рис. 3. Зависимости относительной скорости окисления  $\Gamma^-$  от соотношения  $[\text{poly(DSGA)}]/[\text{ТПЧ}]$  (а) и обратной величины начальной скорости окисления иодида от концентрации ингибитора (б). Условия: буфер А, 25°C, 1 мкМ ТПЧ, 1 мМ KI и 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

ей в координатах Диксона, связана с константой ингибирования  $K_i$  соотношением (I) [25]:

$$[\ln H]^* = K_i([S]/K_m + 1), \quad (\text{I})$$

где  $[S]$  – концентрация субстрата, а  $K_m$  – константа Михаэлиса в отсутствие ингибитора. С учетом то-

го, что концентрация ингибитора в эксперименте (рис. 3) составляла 1 мМ, а  $K_m = 1.91$  мМ [13], из соотношения (I) получена  $K_i$ , равная 0.6 мкМ, что подтверждает высокую эффективность ингибирующего действия  $\text{poly(DSGA)}$  в окислении иона  $\Gamma^-$  с участием ТПЧ.

Результаты аналогичных экспериментов в присутствии ПХ представлены на рис. 4. Рассчитанное из соотношения (I) значение  $K_i$  составило 0.04 мкМ (при  $K_m = 2.97$  мМ [13]). Таким образом, в сопоставимых условиях  $\text{poly(DSGA)}$  является более эффективным ингибитором окисления иона  $\Gamma^-$  при катализе реакции ПХ, чем при катализе ТПЧ.

Как следует из таблицы, аналог мономерного звена  $\text{poly(DSGA)}$  – пропилгаллат в процессах окисления иодида с участием обеих пероксидаз характеризуется меньшей ингибирующей эффективностью, чем полимерный ингибитор. Следует обратить внимание на различие операционной стабильности ТПЧ и ПХ при окислении  $\Gamma^-$  в присутствии  $\text{poly(DSGA)}$ : при соотношении  $[\ln H]/[\text{белок}]$ , равном 1 : 1, ТПЧ теряет 64% исходной активности, а ПХ – только 12% (рис. 3а и 4а). Таким образом, в одинаковых условиях, несмотря на большую молекулярную массу, ТПЧ более лабильна, чем ПХ.

Комплексообразование поли(дисульфида галловой кислоты) с ТПЧ и ПХ наглядно показано нами в данной работе. Ранее в нашей лаборатории методом тушения флуоресценции доказано взаимодействие  $\text{poly(DSGA)}$  с бычьим сывороточным

Кинетические параметры ингибирования окисления иодид-иона и 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) с участием тиреоидпероксидазы человека и пероксидазы хрена

Ингибитор	Фермент	$v_0 \times 10^7, \text{M} \text{c}^{-1}$	$(v_i/f) \times 10^7, \text{M} \text{c}^{-1}$	$K_i, \text{мкМ}$	$f$	Литература
Пероксидазное окисление иодид-иона (25°C)						
Пропилгаллат	ТПЧ	1.13	1.210	0.90	0.93	[13]
Пропилгаллат	ПХ	2.90	0.700		4.14	[13]
$\text{Poly(DSGA)}$	ТПЧ	0.49	0.036	0.60	13.60	Данная работа
$\text{Poly(DSGA)}$	ПХ	2.97	0.180	0.04	16.50	
Пероксидазное окисление ТМВ* (20°C)						
Бутаминофен	ТПЧ	0.44	0.33	38.00	1.33	Данная работа
Бутаминофен	ПХ	2.22	1.51	46.00	1.47	
Пропилгаллат	ТПЧ	2.36	1.76	3.90	1.34	[13]
Пропилгаллат	ПХ	6.50	5.00	42.00	1.30	[13]
Галловая кислота	ПХ	18.24	5.70	13.30	3.20	[32]
$\text{Poly(DSGA)}$	ПХ	16.40	0.46	1.30	35.60	[15]
ANP	ПХ	8.34	26.0	160.00	0.32	[31]
$\text{Poly(ADSNP)}$	ПХ	10.72	4.00	18.00	2.68	[31]

Условные сокращения: ANP – 2-амино-4-нитрофенол;  $\text{poly(ADSNP)}$  – поли(2-аминодисульфид-4-нитрофенол).

\* При пероксидазном окислении ТМВ величины  $v_0$  удвоены, так как на образование спектрально детектируемого продукта реакции окисления ТМВ расходуется два катион-радикала  $\text{TMB}^{+\cdot}$  [30].

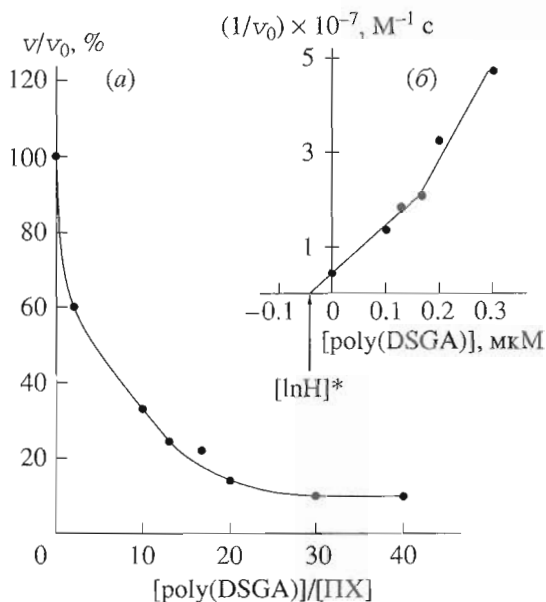


Рис. 4. Зависимости относительной скорости окисления  $\Gamma^-$  от соотношения  $[\text{poly(DSGA)}]/[\text{PIX}]$  (а) и обратной величины начальной скорости окисления иодида от концентрации ингибитора (б). Условия: см. подпись к рис. 3;  $[\text{PIX}]$  10 нМ.

альбумином [26] и сывороточным альбумином человека. Прямое взаимодействие  $\text{poly(DSGA)}$  с каталазой изучено методом КД в дальней УФ-области и доказано изменением вторичной структуры каталазы при ее взаимодействии с полимерным антиоксидантом [27, 28].

