

УДК 577.152.193
©Белевич, Сенчук

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЙОДПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА

*В.К. Белевич, В.В. Сенчук**

Белорусский государственный университет, лаборатория биохимии обмена веществ, кафедра биохимии, пр. Независимости 4, Минск, 220030 Беларусь;
тел.: +375172095861; факс: +375172095851; эл. почта: sentchouk@tut.by

Методом УФ-спектрофотометрии в слюне человека в полной пероксидазной системе определено появление I_3^- – коричневого продукта йодпероксидазной реакции с λ_{\max} 287 нм и 353 нм. Трийодид реагирует с крахмалом с образованием характерного сине-голубого комплекса полигалогеида и полисахарида. Йодпероксидазная активность пероксидаз нативной слюны при pH 5,8 почти в 2,3 и в 1,2 раза превышает активность в отношении природных субстратов – Cl^- и SCN^- . Оптимум pH для реакции пероксидазного окисления йодида в слюне находится при pH 5,8. С ростом pH реакционной среды происходит резкое снижение йодпероксидазной активности вплоть до ее полного подавления при pH > 7,4. Йодпероксидазная активность слюны при pH > 7,4 замаскирована из-за разложения трийодида с увеличением pH среды, за счёт ингибирования пероксидаз и восстановления I_3^- низкомолекулярными диализуемыми компонентами слюны, предположительно Cl^- и SCN^- . Ингибиторы пероксидаз (азид натрия, 2-меркаптоэтанол, тиомочевина) полностью подавляют йодпероксидазную активность слюны, альтернативные субстраты пероксидаз (кверцетин, аскорбат, тиоцианат) – частично ингибируют пероксидазное окисление йодида в слюне. Таким образом, активное участие пероксидаз слюны в пероксидажном окислении йодид-аниона можно рассматривать в качестве важного фактора в метаболических превращениях и в биодоступности биологически активного галогеида.

Ключевые слова: йодид, пероксидазное окисление, слюна человека.

ВВЕДЕНИЕ. В слюне человека обнаруживается пероксидазная активность, обусловленная присутствием и функционированием двух пероксидаз – миелопероксидазы и пероксидазы слюнных желез [1]. В качестве основного физиологического субстрата миелопероксидаза использует хлорид-анион [2].

* - адресат для переписки

ЙОДПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЮНЫ

Для пероксидазы слюнных желез важнейшим природным субстратом является тиоцианат (SCN^-) [3]. Пероксид водорода, который генерируется микроорганизмами слюны, является лимитирующим фактором реакций пероксидазного окисления в слюне [4]. Пероксидазное окисление Cl^- и SCN^- сопровождается генерированием высокоактивных метаболитов, которые реализуют бактерицидную роль пероксидаз слюны [1–4]. Известно, что многие пероксидазы способны эффективно окислять и другие неорганические субстраты, среди которых особый интерес привлекает йодид-анион – незаменимый биологически активный компонент пищи человека, используемый для биосинтеза гормонов щитовидной железы [5]. Есть данные о пероксидажном окислении йодида миелопероксидазой и лактопероксидазой [6], которая очень близка по первичной структуре пероксидазе слюнных желез [5, 7]. Ежедневное поступление йодид-аниона с пищей и водой в организм человека варьирует в диапазоне 20–700 мкг в зависимости от региона проживания, пищевых приоритетов, содержания йодида в воде, пищевых продуктах и др. [8]. Следовательно, участие пероксидаз слюны в реакциях пероксидазного окисления йодид-аниона можно рассматривать в качестве важного фактора в метаболических превращениях и в биодоступности биологически активных галогенидов (хлорид, йодид), представляет несомненный теоретический и практический интерес с позиций биомедицинской химии. В настоящей работе идентифицировано образование трийодида (I_3^-), продукта йодпероксидазной реакции, определена и исследована йодпероксидазная активность слюны человека в зависимости от pH и концентрации H_2O_2 , а также в присутствии ингибиторов и альтернативных субстратов пероксидаз.

