

УДК 577.15 : 612.128

©Разыграев

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС, ОКИСЛЯЮЩАЯ ГОМОЦИСТЕИН С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

А.В. Разыграев

НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Менделеевская линия, 3,
199034 Санкт-Петербург; тел.: (812) 328-98-05; факс: (812) 328-23-61;
эл. почта: alexeyrh@mail.ru

При использовании метода определения глутатионпероксидазной активности с применением пероксида водорода и 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты), но с заменой глутатиона на гомоцистеин, обнаружена активность в плазме крови и лизате эритроцитов крыс, утилизирующая свободную SH-форму гомоцистеина. В присутствии плазмы и лизата эритроцитов происходит значительное ускорение убыли гомоцистеина в реакционной смеси, включающей D,L-гомоцистеин и H_2O_2 (инициирующую убыль гомоцистеина). Полученные данные позволяют предположить наличие гомоцистеинпероксидазы в плазме крови и эритроцитах. Возможно, обнаруженная активность присуща уже известным белкам, функционирующим в качестве тиолзависимых ферментов. В ткани головного мозга крыс уровень данной активности крайне низок (на пределе обнаружения). Уровень выявленной активности в компонентах крови увеличивается в постэмбриональном онтогенезе. Вероятно, данная активность способствует поддержанию низких концентраций свободной SH-формы гомоцистеина в компонентах крови.

Ключевые слова: аминотиолы, сульфгидрильные группы, 5,5'-дитиобис-2-(нитробензойная кислота), гомоцистеинпероксидаза, активность, возраст.

ВВЕДЕНИЕ. Неотъемлемой чертой аэробного метаболизма является продукция свободнорадикальных соединений кислорода, в частности, супероксидного анион-радикала, дисмутация которого приводит к образованию пероксида водорода. Пероксид водорода, наряду с другими высокореактивными продуктами восстановления кислорода *in vivo* способен вызывать окислительные повреждения макромолекул, в связи с чем его повышенную продукцию в организме нередко связывают с развитием различных заболеваний и старением организма [1].

Пероксидазы представляют собой существенный компонент антипероксидной системы, активность которой направлена на устранение как пероксида водорода, так и органических перекисей, образующихся *in vivo*. Часть пероксидаз является тиолзависимыми ферментами, и к данной группе относятся глутатионпероксидазы (ГПО). Однако, существуют данные, указывающие на то, что среди низкомолекулярных тиолов, присутствующих в крови, не только глутатион может участвовать в ферментативном восстановлении перекисей. В 1999 г. была опубликована работа, показывающая возможность участия как глутатиона, так и цистеина, цистеинилглицина и гомоцистеина в ферментативном восстановлении фосфолипидгидроперекиси, которое катализируется сывороточным альбумином человека [2]. Однако, что касается ферментативной активности, направленной на ускорение восстановления

пероксида водорода посредством такого аминотиола как гомоцистеина, то в мировой литературе данные о её существовании отсутствуют.

В настоящей работе приводятся данные, которые указывают на существование в плазме крови и в эритроцитах крыс активности, направленной на ускорение утилизации свободной SH-формы гомоцистеина в присутствии пероксида водорода. Данная активность была обнаружена в условиях, сходных с теми, которые обычно используются нами для определения активности ГПО. Настоящая работа не претендует на всестороннее изучение обнаруженной активности, но представляет результаты первых исследований в данном направлении.

МЕТОДИКА. В работе были использованы половозрелые самки крыс линии Вистар, полученных из питомника “Рапполово” РАМН, Санкт-Петербург. Животных содержали в виварии с режимом освещения 12 ч света: 12 ч темноты; крыс декапитировали в дневную фазу суток после предварительной наркотизации трихлорметаном. После обнаружения активности и подбора подходящих условий инкубации (обеспечивающих постоянство скорости исследуемой реакции и её пропорциональность содержанию биоматериала) эксперименты были проведены также на смешанных образцах плазмы от 5 животных (вес 220-310 г). Крысы были отобраны случайным образом из совокупности 16 самок, случайность отбора достигалась использованием жребия [3, 4].