Из спектров КД пероксидаз в УФ-области (200–260 нм) в отсутствие  $\text{InH}$  и в его присутствии (рис. 5) видно, что при соотношениях  $[\text{PIX}]/[\text{InH}]$  1 : 2.5 (а) и  $[\text{ТПЧ}]/[\text{InH}]$  1 : 1.25 (б) наблюдаются изменения молярной эллиптичности обоих белков. Изменения вторичной структуры обоих пероксидаз в присутствии  $\text{poly(DSGA)}$  анализировали с помощью программного обеспечения для обчета спектров КД [29] как описано в “Эксперимент. части”. Результаты обчета показывают, что в случае ПХ наблюдается некоторое уменьшение содержания  $\alpha$ -спиральных участков (~3%). Таким образом, прямое взаимодействие поли(дисульфида галловой кислоты) с пероксидазами приводит к нарушениям вторичной структуры обоих белков (рис. 5), что не может не сказаться на их каталитической активности. Это подтверждается сильным снижением скоростей окисления ионов  $\Gamma^-$  после окончания периодов индукции, вы-

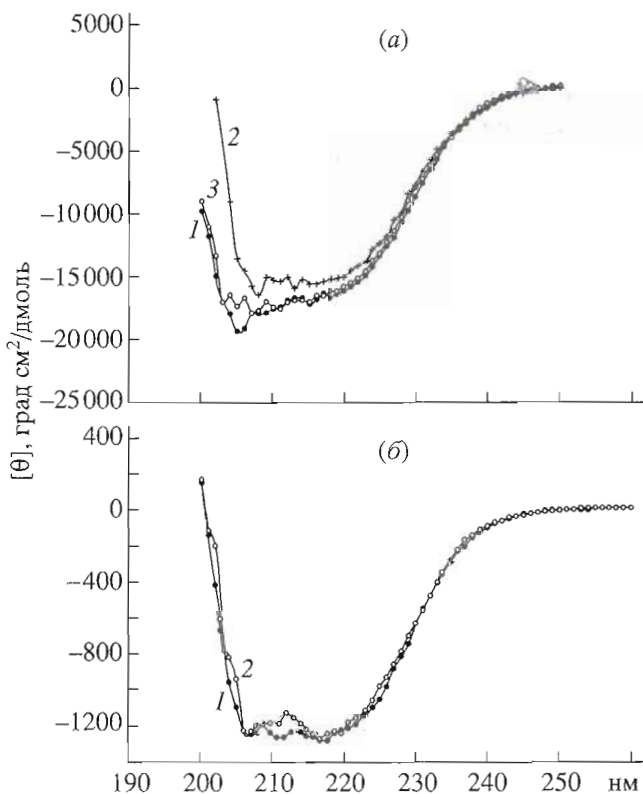


Рис. 5. Спектры КД ПХ (8.1  $\mu\text{M}$ ) (а) и ТПЧ (28.9  $\mu\text{M}$ ) (б) в отсутствие  $\text{poly(DSGA)}$  (1) и в его присутствии в концентрации 20.9 (2) или 2.38  $\mu\text{M}$  (3). Условия см. в “Эксперимент. части”.

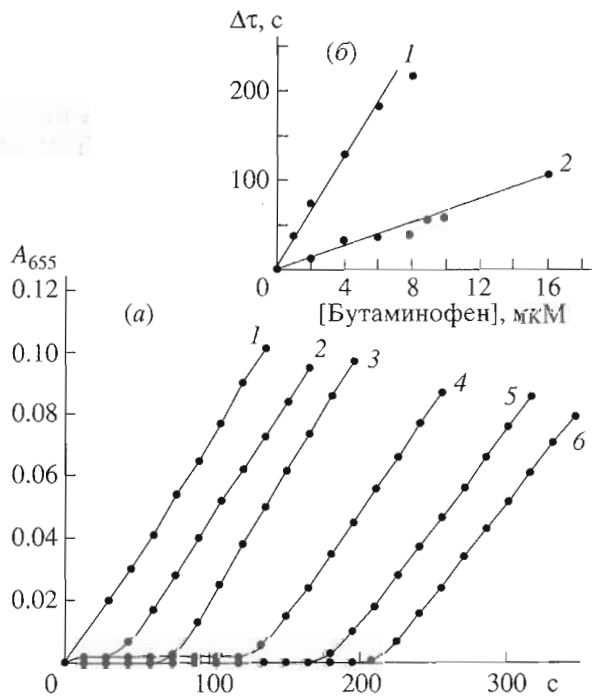


Рис. 6. Кинетические кривые образования продукта окисления ТМВ пероксидом водорода при участии 0.5  $\mu\text{M}$  ТПЧ без бутаминофена и в его присутствии (а) и зависимость периода индукции  $\Delta t$  в накоплении продукта окисления ТМВ при участии 0.5  $\mu\text{M}$  ТПЧ (1) и 0.15 нМ ПХ (2) от концентрации бутаминофена (б). Условия: буфер Б, 10% DMF, 20°C, 0.2 мМ ТМВ, 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $[\text{бутаминофен}]$  (а) 0 (1), 1 (2), 2 (3), 4 (4), 6 (5), 8  $\mu\text{M}$  (6).