МЕТОДИКА. В работе использовали слюну здоровых доноров мужчин, которую получали согласно общепринятым методическим рекомендациям [9]. В качестве субстрата пероксидаз слюны был выбран KI о.с.ч. “Реахим” (Россия). В экспериментах изучали полную пероксидазную систему: слюна (источник суммарной пероксидазной активности пероксидазы слюны и миелопероксидазы) или пероксидаза из корней хрена (ПХ; КФ 1.11.1.7) с $R_z=3,0$ производства “Sigma” (США), KI и H_2O_2 . Концентрацию H_2O_2 измеряли спектрофотометрически при $\lambda_{\text{max}}=240$ нм, используя $\varepsilon=43,6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [10]. Концентрацию пероксидазы из хрена определяли по оптической плотности в полосе Core ($\lambda_{\text{max}}=403$ нм, $\varepsilon=102000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [11]. В качестве контролей анализировали различные варианты неполной пероксидазной системы, где отсутствовал какой-либо один биохимический компонент.

Пероксидазное окисление йодид-аниона (2 мМ) пероксидом водорода со слюной человека (50–200 мкл) или ПХ (1,53 нМ) проводили при 37°C в 0,05 М Na-фосфатном буфере (pH 7,4) или в 0,05 М Na-цитратном буфере (pH 5,8). Общий объём реакционной смеси составлял 3,0 мл. Реакцию начинали добавлением H_2O_2 (100 мкМ). Оптимальные концентрации йодида, H_2O_2 и слюны в реакционной среде подобраны экспериментальным путем. За ходом йодпероксидазной реакции следили во времени, регистрируя накопление в реакционной среде продукта окисления йодида – трийодида (I_3^-) – по увеличению оптической плотности при $\lambda_{\text{max}}=353$ нм [12]. Для расчёта начальных скоростей пероксидазного окисления йодида и удельной активности использовали коэффициент молярной экстинкции трийодида, равный $\varepsilon_{353}=26000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [13]. Йодпероксидазную активность слюны характеризовали величинами удельной активности (в нмоль $\text{I}_3^-/\text{мг}$ белка слюны за 1 мин).

Активность слюны в реакции пероксидазного окисления йодида определяли также в присутствии ингибиторов (азид натрия, тиомочевина или 2-меркаптоэтанол) и альтернативных субстратов (аскорбат, тиоцианат или кверцетин) пероксидаз при pH 5,8 в 0,05 М Na-цитратном буфере [14]. До запуска пероксидазного окисления в реакционную среду вносили 1 мМ NaN_3 , 1 мМ аскорбиновой кислоты, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мМ тиомочевины, 1 мМ тиоцианата или 1 мкМ кверцетина.

Концентрацию белка в слюне определяли микробиуретовым методом [15]. Спектрофотометрические анализы выполняли на UV-VIS-спектрофотометре Cary 50 фирмы "Varian".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Методом УФ-спектрофотометрии исследовано пероксидазное окисление йодид-аниона в слюне человека по образованию трийодида (I_3^-) – продукта йодпероксидазной реакции [13]. Образование коричневого продукта наблюдается только в полной пероксидазной реакционной среде, содержащей 100 мкМ H_2O_2 , 2 мМ йодида калия, 100 мкл слюны в Na-фосфатном буфере pH 5,8. Судя по УФ-спектрам поглощения реакционной среды наблюдается появление трийодида (I_3^-) с λ_{max} 287 нм и 353 нм (рис. 1). Дополнительным доказательством образования I_3^- в полной пероксидазной системе является сине-голубое окрашивание после добавления крахмала в реакционную среду (рис. 1), что свидетельствует об образовании характерного комплекса полигалогенида и полисахарида. Эти данные свидетельствуют о том, что в ходе реакции пероксидазное окисление йодид-аниона в слюне протекает в две стадии. Первая из них – ферментативная (реакция I), а вторая – неферментативные (реакции II и III):