Для сбора образцов крови использовали пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА), объем собранной крови составлял 1-1,5 мл. Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием в течение 15 мин при 1600 g. Свежие аликвоты плазмы от пяти крыс смешивали в равных объемах для приготовления объединенного образца. Эритроциты три раза промывали физиологическим раствором (0,9% NaCl (вес/объем)), каждый раз ресуспендируя клетки и центрифугируя в течение 5 мин при 400 g. Гемолизат готовили добавлением 4 объемов дистиллированной воды к одному объему осадка эритроцитов, после чего центрифугировали при 1000 g (10 мин), супернатант использовали для определения исследуемой активности.

Головной мозг извлекали сразу после декапитации и хранили при -85°C до приготовления гомогенатов, которые готовили, используя трис-HCl-буфер (pH 8,5), в соответствии с описанием в работе [5].

Определение активности биоматериала, осуществляющей окислительную деградацию гомоцистеина с участием пероксида водорода, проводили при 37°C в реакционной смеси, содержащей 0,043 М трис-HCl-буфер (pH 8,5), 0,29 мМ ЭДТА, 19,2 мМ NaN_3 , 1 мМ D,L-гомоцистеин и биоматериал (плазма, эритроциты, супернатант гомогената мозга). Биоматериал преинкубировали с раствором гомоцистеина в трис-HCl-буфере с ЭДТА и NaN_3 в течение 1 мин. Реакцию окисления гомоцистеина инициировали внесением водного раствора H_2O_2 (использовали несколько конечных концентраций для подбора оптимальной в диапазоне 49,5-792,0 мкМ) и останавливали внесением в реакционную смесь трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с концентрацией после добавления, равной 4,8% (масса/объем), что обеспечивало также денатурацию белка. Инкубацию с H_2O_2 проводили в интервале 0-100 с. Для определения скорости неферментативного окисления гомоцистеина в присутствии H_2O_2 в идентичным образом собранные и инкубируемые пробы вместо биоматериала вносили дистиллированную воду. Объемы реакционной смеси и вносимых растворов реагирующих соединений идентичны используемым ранее для определения глутатионпероксидазной активности [5].

После внесения ТХУ в реакционную смесь пробы выдерживали несколько минут и центрифугировали при 1000 g (10 мин). Супернатант отбирали для определения содержания гомоцистеина с использованием 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) [6]. К 90 мкл отобранного супернатанта добавляли 2 мл 0,05 М трис-HCl-буфера (pH 8,5), через 7,5 мин вносили 15 мкл раствора ДТНБ в метаноле (4 мг/мл абсолютного метанола).

Пробы фотометрировали при 412 нм через 7,5 мин после внесения ДТНБ [7]. При данной длине волны регистрируется окрашенный в жёлтый цвет 2-нитро-5-меркаптобензоат, образующийся в результате взаимодействия SH-групп гомоцистеина с ДТНБ [6]. Для расчетов концентрации гомоцистеина использовали коэффициент молярного поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоата при 412 нм для растворов в щелочных буферах, равный $14150 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ (по стехиометрии реакции 1 моль 2-нитро-5-меркаптобензоата соответствует 1 моль гомоцистеина).

Содержание белка в плазме крови определяли биуретовым методом [8], в лизате эритроцитов - по методу [9] с использованием ТХУ и регистрацией оптической плотности при 500 нм (в настоящем исследовании не ставили цель провести точное сопоставление уровней удельной активности между плазмой и эритроцитами).

После того, как была обнаружена предполагаемая активность в плазме и эритроцитах, был проведён эксперимент по изучению возрастной динамики данной активности. Активность определяли в обоих компонентах крови в 2 группах самцов: животные возраста 4-5 недель ($n=4$) и 6-8-месячные животные ($n=6$). Также была предпринята попытка определения данной активности в плазме крыс возраста 2-4 суток ($n=4$).

Статистическому сравнению были подвергнуты первые две возрастные группы (у крыс в третьей из упомянутых групп (возраст 2-4 суток) активность используемым методом не определяется). Для сравнения применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (сравнение двух независимых выборок). Используемая численность групп в случае более высоких значений в группе большего объёма и при отсутствии перекрытия между выборками, обеспечивает обнаружение статистически значимых различий на 1%-м уровне значимости при однократном сравнении. Поскольку одни и те же две выборки крыс сравнивали по активности в плазме, а затем по активности в эритроцитах, вероятность ошибки I рода оценивалась с поправкой Бонферрони. Ввиду того, что группы малочисленны и характер распределения изучаемого признака неизвестен, результаты представлялись в виде первичных данных и медиан, что позволило избежать искажения и потери информации о выборках [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При использовании подхода, аналогичного определению глутатионпероксидазной активности с применением пероксида водорода, но с заменой глутатиона на гомоцистеин, в настоящем исследовании в плазме крови крыс была обнаружена выраженная, предположительно гомоцистеинпероксидазная, активность.