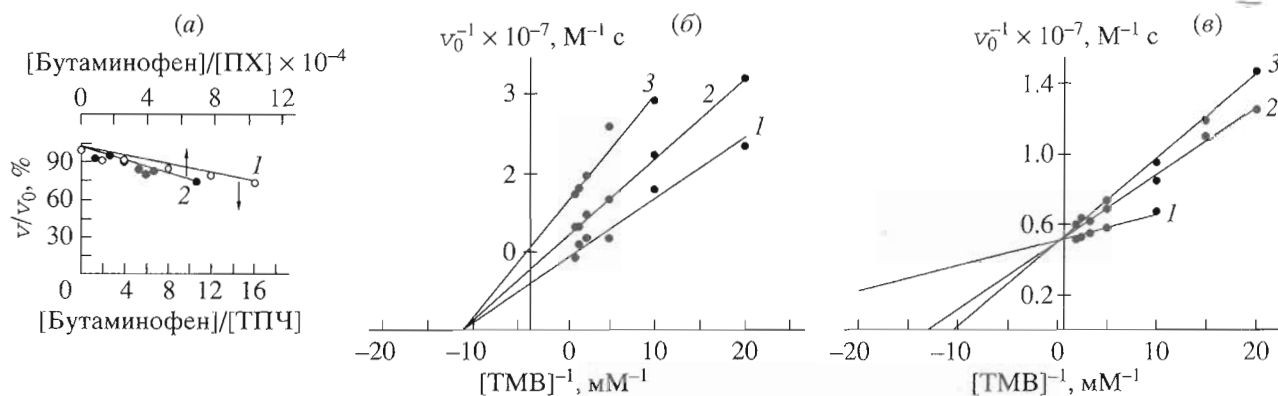


Рис. 7. Зависимость относительной скорости окисления ТМВ от соотношения [бутаминофен]/[ТПЧ] (1) и [бутаминофен]/[ПХ] (2) (а) и зависимость начальной скорости окисления ТМВ в присутствии ТПЧ (б) или ПХ (в) от его концентрации в координатах Лайнуивера–Берка. Условия: буфер Б, 10% DMF, 20°C, 0.5 мкМ ТПЧ (а, б), 0.15 нМ ПХ (а, в), 0.2 М ТМВ, 1 мМ  $H_2O_2$ , [бутаминофен] – 0 (1), 13.3 (2) и 20 мкМ (3) (б, в).

званных присутствием и расходом  $InH$  в ходе пероксидазных процессов (рис. 3, 4).

**Ингибирование бутаминофеном окисления ТМВ с участием ТПЧ и ПХ.** Как показано нами ранее [13], кинетические параметры окисления  $I^-$  и ТМВ в присутствии ТПЧ соизмеримы, но эффективность фермента в терминах  $k_{cat}/K_m$  при окислении ТМВ в ~35 раз выше, чем при окислении  $I^-$ ; в случае ПХ  $k_{cat}$  окисления ТМВ в ~25 раз выше, чем  $k_{cat}$  окисления иодида. Пропилгаллат ингибирует все четыре процесса, причем наиболее эффективно окисление  $I^-$  с участием ТПЧ ( $K_i$  0.90 мкМ,  $f$  0.93) (таблица).

На рис. 6а показаны кинетические кривые накопления продукта окисления ТМВ при действии ТПЧ в отсутствие бутаминофена (1) и в его присутствии в возрастающих концентрациях (2–6). Процесс характеризуется наличием периодов индукции, продолжительность которых пропорциональна начальной концентрации ингибитора (рис. 6б, 1). По данным рис. 6а, вычислена величина  $v_0$ , равная  $0.22 \times 10^{-7} M s^{-1}$ , которую для расчета коэффициента  $f$  необходимо удвоить, так как на образование одной молекулы продукта окисления ТМВ расходуется два катион-радикала  $TMB^{\cdot+}$  [30]. Сопоставляя скорость иницирования радикалов  $v_i/f$ , вычисленную по данным рис. 6б ( $0.33 \times 10^{-7} M s^{-1}$ ) с удвоенной  $v_0$ , получаем коэффициент  $f$ , равный 1.33, т. е. с одной молекулой бутаминофена в условиях процесса реагирует 1–2 радикала.

Результаты аналогичных экспериментов с участием ПХ (рис. 6б, 2) позволяют рассчитать величину  $f$ , равную 1.47 (удвоенная  $v_0 = 1.11 \times 10^{-7} M s^{-1}$ ) (таблица), т. е. стехиометрический коэффициент

бутаминофена в процессе окисления ТМВ с участием обеих пероксидаз мало отличается.

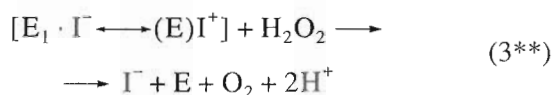
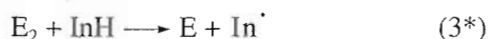
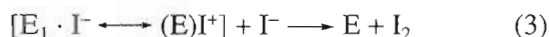
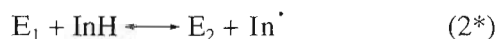
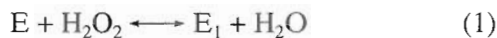
Из рис. 7а следует, что ТПЧ теряет около 25% начальной активности (зависимость 1) при соотношении  $[InH]/[белок]$ , равном 15 : 1, в то время как ПХ теряет 25% начальной активности только при соотношении  $[InH]/[белок]$ , равном 90000 : 1 (зависимость 2), т. е. в этом случае концентрация  $InH \gg [ПХ]$  (более чем на 4 порядка). Таким образом из рис. 7а очевидно, что ТПЧ во много раз более лабильна при взаимодействии с бутаминофеном и продуктами его трансформации, чем ПХ в тех же условиях. На основании данных по ингибированию ТПЧ (рис. 7б) и ПХ (рис. 7в), оценены константы ингибирования бутаминофена, равные 38 и 46 мкМ соответственно (таблица).

Полученные нами экспериментальные результаты по ингибированию процессов пероксидазного окисления иона  $I^-$  поли(дисульфидом галловой кислоты) и окисления ТМВ бутаминофеном и пропилгаллатом [13], а также имеющиеся литературные данные о пероксидажном окислении иодида [7–13], ингибирующем действии фенольных соединений на пероксидазные процессы [15, 16, 31–35] и механизме пероксидазного катализа [7–12, 33, 36, 37] позволяют обсудить общую схему ингибирования пероксидазного окисления иодида, в которой приняты следующие условные обозначения:  $E$  – пероксидазы,  $E_1$  и  $E_2$  – Комплексы I и II пероксидаз,  $InH$  – ингибитор радикальных реакций фенольной или аминной природы,  $PhOH$  – фенолы,  $AmNH_2$  – ароматические амины,  $P_1$  – продукт пероксидазного окисления иодида ( $I_3^-$ ),  $P_2$  – продукт пероксидазного окисления ингибитора (фенола или ароматического амина). Схема содержит ферментативные и неферментативные

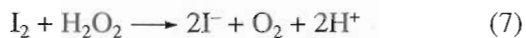
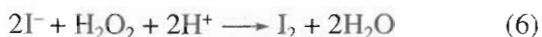
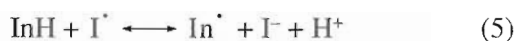
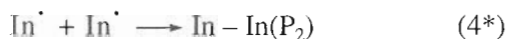
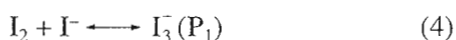


стадии окисления  $I^-$ ,  $AmNH_2$  и  $InH$  пероксидом водорода.