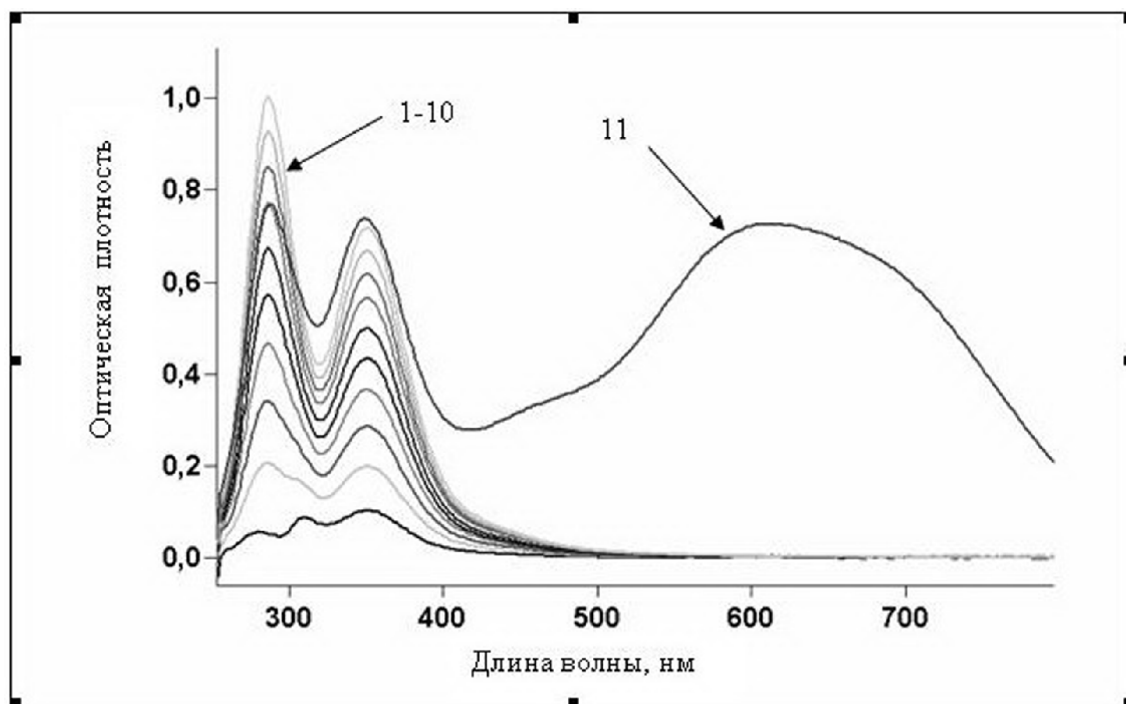
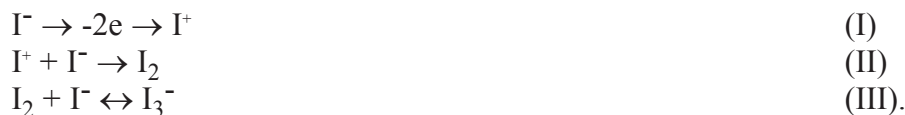


Рисунок 1.

Образование коричневого трийодида (кривые 1 - 10) и сине-голубого комплекса трийодида с крахмалом (кривая 11) в полной пероксидазной реакционной среде, содержащей 100 мкМ H_2O_2 , 2 мМ йодида калия, 100 мкл слюны в Na-фосфатном буфере pH 5,8: спектры 1-10 записаны последовательно через 12 с, спектр 11 - через 210 с после запуска реакции.

ЙОДПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЮНЫ

Результаты определения йодпероксидазной активности слюны человека и пероксидазы из хрена при pH 5,8 представлены в таблице 1. Сравнение полученных результатов с данными литературы показывает, что йодпероксидазная активность пероксидаз нативной слюны при pH 5,8 почти в 2,3 и в 1,2 раза превышает активность в отношении природных субстратов – Cl^- и SCN^- [17].

Таблица 1. Йодпероксидазная активность слюны, пероксидазы из хрена и их смеси.

