

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.15 : 612.128

©Разыграев

ГОМОЦИСТЕИНПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС. СТЕХИОМЕТРИЯ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ХАРАКТЕР РЕАКЦИИ

А.В. Разыграев

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

Ранее было показано, что присутствие плазмы крови крыс (а также гемолизата эритроцитов) в реакционной смеси, содержащей 43 мМ трис-НСl-буфер (рН 8,5), 0,29 мМ ЭДТА, 19,2 мМ NaN₃, 1 мМ DL-гомоцистеин (НСу), 198 мкМ H₂O₂ (инкубация при 37°C) приводит к значительному ускорению убыли НСу, вызванной добавлением H₂O₂. В настоящей работе представлены данные, указывающие на то, что обнаруженная активность является гомоцистеин:H₂O₂-оксидоредуктазной (гомоцистеинпероксидазной) активностью. Показано, что уровень пероксид-зависимого расхода НСу в присутствии плазмы крови соответствует стехиометрии гомоцистеин:H₂O₂-оксидоредуктазной реакции 2:1 (мольное соотношение). Обнаруженная активность сохраняется в белковой фракции плазмы, выделенной насыщением (NH₄)₂SO₄ до 50%; удельная активность увеличивается в результате выделения. Полученные результаты являются подтверждением того, что взаимодействие НСу и H₂O₂ катализирует белковый компонент плазмы по гомоцистеинпероксидазному пути. Данная активность не является проявлением тиолпероксидазной активности сывороточного альбумина и, вероятно, принадлежит внеклеточной форме глутатионпероксидазы (GPx3).

Ключевые слова: гомоцистеинпероксидаза, пероксид водорода, стехиометрия, плазма крови крыс.

ВВЕДЕНИЕ. Длительное повышенное содержание гомоцистеина в организме, вызванное дефицитом витаминов B₉, B₁₂ и B₆ или определенными генетическими нарушениями, зачастую рассматривается в качестве фактора развития ряда патологических состояний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, возрастные деменции, а также нарушений в развитии плода во время беременности [1-4]. Поскольку разные формы гомоцистеина могут различаться по своим токсическим эффектам, важное значение приобретают сведения о регуляции уровней отдельных форм гомоцистеина в организме.

Свободная SH-форма (собственно гомоцистеин) является предшественником в образовании других форм гомоцистеина [5]. Данная форма, благодаря наличию сульфгидрильной группы, теоретически должна быть способна переходить в окисленную дисульфидную форму

при взаимодействии с таким эндогенным окислителем как пероксид водорода. При этом вполне закономерным является вопрос о существовании ферментов, катализирующих окисление гомоцистеина посредством H_2O_2 .

Недавно нами было обнаружено, что добавление плазмы крови или лизата эритроцитов крыс в реакционную смесь, содержащую свободную SH-форму гомоцистеина, а также трис-HCl-буфер (pH 8,5), хелатирующий агент (этилендиаминтетраацетат, ЭДТА) и ингибитор гемопротеинов (азид натрия), приводит к выраженному ускорению убыли гомоцистеина, индуцированной внесением пероксида водорода [6]. Преинкубация плазмы или лизата эритроцитов с раствором вышеописанного состава (до внесения H_2O_2) не приводила к изменениям концентрации гомоцистеина. Убыль концентрации аминотиола наблюдалась только после добавления H_2O_2 . Скорость реакции в присутствии биоматериала значительно превышала скорость неферментативного окисления гомоцистеина пероксидом водорода, также наблюдаемого при использованных концентрациях реагирующих соединений (1 mM и 198 мкM для гомоцистеина и H_2O_2 , соответственно). Полученные данные являются подтверждением предположения о существовании гомоцистеинпероксидазной активности в исследованных компонентах крови. Найдены условия инкубации, при которых скорость убыли концентрации гомоцистеина сохраняется практически постоянной и наблюдается пропорциональность скорости реакции содержанию биоматериала (оптимальная объёмная доля неразведённой плазмы в реакционной смеси – 1/100, в случае использования эритроцитарной массы – 1/125), что позволяет проводить исследования сравнительного характера.