ОБЩАЯ СХЕМА ИНГИБИРОВАННОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ИОНА  $I^-$  И ТМВ  
ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СТАДИИ



НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СТАДИИ



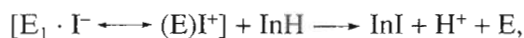
ТПЧ, ПХ и другие пероксидазы по реакции (1) с высокой скоростью образуют пероксидные комплексы ( $k_1 \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), которые распадаются по гетеролитическому механизму на воду и Комплекс I, являющийся сильным окисляющим агентом [7, 10, 37, 38]. Комплекс I реагирует по радикальному механизму со многими восстановителями, в числе которых фенолы и ароматические амины (реакция  $2^*$ ). Комплекс II ( $E_2$ ) по радикальному механизму реагирует со второй молекулой амина или фенола по реакции ( $3^*$ ). Последовательность реакций (1,  $2^*$ ,  $3^*$ ) доказана для подавляющего числа субстратов пероксидаз и называется классической схемой Чанса [39].

Особенность окисления иодида с участием ПХ, ТПЧ и некоторых других пероксидаз состоит в том, что по реакции (2) с высокой скоростью образуется комплекс  $[E_1 \cdot I^- \rightleftharpoons (E)I^+]$ , в котором происходит двухэлектронное окисление иодида, в результате чего возникает высокорекреационно-способный, связанный с ферментом иодиниум-катион, который, как сильный электрофильный агент, реагирует с другим ионом  $I^-$  по реакции (3) и распадается с образованием продукта окисле-

ния – молекулы  $I_2$  и регенерированной формы фермента [8, 11, 12, 35, 38, 40]. В ранних работах [11, 38] считалось, что по классической схеме Чанса, т.е. по радикальному механизму, окисляется только 2% ионов  $I^-$ , а 98% иодида превращаются по двухэлектронному механизму (реакции 2 и 3). В настоящее время ясно, что это соотношение сильно зависит от pH среды.

Как следует из приведенной выше схемы ингибированного окисления  $I^-$ , сложный процесс из последовательно-параллельных реакций представляет собой сопряженное пероксидазное окисление иодида и ингибитора ( $InH$ ). В ферментативной стадии этого процесса  $InH$  конкурирует с ионом  $I^-$  за Комплекс I ( $E_1$ ) по реакциям 2 и  $2^*$ . Иодиниум-катион по реакции (3) со вторым ионом  $I^-$  образует продукт окисления  $I_2$ , а по реакции ( $3^{**}$ ) разлагает пероксид водорода по псевдокатализному механизму [8], который реализуется при высоких концентрациях  $H_2O_2$  и приводит к непродуктивному расходованию окислителя. По этой причине мы использовали в экспериментах максимально низкие концентрации  $H_2O_2$  (1 мМ).

Очень важно отметить, что при использовании в качестве ингибитора  $poly(DSGA)$  из-за особенностей его структуры в ферментативных стадиях процесса полностью исключена реакция иодирования ингибитора иодиниум-катионом, возможная для многих ингибиторов ароматической природы:



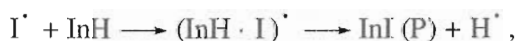
где  $InI$  – продукт иодирования ингибитора.

Большую роль в пероксидазном окислении  $I^-$ , а значит и в его сопряженном окислении с  $InH$  играют неферментативные стадии процесса. При достаточной и избыточных концентрациях  $I^-$  главным продуктом является тример  $I_3^-$ , образующийся по реакции (4): константа этого равновесия равна  $714 \text{ M}^{-1}$  [8, 41, 42], т. е. спектральная регистрация  $I_3^-$  полно и адекватно характеризует образование продуктов окисления иодида. По реакции рекомбинации радикалов ингибитора образуется продукт его окисления (реакция  $4^*$ ). В случае окисления ТМВ спектрально детектируемый продукт представляет собой образование “сэндвичевого” типа из двух катион-радикалов  $TMB^{\cdot+}$  [30]. Очень важная роль принадлежит обратимой обменной реакции (5): в случае, если эта реакция идет слева направо, она обеспечивает регенерацию окисленного иона  $I^-$ , которая происходит, пока полностью не израсходуется ингибитор  $InH$ . Можно считать, что именно эта реакция, если она идет справа налево, обеспечивает регенерацию

ингибитора и объясняет высокие значения стехиометрических коэффициентов  $f \gg 1$ , полученные при окислении Г с участием ТПЧ и ПХ для поли(дисульфида галловой кислоты) и с участием ПХ для пропилгаллата (таблица).

При высоких концентрациях  $H_2O_2$  и Г могут стать существенными неферментативные реакции (6) и (7), которые в совокупности представляют собой катализированной системой Г/ $I_2$  непродуктивный распад пероксида водорода по псевдокаталазному маршруту с образованием  $H_2O$  и  $O_2$  [43]. Однако в присутствии обеих пероксидаз и при малых концентрациях  $H_2O_2$  роль неферментативных реакций (6) и (7) относительно невелика.

Из-за структурных особенностей поли(дисульфида галловой кислоты) невозможны неферментативные реакции его иодирования атомом иода ( $I^{\cdot}$ ) и молекулой  $I_2$ , которые вполне могут происходить с другими ароматическими InH:



Ингибированное бутаминофеном пероксидазное окисление ТМВ должно быть рассмотрено как сопряженный процесс окисления ароматического амина ( $AmNH_2$ ) и фенола ( $PhOH$ ). Схема сопряженного окисления двух ароматических субстратов с участием ПХ детально обоснована и проанализирована в нашей лаборатории ранее [15, 16, 31, 32]: доказано, что пероксидазное окисление ТМВ по конкурентному механизму ингибируется галловой кислотой [32], ее полидисульфидом [15, 16], 2-амино-4-нитрофенолом и его полидисульфидом [31], а также пропилгаллатом [13]. При окислении ТМВ с участием ТПЧ пропилгаллат обнаруживает смешанный тип ингибирования и ингибирующую эффективность более чем в 10 раз превышающую ее уровень для ПХ [13] (таблица). К сожалению, детальное обсуждение связывания ТМВ, бутаминофена и пропилгаллата с ТПЧ в настоящее время невозможно, так как сведений о структуре ТПЧ и ее свойствах недостаточно, однако взаимодействие ПХ с ароматическими субстратами может быть рассмотрено более конкретно, так как прогресс в области белковой инженерии и расшифровки третичных структур пероксидаз растений в последние годы [36, 44, 45] дал возможность детализировать молекулярный механизм элементарных стадий пероксидазного процесса.