Образец	Йодпероксидазная активность слюны	
	нмоль/мин × 1 мг белка слюны	%
Слюна нативная (100 мкл), pH 5,8	113159 ± 3209	79,9
Слюна диализованная (100 мкл), pH 5,8	130841 ± 1924	92,2
Слюна нативная (100 мкл), пропрета 100°C 5 мин, pH 5,8	0	0
Слюна нативная (100 мкл), pH 7,4	3338 ± 285	2,3
Слюна диализованная (100 мкл), pH 7,4	5680 ± 500	4
Пероксидаза из хрена (1,53 нМ), pH 5,8	16652 ± 355	11,3
Смесь пероксидазы из хрена (1,53 нМ) и слюны (100 мкл), pH 5,8	141761 ± 1240	100
Контроль (100 мкл слюны + Г без H_2O_2) pH 5,8	754,7 ± 27,5	0,53
Контроль (100 мкл слюны + Г без H_2O_2) pH 7,4	397 ± 49,1	0,28

Исследована зависимость йодпероксидазной активности слюны от pH реакционной среды (рис. 2). Установлено, что оптимум pH для реакции пероксидазного окисления йодида в слюне находится при pH 5,8, как и оптимум pH для окисления многих субстратов различными пероксидазами [3, 5, 7]. С ростом pH реакционной среды происходит резкое снижение йодпероксидазной активности вплоть до её полного подавления при pH > 7,4 (рис. 2). Поскольку пероксидазное образование трийодида включает неферментативные реакции II и III [13, 16], можно думать, что наблюдаемая pH-зависимость связана с разложением трийодида с увеличением pH среды. Это предположение находит экспериментальное подтверждение при изучении влияния pH на содержание I_3^- (рис. 2) и основывается на данных литературы в отношении реакции окисления йодида пероксидазой из хрена [16]. Таким образом, в условиях близких к оптимуму pH слюны человека йодпероксидазное окисление, по-видимому, отчасти замаскировано из-за неблагоприятных условий протекания сопряженной неферментативной реакции. Высокая йодпероксидазная активность слюны наблюдается в условиях закисления. Снижение pH слюны до 5,88 в течение одного часа наблюдается при утилизации глюкозы и сахарозы в связи с накоплением органических кислот в полости рта у лиц со здоровой полостью рта [18].