Настоящее сообщение направлено на дальнейшее обоснование факта существования гомоцистеинпероксидазной активности в плазме крови крыс. В связи с этим были поставлены конкретные задачи: 1) оценить соответствие между стехиометрией гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной реакции и уровнем пероксидзависимого расхода концентрации гомоцистеина, происходящего вследствие присутствия плазмы крови в реакционной смеси; 2) обосновать принадлежность обнаруженной активности к белковой фракции плазмы.

МЕТОДИКА.

Реактивы. В работе использовали 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту), DL-гомоцистеин, ("Sigma-Aldrich", США), метанол, ("Lachema", Чехия), сульфат аммония, ЭДТА, HCl, ("Реактив", Россия), трис ("MP (ICN) Biomedicals", США), физиологический раствор (0,9% NaCl), ("Эском", Россия); H_2O_2 , ("Усольехимпром", Россия).

Исследование было выполнено на крысах-самках (вес 240-300 г), полученных из питомника "Рапполово" РАМН (Санкт-Петербург), и содержащихся в виварии с режимом освещения 12 ч света: 12 ч темноты. Для оценки соответствия между уровнем ферментативного окисления гомоцистеина посредством пероксида водорода и стехиометрией гомоцистеинпероксидазной реакции решено использовать смешанный в равных объёмах образец плазмы от трёх крыс с различным разведением реакционной смеси и индивидуальные образцы от 5 крыс. Для обоснования принадлежности каталитической активности к белковой фракции был использован материал, полученный от шести животных; данное количество было определено как минимально необходимое в связи с выбором метода статистического сравнения групп. Поскольку форма распределения

изучаемого признака неизвестна, для статистического сравнения было решено использовать непараметрический критерий. В случае обнаружения активности только в одной из выделенных белковых фракций статистическому сравнению могут быть подвергнуты лишь 2 группы (вторая группа – значения активности для образцов цельной плазмы от тех же крыс), в связи с чем может быть использован парный W-критерий Уилкоксона. Применение данного критерия для обнаружения статистически значимых различий на 5%-ом уровне значимости требует как минимум 6 вариант в каждой из двух групп [7].

Декапитацию крыс проводили в течение второй половины дневной фазы суток после наркотизации трихлорметаном. Кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА), объем собранной крови для каждой пробирки – 1-1,5 мл. Плазму отделяли от клеток центрифугированием при 1600 g в течение 15 мин, замораживали при -85°C , после размораживания использовали для исследования. Для выделения белковых фракций использовали раствор сульфата аммония различной степени насыщенности [8]. Полунасыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (при комнатной температуре) выделяли первую фракцию белка плазмы (фракция I): насыщенный водный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в равном объеме смешивали с образцом плазмы, предварительно разбавленным дистиллированной водой в 10 раз, выдерживали 5 мин, центрифугировали 10 мин при 1000 g без охлаждения. Белковый осадок промывали 2 раза полунасыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с центрифугированием при 4°C в течение 5 мин при 15000 g. Аналогичным образом также выделяли белковые фракции при насыщении раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, равном 66,7% и 83,3% (т.е. фракции II и III). Отмытый осадок растворяли в объеме физиологического раствора (0,9% NaCl (вес/объем)), соответствующим объему плазмы, из которого белковый осадок был выделен; полученный раствор белковой фракции использовали для определения изучаемой активности в одной серии с соответствующим образцом плазмы.

Определение каталитической активности проводили при 37°C в реакционной смеси, содержащей 43 mM трис-HCl-буфер (pH 8,5), 0,29 mM ЭДТА, 19,2 mM NaN_3 , 0,25 mM DL-гомоцистеин, 39,7 мкМ H_2O_2 и биоматериал (плазма либо выделенная из плазмы белковая фракция). К 360 мкл раствора гомоцистеина на трис-HCl-буфере с ЭДТА и азидом натрия добавляли 40 мкл биоматериала, предварительно разбавленного дистиллированной водой. Для оценки уровня неферментативного окисления вместо биоматериала в реакционную смесь вносили дистиллированную воду (40 мкл). В случае оценки зависимости уровня окисления гомоцистеина от времени инкубации с H_2O_2 использовали 3 предварительных разведения смешанного образца плазмы (до внесения в реакционную смесь) – в 10, 20 и 40 раз. Для сравнения величин активности между плазмой и соответствующими белковыми фракциями биоматериал во всех случаях разводили в 14,3 раза. После добавления 40 мкл биоматериала (либо дистиллированной воды) пробы преинкубировали в течение 1 мин, после чего добавляли 16 мкл 1,032 mM H_2O_2 . Концентрацию пероксида водорода определяли по величине поглощения при 240 нм с использованием коэффициента молярного поглощения, равного $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [9]; приготовленный 20 mM раствор с величиной поглощения 0,872 разбавляли дистиллированной водой *ex tempore* в 19,38 раз до концентрации, равной 1,032 mM.