В случае ПХ доказано непосредственное участие в связывании и гетеролизе  $H_2O_2$  дистального гистидина-42 [46] и дистального аргинина-38 [47] по реакции (1). Ясно, что бутаминофен, как и дру-

гие фенольные ингибиторы [15, 16, 31, 32], никак не могут повлиять на первую реакцию пероксидазного процесса. Доступ субстратов и/или ингибиторов в дистальную область пероксидаз осуществляется через канал, размеры которого могут лимитировать этот процесс: в случае ПХ в формировании канала участвует последовательность 138-LPAPFF-143, которая влияет на субстратную специфичность фермента [48, 49]. Бутаминофен и ТМВ, как и другие соединения ароматической природы (пропилгаллат и поли(дисульфид галловой кислоты)), конкурируют друг с другом за связывание с ТПЧ и ПХ в дистальной области, что определяет конкурентный тип ингибирования в случае ПХ для бутаминофена (рис. 7в) и других фенолов [13, 15, 16, 31, 32].

Связывание иона Г с ПХ полностью исключает его влияние на реакцию (1), так как иодид располагается довольно далеко от гема и никогда не входит в координационную сферу гемового железа [9, 10, 40]. Иодид и ингибиторы ароматической природы (poly(DSGA), пропилгаллат и др.) связываются по разным сайтам обеих пероксидаз и не могут конкурировать друг с другом при взаимодействии с ферментами. Конкурентный и смешанный тип ингибирования окисления иодида фенолами объясняется конкурирующими реакциями Г $^{\cdot}$  и InH с Комплексом I пероксидаз (см. схему процесса).

Заслуживает внимания анализ стехиометрических коэффициентов  $f$ , полученных в этой работе и ранее в нашей лаборатории [13, 15, 31, 32] (таблица). В большинстве случаев при использовании низкомолекулярных ингибиторов этот коэффициент меняется в пределах 1–2 или равен 3,2 для галловой кислоты при окислении ТМВ [32], т.е. молекулы ингибиторов взаимодействуют с одним – двумя или реже тремя радикалами, что характерно для огромного большинства фенольных или аминных антиоксидантов [50]. Пропилгаллат в окислении иодида с участием ПХ обнаружил значение  $f$ , равное 4,14 [13], что объясняется регенерацией фенольного ингибитора по реакции (5) (см. схему процесса). Полимерный ингибитор – поли(дисульфид галловой кислоты) во всех процессах с участием обеих пероксидаз обнаруживает коэффициенты  $f \gg 1$  (таблица), что объясняется двумя причинами: во-первых, полимерная природа этого антиоксиданта обуславливает многократное увеличение  $f$  по сравнению с аналогами его мономерных звеньев – галловой кислотой и пропилгаллатом; во-вторых, реакция (5\*) (см. схему процесса) идет в направлении  $AmNH_2 + PhO^{\cdot} \longrightarrow AmNH_2^{\cdot} + PhOH$  и обеспечивает многократную регенерацию фенольного антиоксиданта. Доказательством того, что большие величины  $f$



обусловлены неферментативными реакциями, являются их значения в процессах с участием как ПХ, так и ТПЧ: для каждой из пероксидаз и двух восстанавливающих субстратов (Г и ТМВ) в случае poly(DSGA) стехиометрический коэффициент всегда намного больше единицы (таблица).

Константы ингибирования  $K_i$  во всех случаях для полимерных ингибиторов ниже, чем для аналогов их мономерных звеньев, т.е. полимерные антиоксиданты всегда превышают по своей антирадикальной активности мономерные аналоги. Максимально эффективное ингибирование (самое низкое значение  $K_i$ ) зарегистрировано для поли(дисульфида галловой кислоты) при окислении Г с участием ПХ (таблица): эффективность ингибирования этой же реакции с участием ТПЧ в 15 раз ниже.

В случае ингибирования бутаминаофеном окисления ТМВ при участии ТПЧ наблюдается изменение типа ингибирования от конкурентного к неконкурентному. На основании данных рис. 3б, ТПЧ, возможно, имеет два центра связывания, отличающихся сродством к фенольному ингибитору. Возможно, связывание продукта трансформации бутаминаофена по одному из этих центров, не препятствует связыванию ТМВ по другому, однако, приводит к резкому снижению скорости распада тройного комплекса E-S-In или к ситуации, когда этот комплекс вовсе не распадается. В таком случае, действие бутаминаофена сводится к снижению концентрации активной формы фермента и, как следствие, изменению максимальной скорости и постоянной  $K_m$ .

В ряде случаев при ингибированном пероксидазном окислении с участием ПХ и ТПЧ наблюдается изменение типа ингибирования от конкурентного к смешанному. Наиболее вероятной причиной этого может быть разный характер инактивации пероксидаз в ходе ферментативного процесса, связанный с образованием продуктов окисления ингибиторов и их взаимодействием с ферментами, что становится одной из причин снижения операционной стабильности биокатализаторов. Установлено, например, что две пероксидазы (ТПЧ и лактопероксидаза) необратимо ингибируются при окислении пероксидом водорода резорцина и его производных, в то время как инактивация ПХ при окислении тех же соединений не наблюдается [35]. Снижение операционной стабильности ТПЧ и лактопероксидазы, по мнению авторов работы [35], связано с возможной атакой радикалами резорцина функционально важных аминокислот в активных центрах ТПЧ и лактопероксидазы, что приводит к самоинактивации обоих ферментов. В нашей работе показано, что бутаминаофен в растущих концентрациях сильнее снижает активность ТПЧ, чем

ПХ (рис. 7а), на что указывают значения  $K_i$ : вероятно, радикалы бутаминаофена деструктурируют ТПЧ в большей степени, чем ПХ. Ранее нами показано [13], что пропилгаллат более активен в дестабилизации ТПЧ в ходе окисления Г и ТМВ, чем в инактивации ПХ. Самоинактивация ТПЧ под действием радикалов пропилгаллата является одной из причин смешанного характера ингибирования процессов окисления Г и ТМВ пероксидом водорода в отличие от ПХ, операционная стабильность которой много выше и снижается, как правило, в результате радикального распада пероксидных комплексов фермента [34, 51]. Операционная стабильность пероксидаз представляет особый интерес, так как сильно различается для разных пероксидаз в процессах окисления одних и тех же субстратов: при окислении двухатомных и трехатомных фенолов пероксидом водорода ТПЧ и лактопероксидаза сильно инактивируются, в то время как ПХ, миелопероксидаза, хлоропероксидаза и метмиоглобин (псевдопероксидаза) не инактивируются совсем или теряют операционную стабильность в небольшой степени [35].