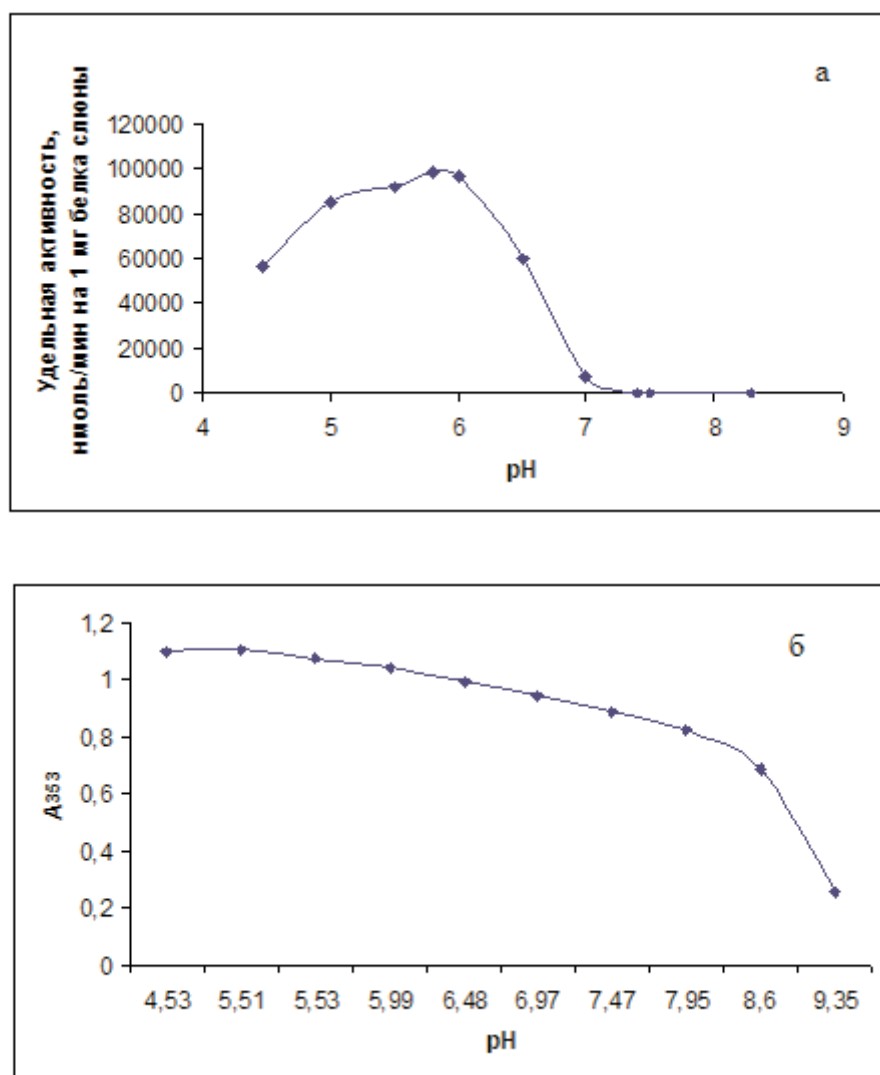


Рисунок 2.

Зависимость йодпероксидазной активности слюны от pH реакционной среды (а) и зависимость оптической плотности трийодида (A_{353}) от pH среды без запуска пероксидазной реакции (б).

Галогениды (хлорид и йодид) и псевдогалогенид тиоцианат являются естественными компонентами пищи и слюны человека. По литературным данным Cl^- содержится в слюне в диапазоне концентраций 14,1–56,3 мМ, I^- – 2,4–25,7 мкМ, SCN^- – 0,5–2,0 мМ [3, 4]. Очевидно, что Cl^- и SCN^- слюны будучи естественными субстратами миелопероксидазы и пероксидазы слюнных желез, могут влиять на процесс пероксидазного окисления йодида в слюне человека. Об этом могут свидетельствовать следующие данные. Йодпероксидазная активность слюны человека после диализа существенно увеличивается: на 70% при pH 7,4 и на 15,6% при pH 5,8 (табл. 1). После диализа слюны происходят характерные изменения формы кинетических кривых йодпероксидазной реакции. Исчезает лаг-фаза, на 11,8% увеличивается угол наклона начальной части кривой и на 8,6% возрастает глубина окисления йодида с выходом реакции на плато. Кроме этого изучено влияние слюны на процесс пероксидазного окисления йодида путём сравнительного анализа активности нативной слюны, пероксидазы из хрена и их смеси при pH 5,8 (табл. 1). Эти данные показывают, что йодпероксидазная активность экзогенной пероксидазы из хрена в составе слюны человека на 15%

ЙОДПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЮНЫ

достоверно ниже, чем в свободном состоянии. Показано, что без проведения пероксидазной реакции в процессе “титрования” слюной раствором I_3^- происходит уменьшение оптической плотности раствора на длине волны поглощения трийодида (коричневый продукт с $\lambda_{\max}=353$ нм) пропорционально внесённому количеству слюны. При этом нативная слюна реагирует с трийодидом (рис. 3), по-видимому, восстанавливая его по обращённым неферментативным реакциям II и III. Результаты “титрования” I_3^- диализованной слюной демонстрируют снижение этого эффекта восстановления трийодида при pH 5,8 и при pH 7,4 (рис. 3). Следовательно, все эти данные показывают, что хлорид и тиоцианат являются основными претендентами на роль эндогенных регуляторов окисления йодида пероксидазами слюны.