При концентрации H_2O_2 в реакционной среде, равной 198 мкМ, наблюдалась пропорциональность величины активности содержанию плазмы крови в реакционной среде вплоть до значения 0,79 мг белка плазмы на 1 мл реакционной смеси (в расчете на объём реакционной смеси до внесения ТХУ) при времени инкубации с перекисью 40 с (рис. 1). Скорость реакции оставалась практически постоянной в течение первых 40 с от внесения перекиси в реакционную смесь. Максимальная удельная величина выявленной активности достигалась при концентрации H_2O_2 в реакционной среде, равной 198 мкМ (при выбранной в исследовании концентрации гомоцистеина); как увеличение, так и уменьшение найденной концентрации в 2 и более раз приводило к снижению активности. Скорость окисления гомоцистеина при данной концентрации H_2O_2 в отсутствии биоматериала была незначительна, но учитывалась при оценке активности биоматериала.

В случае эритроцитов пропорциональность обнаруженной активности содержанию биоматериала наблюдалась вплоть до значения концентрации белка, равного 1,9 мг/мл реакционной смеси (время инкубации с H_2O_2 - 30 с) (рис. 2). При более низкой концентрации белка (1 мг/мл) скорость оставалась постоянной в течение 60 с.

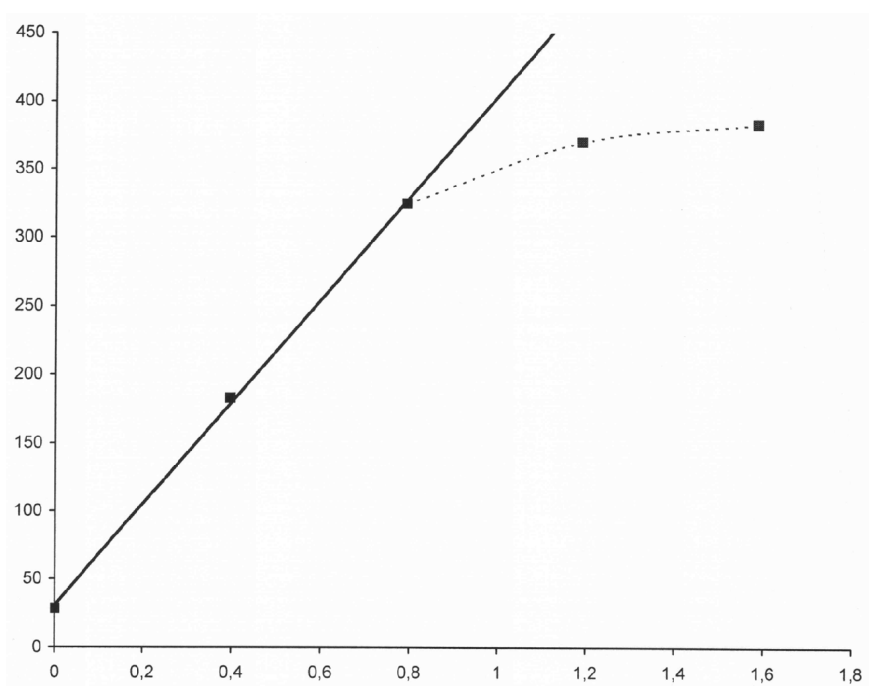


Рисунок 1.

Зависимость изменения концентрации гомоцистеина от содержания белка плазмы крови в реакционной смеси.

Использован смешанный в равных объемах образец плазмы крови от 5 половозрелых самок крыс.

Время инкубации - 40 с, начальная концентрация перекиси водорода - 198 мкМ.

Ось абсцисс - концентрация белка в реакционной смеси (мг/мл); ось ординат - величина изменения концентрации гомоцистеина в реакционной смеси (мкМ).