На основании экспериментальных данных, полученных нами в этой работе и ранее, можно сделать некоторые существенные выводы.

Во-первых, многоатомные фенолы (поли(дисульфид галловой кислоты) и пропилгаллат [13]) с высокой эффективностью ингибируют реакции окисления ионов Г с участием ТПЧ и ПХ, что может быть одной из причин дисфункции щитовидной железы человека при токсическом воздействии на нее фенолов и других ароматических соединений.

Во-вторых, характер ингибирования окисления Г полифенолами чаще всего смешанный, что связано с конкуренцией иодида и ингибитора за активную форму пероксидаз – Комплекс I ( $E_1$  в схеме процесса) и с возможной инактивацией пероксидаз (особенно ТПЧ) в ходе ферментативного процесса из-за взаимодействия фермента с продуктами окисления ингибитора; конкуренции иодида и полифенолов за связывание с ферментом не происходит, так как они взаимодействуют с совершенно разными сайтами пероксидаз.

В-третьих, фенолы (бутаминаофен) и полифенолы (пропилгаллат, поли(дисульфид галловой кислоты) и др.) с высокой эффективностью ингибируют пероксидазное окисление тетраметилбензидина с участием ТПЧ и ПХ по неконкурентному механизму в системе ТПЧ–бутаминаофен из-за снижения концентрации активной формы фермента, а в других случаях – по конкурентному и смешанному механизму, что связано с взаимодействием амина (ТМВ) и фенолов с одними и теми

же сайтами пероксидаз и конкуренцией амина и фенолов за активные формы пероксидаз – Комплексы I и II ( $E_1$  и  $E_2$  в схеме процесса) и с потерей операционной стабильности пероксидаз (особенно ТПЧ) из-за взаимодействия с феноксильными радикалами в ходе ферментативной реакции.

В-четвертых, во всех случаях ингибирующая эффективность полимерных антиоксидантов существенно выше, чем у аналогов их мономерных звеньев. По количественным характеристикам поли(дисульфид галловой кислоты) гораздо эффективнее, чем бутаминофен и пропилгаллат в процессах ингибированного пероксидазного окисления (таблица).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реагенты.** В качестве восстанавливающих субстратов обеих пероксидаз в работе использовали KI квалификации “х. ч.” Уральского завода химреактивов “Реахим” (Россия) и ТМБ фирмы “Serva” (Германия). В качестве окислителя применяли разбавленный пергидроль производства “Реахим” (Россия), определяя концентрацию  $H_2O_2$  спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения  $\epsilon_{230} 72.4 M^{-1} cm^{-1}$  [52]. Применяли свежеперегнанный диметилформид (DMF), а также соли и основания марки “ч.” для приготовления буферных растворов: А – 0.05 М ацетатный буфер, pH 5.2, и Б – 0.05 М фосфатный буфер, pH 6.0.

**Ингибиторы.** Поли(дисульфид галловой кислоты) имел среднюю молекулярную массу ~1760, содержал в среднем 7.5 мономерных звеньев и был синтезирован по методике, детально описанной ранее [14].

2-Гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутил-*N*-фениланилин (бутаминофен или InH) с молекулярной массой 297 был синтезирован по методике, подробно описанной в работе [20].

**Ферменты.** Очищенную тиреоидпероксидазу человека (ТПЧ, КФ 1.11.1.8) получали из послеоперационных гистологически классифицированных образцов щитовидной железы человека, любезно предоставленных нам проф. Е.П. Демидчиком (Научно-практический центр опухолей щитовидной железы Минздрава Беларуси, г. Минск). Субклеточные фракции щитовидной железы получали методом дифференциального центрифугирования. В качестве источника солюбилизированной ТПЧ использовали микросомальную фракцию клеток ЩЖЧ. Для очистки ТПЧ с использованием методики, описанной в работе [53], применяли комбинацию методов, используемых для получения различных мембранносвязанных гемопротеинов, включающих мягкую солюбилизацию ТПЧ неионным детергентом Твин-20, стабилизацию

глицерином и генином, фракционирование с использованием полиэтиленгликоля, гель-фильтрацию и диализ. Эффективность очистки использованных образцов ТПЧ была подтверждена данными электрофореза.

Концентрацию ТПЧ с оптическим показателем чистоты  $RZ 0.9$  определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения в максимуме полосы Core  $\epsilon_{418} 121000 M^{-1} cm^{-1}$  [53].

Для сравнения с ТПЧ в процессе окисления  $I^-$  и ТМБ использовали пероксидазу хрена (ПХ, КФ 1.11.1.7) производства Биолар (Олайне, Латвия) с оптическим показателем чистоты  $RZ 2.64$ . Концентрацию ПХ определяли с использованием молярного коэффициента поглощения  $\epsilon_{403} 102000 M^{-1} cm^{-1}$  [30, 33].

**Пероксидазное окисление иона  $I^-$**  в присутствии ингибитора poly(DSCA) и без него проводили в буфере А при 25°C в термостатируемых кюветах толщиной 1 см фотометра КФК-3 (Россия), снабженного цифровой индикацией оптического поглощения. В реакционную смесь общим объемом 1.5 мл вносили одновременно все компоненты кроме  $H_2O_2$  и через 1 мин начинали реакцию добавлением раствора пероксида водорода. Конечные концентрации компонентов указаны в подписях к рисункам. За окислением иона  $I^-$  следили спектрально по накоплению продукта окисления в виде тримера  $I_3^-$  с максимумом поглощения при 353 нм. Скорости окисления  $I^-$  определяли по начальным линейным участкам кинетических кривых, используя для расчета молярный коэффициент поглощения тримера  $I_3^- \epsilon_{353} 26000 M^{-1} cm^{-1}$  [8].