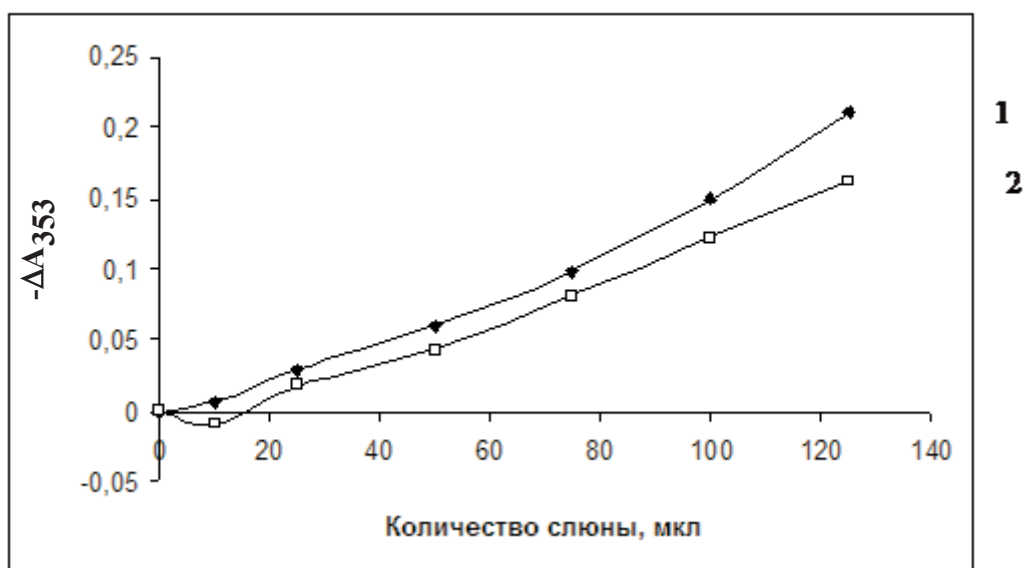


Рисунок 3.

Изменение оптической плотности раствора I_3^- ($-\Delta A_{353}$) при внесении возрастающих количеств нативной слюны (1) и диализованной слюны (2) в реакцию среду при pH 5,8 (“титрование” I_3^- слюной).

Йодпероксидазную активность слюны человека исследовали в присутствии различных ингибиторов пероксидаз (азид натрия, 2-меркаптоэтанола, тиомочевина) и естественных субстратов пероксидаз – кверцетина, аскорбата и тиоцианата (табл. 2). Азид натрия, 2-меркаптоэтанол, аскорбат и тиомочевина практически полностью ингибируют реакцию окисления йодида. Как и в других случаях [3, 5, 7], азид натрия выключает все гем-содержащие пероксидазы за счёт связывания с гемовым железом, тиомочевина дезактивирует каталитически активные пероксидные соединения пероксидаз, а 2-меркаптоэтанол восстанавливает важные сульфгидрильные группы пероксидазы слюны и ингибирует её активность. При добавлении кверцетина и тиоцианата наблюдается частичное ингибирование йодпероксидазной реакции, что, вероятно, отражает сложные взаимодействия альтернативных субстратов в реакции совместного пероксидазного окисления слюной. Такой типичный отклик йодпероксидазной активности слюны человека на введение в реакцию среду различных ингибиторов и субстратов пероксидаз подтверждает специфичность пероксидазного окисления йодида в слюне

Таблица 2. Йодпероксидазная активность слюны в присутствии ингибиторов и альтернативных субстратов пероксидаз при pH 5,8.

Образец	Йодпероксидазная активность слюны	
	нмоль/мин × 1 мг белка слюны	%
Контроль (без добавок)	127605 ± 1240	100
NaN ₃ , 1 мМ	79,0 ± 52,3	0,062
2-меркаптоэтанол, 1 мМ	35,0 ± 24,7	0,027
Тиомочевина, 1 мМ	60,6 ± 31,1	0,048
Кверцетин, 1 мМ	7111 ± 749	5,57
Аскорбат, 1 мМ	133,52 ± 33,1	0,1
Тиоцианат, 1 мМ	61286 ± 1359	48,03
Хлорид, 1 мМ	124359 ± 1034	97,4