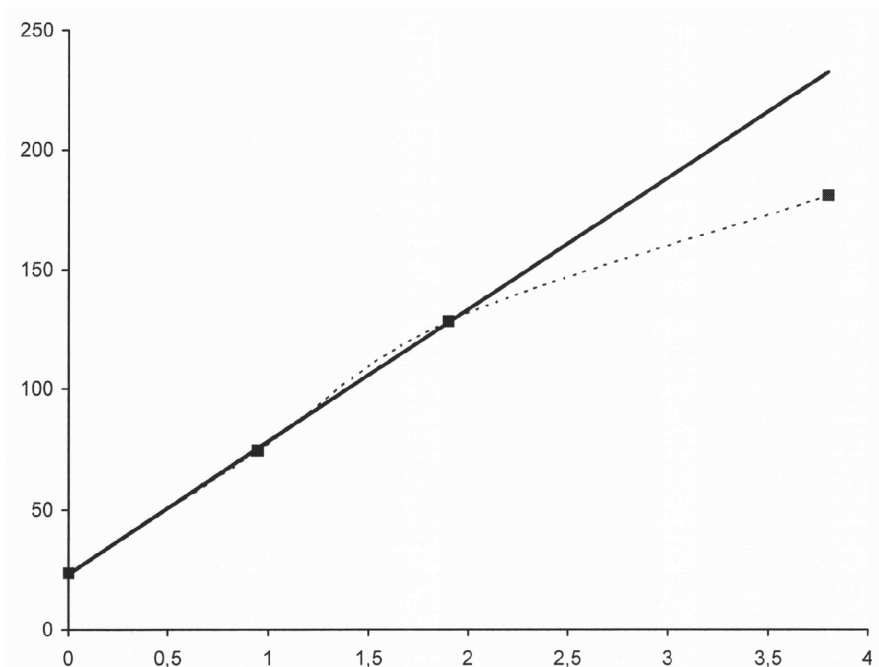


Рисунок 2.

Зависимость изменения концентрации гомоцистеина от содержания белка эритроцитов крысы в реакционной смеси.

Время инкубации - 30 с, начальная концентрация перекиси водорода - 198 мкМ.

Ось абсцисс - концентрация белка в реакционной смеси (мг/мл); ось ординат - величина изменения концентрации гомоцистеина в реакционной смеси (мкМ).

Принципиальным моментом в результатах является то, что преинкубация используемых количеств материала плазмы или эритроцитов с раствором гомоцистеина в трис-HCl-буфере с ЭДТА и NaN_3 длительностью 1 мин не приводит к каким-либо изменениям концентрации гомоцистеина. Убыль концентрации гомоцистеина отмечена только после добавления H_2O_2 .

В гомогенатах головного мозга исследуемая активность найдена крайне низкой и носящей следовой характер.

Уровни активности в плазме крови и эритроцитах самцов крыс двух возрастных групп представлены в таблице.

Таблица. Уровни активности в плазме крови и эритроцитах самцов крыс двух возрастных групп (нмоль гомоцистеина/с на 1 мг белка).

биоматериал	плазма		эритроциты	
	4-5 недель*	6-8 месяцев	4-5 недель*	6-8 месяцев
индивидуальные значения активности	4,5	8,4	0,95	1,40
	5,5	9,3	1,14	1,45
	6,4	10,6	1,16	1,52
	8,1	11,4	1,20	1,53
		12,1		1,67
		13,5		1,89
медиана	5,95	11,00	1,150	1,525

Примечание: * - $p=0,02$ при сравнении с группой животных возраста 6-8 месяцев. Всего проведено два сравнения: одно для плазмы, другое для эритроцитов (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони). Сравнение уровней активности между плазмой и эритроцитами не проводилось.

Обнаруженное в настоящем исследовании явление, бесспорно, вызывает интерес, и наиболее вероятным его объяснением, на наш взгляд, является наличие гомоцистеинпероксидазной активности в плазме и эритроцитах. Анализ продуктов реакции, образующихся в присутствии биоматериала, выполненный в дальнейших исследованиях, возможно, позволит более аргументированно обосновать существование гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной активности. В дальнейшем необходимо осуществить выделение в чистом виде и идентификацию соединения (или комплекса соединений), присутствующего в компонентах крови и обладающего данной активностью, определить кинетические константы как по гомоцистеину, так и по пероксиду водорода, использовать инкубационные среды на различных буферных растворах с различными значениями pH. Несомненный интерес представляет также проверка компонентов крови на наличие гомоцистеинпероксидазной активности в отношении других субстратов, содержащих пероксидные группы.