Время инкубации для оценки динамики окисления составляло 0-70 с от момента внесения H_2O_2 , а для сравнения уровней активности между плазмой и белковыми фракциями – 0 и 40 с. Реакцию останавливали

ГОМОЦИСТЕИНПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

добавлением 80 мкл 30% (масса/объём) трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробы центрифугировали при 1000 g (10 мин), в супернатанте определяли содержание непрореагировавшего гомоцистеина с использованием реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТНБ). Для этого к 360 мкл супернатанта добавляли 1,73 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (pH 8,5), через 7,5 мин вносили 15 мкл раствора ДТНБ в метаноле (4 мг/мл абсолютного метанола). Каждую пробу фотометрировали через следующие 7,5 мин при 412 нм. Для расчётов концентрации гомоцистеина использовали коэффициент молярного поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоата при 412 нм для растворов в щелочных буферах, равный $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (по стехиометрии реакции на 1 моль образующегося 2-нитро-5-меркаптобензоата приходится 1 моль прореагировавшего с ДТНБ гомоцистеина) [10].

Концентрацию белка в биоматериале определяли по методу Лоури [11].

Результаты представляли в виде первичных данных и медиан с минимальным и максимальным значениями для каждой выборки (Me [min; max]) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При использовании концентраций гомоцистеина и пероксида водорода, равных, соответственно, 0,25 мМ и 39,7 мкМ, с последующим определением уровней содержания непрореагировавшего гомоцистеина в пробах посредством реакции с ДТНБ по вышеописанной методике было установлено, что в данных условиях инкубации (вплоть до 70 с) не регистрируются изменения начальной концентрации гомоцистеина, обусловленные спонтанной реакцией с H_2O_2 (т.е. протекающей также при отсутствии биоматериала в реакционной смеси). Убыль концентрации гомоцистеина регистрировалась только в случае присутствия биоматериала. Принципиальным моментом также является то, что убыль гомоцистеина наблюдается только после добавления H_2O_2 (сам по себе материал плазмы в указанных разведениях в ходе преинкубации длительностью 1 мин не оказывает влияние на начальную концентрацию гомоцистеина в реакционной смеси).

По аналогии с глутатионпероксидазной реакцией, предполагаемая схема гомоцистеинпероксидазной реакции со стехиометрическими коэффициентами выглядит следующим образом:



где HCy-SH – собственно гомоцистеин (свободная SH-форма), HCy-S-S-HCy – окисленная форма гомоцистеина (гомоцистин).

Используемая начальная концентрация пероксида водорода в реакционных средах равна 39,7 мкМ. По стехиометрии реакции, ожидаемый максимальный расход концентрации гомоцистеина в два раза превосходит начальную концентрацию H_2O_2 (т.е. должен быть равен 79,4 мкМ) при условии, что весь пероксид водорода утилизируется в реакционной смеси по гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазному пути. Исходя из данных, представленных на рисунке, при разведении смешанного образца плазмы реакционной смесью в 104 и 208 раз при времени инкубации, равном 70 с, наблюдается отчётливое снижение скорости убыли гомоцистеина; при этом значение ΔOD за 70 с при разведении плазмы в 104 раза практически совпадает со значением ΔOD за 90 с при разведении плазмы в 208 раз. Данный переход на плато практически идентичного уровня позволяет приблизительно оценить максимальный расход гомоцистеина при выбранной концентрации H_2O_2 . Концентрации гомоцистеина в первичной реакционной смеси, равной 0,25 мМ, соответствует значение оптической плотности во вторичной реакционной

смеси, равное 0,507 (определено по известному значению коэффициента молярного поглощения 2-нитро-5-меркаптобензоата с пересчётом на разведения). Следовательно, значение ΔOD , равное 0,1635 (среднее между ΔOD за 70 с при разведении плазмы в 104 раза и ΔOD за 90 с при разведении плазмы в 208 раз), соответствует убыли концентрации гомоцистеина, равной 80,6 мкМ, что практически совпадает со значением 79,4 мкМ, предсказанным на основании стехиометрии гомоцистеинпероксидазной реакции.