**Пероксидазное окисление ТМБ** с участием ТПЧ и ПХ проводили при 20°C в термостатируемых кюветах фотометра КФК-3 в буфере Б, содержащем 10% DMF по объему. Использование органического соразтворителя связано с ограниченной растворимостью ТМБ и бутаминофена в воде. Общий объем реакционной смеси составлял 1.5 мл, реакцию начинали добавлением  $H_2O_2$  и следили за ней спектрофотометрически, регистрируя рост оптического поглощения продукта окисления ТМБ при 655 нм. Начальные скорости реакции определяли по линейным начальным участкам кинетических кривых роста  $A_{655}$ , используя при расчетах молярный коэффициент поглощения продукта реакции, равный при 655 нм  $39000 M^{-1} cm^{-1}$  [15, 33].

**Количественные характеристики эффективности ингибиторов.** Для вычисления констант ингибирования в случае poly(DSCA) строили зависимости обратной величины скорости ингиби-

рованной реакции ( $v_0^{-1}$ ) от концентрации ингибитора  $[\text{InH}]_0$  (координаты Диксона) при фиксированной концентрации субстрата  $[\text{S}]$  и графически определяли величину отрезка, отсекаемого по оси абсцисс прямой линией ( $[\text{InH}]^*$ ). Тип ингибирования в системе ПХ-poly(DSGA) был определен по методу Диксона [25]. Поскольку в нашем случае  $e_i/K_i > 0.001$  ( $e_i$  – полная концентрация фермента) poly(DSGA) является ингибитором с высоким сродством. По методу Диксона при построении графиков зависимостей  $v_0/v_i$  от  $i_i/1 - (v_i/v_0)$  для разных концентраций субстрата, где  $v_0$  – скорость реакции без ингибитора,  $v_i$  – скорость в присутствии ингибитора, а  $i_i$  – полная концентрация ингибитора, характер получаемых семейств прямых будет указывать на тип ингибирования. В случае ТПЧ возможно изменение типа ингибирования от конкурентного к смешанному из-за самоинактивации фермента в ходе реакции.

Для определения коэффициентов ингибирования  $f$ , означающих число радикалов, реагирующих с одной молекулой ингибитора, использовали теорию метода ингибиторов радикальных реакций Н.М. Эмануэля и сотр. [22–24], в соответствии с которой между продолжительностью периода индукции в окислении субстрата  $\Delta t$ , вызванного действием ингибитора, скоростью инициирования радикалов  $v_i$  и начальной концентрацией ингибитора существует зависимость (II):

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

По уравнению (II) можно вычислить  $v_i/f$ , т.е. оценить скорость инициирования радикальных частиц с точностью до коэффициента  $1/f$ . При стационарном режиме радикального процесса начальная скорость расходования субстрата  $v_0$  практически равна скорости инициирования радикалов [24]:

$$v_0 \approx (v_i/f)f. \quad (\text{III})$$

Определив  $v_0$  при пероксидазном окислении субстрата в отсутствие ингибитора и вычислив  $v_i/f$  по уравнению (II), легко получить величину  $f$  по уравнению (III). Предложенный Н.М. Эмануэлем и сотр. метод [22, 24] успешно апробирован нами для ряда ингибиторов пероксидазного окисления в разных средах [13, 15–17, 31, 32].

**Спектры КД пероксидаз в присутствии поли(дисульфида галловой кислоты) и без него** в УФ-области (200–260 нм) регистрировали на приборе "Jasco J-20" (Япония) в кювете толщиной 0.1 см при комнатной температуре. Концентрация ПХ в буфере Б составляла ~3 мкМ. Глицериновую фракцию ТПЧ переводили в буфер Б при 2–4°С и диализованный раствор ТПЧ центрифугировали 8 мин при 12000 об./мин. При определении КД-характеристик концентрация ТПЧ составляла ~20 мкМ. Для определения средней мол.

массы аминокислотного остатка ТПЧ использовали данные по ее аминокислотному составу [54]: получили величину 128.4 без учета гема, гликозидной части и фрагментов мембраны. Средняя мол. масса аминокислотного остатка ПХ составила 133.3 с учетом данных аминокислотного состава этого фермента [55]. Для анализа вторичной структуры обеих пероксидаз в присутствии ингибитора и без него использовали программное обеспечение для обсчета спектров КД [29].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. Е.П. Демидчику (Научно-практический центр опухолей щитовидной железы Минздрава Беларуси, г. Минск) за предоставление послеоперационных образцов щитовидной железы человека и канд. хим. наук Ю.П. Лосеву (химический факультет Белорусского госуниверситета, Минск) за предоставление поли(дисульфида галловой кислоты).

Часть данной работы выполнена при финансовой поддержке "INTAS" (грант № 99-01768).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Туракулов Я.Х. Биохимия гормонов щитовидной железы. М.: Медицина, 1962.
2. Рачев Р.Р., Ещенко Н.Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры. М.: Наука, 1975.
3. Subrahmanyam V., O'Brien P. // Xenobiotica. 1985. V. 15. P. 859–871.
4. Capen C. // Progr. Clin. Biol. Res. 1994. V. 387. P. 173–191.
5. Subrahmanyam V., O'Brien P. // Chem. Biol. Interact. 1985. V. 56. P. 185–199.
6. Гринцевич Е.Э., Сенчук В.В. // Вестник Белорусского гос. ун-та. Серия 2. 1999. № 1. С. 39–43.
7. Саундерс Б.К. Неорганическая биохимия / Ред. Г. Эйхгорн. М.: Мир, 1978. Т. 2. С. 434–451.
8. Huwiler M., Burgi U., Kohler H. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. P. 469–476.
9. Fukuyama K., Sato K., Itakura H., Takahashi S., Hosoya T. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 5752–5756.
10. Ким Б.Б. Итоги науки и техники. Биотехнология. Т. 36. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. С. 126–146.
11. Bjrksten F. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 212. P. 396–400.
12. Dunford H.B., Cotton M. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 2920–2932.
13. Гринцевич Е.Э., Сенчук В.В., Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 2000. Т. 65 (в печати).
14. Лосев Ю.П., Лосев В.И., Федулов А.С., Олешкевич Ф.В., Климович В.А., Бирюкова Н.М. Поли(дисульфид галловой кислоты) как биоантиоксидант: А. с. 1452087 СССР // МКИ 4 G 08 C 75/14, А 61 K 31/795. 1989. № 4. 3 с.