Интересно, что повышенные концентрации такого аминотиола как гомоцистеин часто рассматриваются как фактор атерогенеза и развития других патологических состояний, связанных, в частности, с преждевременным старением [10-12]. Возможно, обнаруженная активность выполняет протекторную функцию, состоящую в элиминации в одном процессе двух соединений, имеющих повреждающие эффекты (то есть пероксида водорода и гомоцистеина).

Результаты настоящего исследования указывают на увеличение обнаруженной активности в ходе постэмбрионального развития. Это, возможно, играет определённую роль в предотвращении повышения уровня свободного гомоцистеина.

Не исключено, что обнаруженная активность свойственна ферментам группы ГПО. Для глутатионпероксидазной активности плазмы крови крыс

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ОКИСЛЯЮЩАЯ ГОМОЦИСТЕИН

ранее были получены данные, позволяющие предполагать, что её активность в онтогенезе увеличивается [13], что сходно с представленными здесь данными по возрастной динамике обнаруженной активности.

ВЫВОДЫ. В плазме крови и эритроцитах крыс присутствует выраженная активность, устраняющая гомоцистеин в присутствии пероксида водорода.

Данная активность статистически значимо увеличивается в процессе постэмбрионального развития самцов крыс ($p=0,02$).

Автор выражает благодарность руководителю лаборатории биохимии, проф. А.В. Арутюняну, за полезную дискуссию, а также врачу лабораторной диагностики Ж.Н. Тумасовой, ст. научному сотруднику лаборатории фармакологии М.А. Петросян и зав. виварием, вет. врачу Л.И. Вороновой за содействие в проведении данного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А.* (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. Слово, М.
2. *Hurst R., Bao Y., Ridley S., Williamson G.* (1999) *Biochem. J.*, **338**, 723-728.
3. *Матюшичев В.Б.* (1990) Элементы статистической обработки результатов биохимического эксперимента. Издательство Ленинградского ун-та, Л.
4. *Гланц С.* (1998) Медико-биологическая статистика (пер с англ.). Практика, М.
5. *Разыграев А.В.* (2010) Успехи геронтол., **23**, 392-395.
6. *Sedlak J., Lindsay R.H.* (1968) *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
7. *Разыграев А.В.* (2004) Клинико-лаб. консилиум, **4**, 19-22.
8. *Gornall A.G., Bardawill C.G., David M.M.* (1949) *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
9. *Vera J.C.* (1998) *Anal. Biochem.*, **174**, 187-196.
10. *Carmel R., Jacobsen D.W.* (2001) Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, New York.
11. *Madonna R., De Caterina R.* (2007) in: Endothelial dysfunctions and vascular disease (De Caterina R., Libby P., eds.). Blackwell Publishing, pp. 129-139.
12. *Perez F.P., Ilie J.I., Zhou X., Feinstein D., Jurivich D.A.* (2007) *Medical Hypotheses*, **69**, 149-160.
13. *Chow C.K., Chen C.J.* (1980) *J. Nutr.*, **110**, 2460-2466.

Поступила: 27. 10. 2011.

**CATALYTIC ACTIVITY IN RAT BLOOD PLASMA AND ERYTHROCYTES
THAT ELIMINATES HOMOCYSTEINE WITH HYDROGEN PEROXIDE**

A.V. Razygraev

D.O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS, Mendeleevskaya liniya, 3, St. Petersburg,
199034 Russia; tel.: (812) 328-98-05; fax: (812) 328-23-61; e-mail: alexeyrh@mail.ru

The activity utilizing the free SH-form of homocysteine with H_2O_2 has been found in rat blood plasma and erythrocyte lysates with the use of the glutathione peroxidase assay with hydrogen peroxide and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and with the substitution of glutathione by homocysteine. The presence of rat plasma or erythrocyte lysate in a reaction mixture containing D,L-homocysteine, and H_2O_2 resulted in a marked acceleration of homocysteine concentration decrease (the decrease of homocysteine concentration was initiated by addition of hydrogen peroxide). The data obtained suggest the presence of homocysteine peroxidase activity in plasma and erythrocytes. The observed activity may be attributed to some known thiol-dependent enzymes. In the rat brain tissue, the level of the activity is extremely low (at the detection limit). The increase of the activity in blood components during post-embryonic ontogeny has also been shown. Probably, this activity contributes to low concentrations of free SH-form of homocysteine in the blood components.

Key words: aminothiols, sulfhydryl groups, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), homocysteine peroxidase, activity, age.