Таким образом, активное участие пероксидаз слюны в пероксидажном окислении йодид-аниона можно рассматривать в качестве важного фактора в метаболических превращениях и в биодоступности биологически активного галогенида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы ориентированных фундаментальных исследований Республики Беларусь “Физиологически активные вещества”, задание №3.17.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carlsson J. (1987) J. Oral. Pathol., **16**, 412–416.
2. Kettle A.J., Winterbourn C.C. (1997) Redox Rep., **3**, 14–28.
3. Jormo O. Tenovuo J. (1991) in: Peroxidases in Chemistry and Biology (Everse J., Everse K.E. and Grisham M.B., eds.) CRC Press. Boca Raton, pp. 181–198.
4. Tenovuo J. (1989) in: Human saliva. Clinical chemistry and microbiology, CRC Press, Boca Raton, pp. 75–99.
5. O'Brien P. (2000) Chem. Biol. Interact., **129**, 113–139.
6. Morrison M., Schonbaum G.R. (1976) Annu. Rev. Biochem., **45**, 861–888.
7. Dunford H.B. (1999) Heme Peroxidases, Wiley-VCH, New York.
8. Строев Ю.И., Чурилов Л.П. (2005) Медицина XXI век, **1**, 14–21.
9. Леонтьев В.К., Петрович Ю.А. (1976) Биохимические методы в экспериментальной и клинической стоматологии. Омск.
10. Aebi H.E. (1983) in: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., Grab M., eds.) Verlag Chemie, Weinheim, **III**, pp. 273–276.
11. Schonbaum G.R., Lo S. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 3353.
12. Alexander N.M. (1962) Anal. Biochem., **4**, 341–245.
13. Huwiler M., Bürgi U., Kohler H. (1985) Eur. J. Biochem., **147**, 469–476.
14. Ледак Е.А., Сенчук В.В. (2003) Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. **1**, 30–35.

ЙОДПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЛЮНЫ

15. Северин С.Е., Соловьева Г.А. (1989) Практикум по биохимии, М.
16. Roman R., Dunford H. (1972) Biochemistry, **11**, 2076–2081.
17. van Dalen C.J. et al. (1997) Biochem. J., **327**, 487-492.
18. Широбокова В.Г. (1974) Вопросы пародонтологии, Омск, **115**, 114-118.

Поступила: 10. 09. 2008.

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF IODPEROXIDASE ACTIVITY OF HUMAN SALIVA

V.K. Belevich, V.V. Sentchouk

Belorussian State University, Biochemistry Department, Nezavisimosty av.4, Minsk, 220030 Belarus;
tel.: +375172095861; fax: +375172095851; e-mail: sentchouk@tut.by

Peroxidase-catalyzed oxidation of iodide in human saliva leads to the formation of a brown product with λ_{\max} 287 nm and 353 nm (I_3^-) identified by the method of UV-spectrophotometry. I_3^- directly reacts with starch producing the characteristic blue complex. Salivary iodide peroxidase activity was found to be from 1.2 to 2.3 times higher then the activity of salivary peroxidases with natural substrates (SCN^- and Cl^-). Optimum for the iodide peroxidase activity in human saliva was found to be near pH 5.8. Salivary iodide peroxidase activity progressively lowers with the rise of pH value of the reaction mixture until total loss at the pH>7.4 was observed. Iodide peroxidase activity in human saliva at pH>7.4 is masked due to decomposition of I_3^- with the increase of pH along with the inhibition of peroxidases and I_3^- reduction by low molecular weight dialyzable salivary components possibly by Cl^- and NCS^- . Salivary iodide peroxidase activity was completely inhibited by peroxidase inhibitors (NaN_3 , 2-mercaptoethanol, thiourea), while addition of the peroxidase alternative substrates (ascorbate, quercetin, thiocyanate) resulted in partial inhibition of iodide peroxidase activity. The results of the study confirm the idea, that high activity of human saliva peroxidase with iodide as a substrate may play a crucial role in the bioavailability and metabolism of biologically active iodide.

Key words: iodide, peroxidase oxidation, human saliva.