15. Карасева Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1255–1263.
16. Карасева Е.И., Метелица Д.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 68–75.
17. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Журн. прикл. химии. 1998. Т. 71. С. 842–848.
18. Метелица Д.И., Арапова Г.С., Еремин А.Н., Лосев Ю.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1420–1431.
19. Федулов А.С. Очаговые травматические повреждения головного мозга: клинично-экспериментальное обоснование применения антиоксидантов в комплексной терапии: Автореф. Дис. ... д-ра мед. наук. Минск: БелГИУВ, 1996. 36 с.
20. Масловская Л.А., Петрикевич Д.К., Тимощук В.А., Шадыро О.И. // Журн. общей химии. 1996. Т. 66. С. 1893–1898.
21. Мезен Н.И. Биохимические аспекты гипоксического повреждения нервной ткани и его коррекция производными многоатомных фенолов: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. Минск: Минский гос. мед. ин-т, 1998. 18 с.
22. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус Э.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. 375 с.
23. Эмануэль Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. М.: Наука, 1977. 416 с.
24. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
25. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–190.
26. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Иванов А.И., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2000. Т. 36. С. 36–47.
27. Еремин А.Н., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1999. Т. 35. С. 252–261.
28. Еремин А.Н., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 298–308.
29. Böhm G. CD Spectra Deconvolution. CDNN1. (Web: <http://bioinformatic.biochemtech.renihall.de/edun>)
30. Josephy P.D., Eling T., Mason R.P. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 3669–3675.
31. Карасева Е.И., Никифорова Т.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Биоорганич. химия. 1999. Т. 25. С. 665–672.
32. Карасева Е.И., Никифорова Т.В., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2000. Т. 36 (в печати).
33. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохимия и микробиол. 1987. Т. 23. С. 116–124.
34. Метелица Д.И., Гирина Н.В., Карасева Е.И., Савенкова М.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1995. Т. 31. С. 617–624.
35. Divi R.L., Doerge D. // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 9668–9674.
36. Газарян И.Г., Упоров И.В., Чубарь Т.А., Фечина В.А., Мареева Е.А., Лагримини Л.М. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 708–715.
37. Метелица Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. С. 25–41, 158–164.
38. Yamazaki I., Yokota K. // Mol. and Cell. Biochemistry. 1973. V. 2. P. 39–52.
39. Chance B. // Arch. Biochem. Biophysics. 1952. V. 41. P. 416–425.
40. Adak S., Bhattacharaya D., Mazumder A., Bandyopadhyaya U., Banerjee R. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 12998–13006.
41. Alexander N.M. // Anal. Biochemistry. 1962. V. 4. P. 341–345.
42. Huwiler M., Kohler H. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 141. P. 69–74.
43. Яцимирский К.Б. Кинетические методы анализа. М.: Химия, 1967. С. 100–111.
44. Газарян И.Г. Итоги науки и техники. Биотехнология. Биотехнология пероксидаз растений и грибов. М.: ВИНТИ, 1992. Т. 36. С. 4–54.
45. Schuller D.J., Ban N., van Huystee R.B., McPherson A., Poulos T.J. // Structure. 1996. V. 4. P. 311–321.
46. Newmeyer S.L., Ortiz de Montelano P. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 14891–14896.
47. Rodriguez-Lopez J.N., Smith A.T., Thorneley R.N.F. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 4023–4030.
48. Welinder K.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1992. V. 2. P. 388–393.
49. Gazaryan I.G., Egorov A.M. // Adv. Mol. and Cell Biol. 1996. V. 15A. P. 59–68.
50. Denisov E.T. Handbook of Antioxidants: Bond Dissociation Energies, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions. CRC Press, 1995. 256 p.
51. Еремин А.Н., Лутвинчук А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 664–679.
52. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. М.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
53. Doerge D.R., Takazawa R.S. // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 98–104.
54. Banga J.P., Sutton B.J., Mahadevan D., Geoffrey J., Saldanha J.W., Odell E., McGregor A.M. // FEBS Lett. 1990. V. 266. P. 133–141.
55. Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. P. 2166–2171.

## Human Thyroid Peroxidase: Inhibition of the Iodide Ion and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Oxidation by Phenolic Antioxidants

E. E. Grintsevich\*, V. V. Senchuk\*\*, A. V. Puchkaev\*, O. I. Shadyro\*\*\*, and D. I. Metelitsa\*#

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

\*\**Belarussian State University, Department of Biology, Minsk, 220106 Belarus*

\*\*\**Belarussian State University, Department of Chemistry, Minsk, 220050 Belarus*

A comparative kinetic study on the poly(gallic acid disulfide) (poly(DSGA)) inhibition of the iodide ion oxidation and on the 2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butyl-*N*-phenylaniline (butaminophene) inhibition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) oxidation involving human thyroid peroxidase (hTPO) and horseradish peroxidase (HRP) was performed. The inhibition processes were characterized with the inhibition constants  $K_i$  and stoichiometric inhibition coefficients  $f$ , indicating the number of radical particles perishing on one inhibitor molecule. In the case of poly(DSGA), the  $K_i$  values for the  $I^-$  oxidation were 0.60 and 0.04  $\mu\text{M}$ , and the coefficients  $f$  were 13.6 and 16.5 for hTPO and HRP, respectively, which evidences the regeneration and high effectiveness of the polymeric inhibitor. In the case of butaminophene, the  $K_i$  values for TMB oxidation were 38 and 46  $\mu\text{M}$  for hTPO and HRP, respectively. The coefficients  $f$  were 1.33 and 1.47, respectively, to reveal that butaminophene does not regenerate. The inhibition mechanisms for  $I^-$  and TMB oxidation involving the two peroxidases are discussed.

*Key words: human thyroid peroxidase; horseradish peroxidase; iodide, oxidation; tetramethylbenzidine, oxidation; poly(gallic acid disulfide); 2-hydroxy-3,5-di-tert-butyl-N-phenylaniline; antioxidants*

---

# *To whom correspondence should be addressed; fax: (0172) 63-7274; e-mail: enzyme@ns.iboch.ac.by.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.