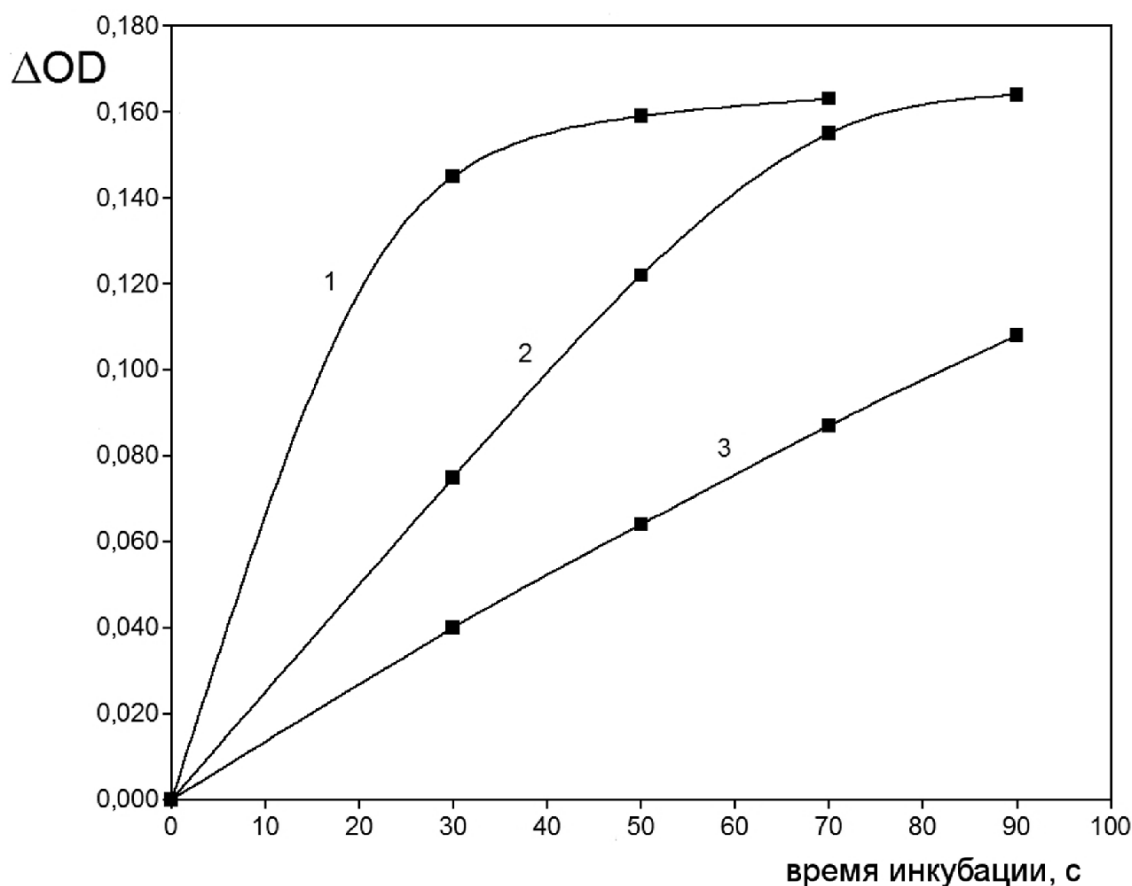


Рисунок.

Зависимость изменения величины оптической плотности при 412 нм, вызванного присутствием плазмы в первичной реакционной среде, от времени инкубации с перекисью водорода (при различных разведениях плазмы).
Обозначения: ΔOD — разность в оптической плотности при 412 нм между пробой с длительностью инкубации, равной 0 с, и пробой с соответствующим временем инкубации, указанным по оси абсцисс.

- 1 — при разведении плазмы в 104 раза (предварительно в 10 раз с последующим разведением реакционной смесью в 10,4 раза, т. е. $10 \cdot 10,4$),
- 2 — при разведении плазмы в 208 раз ($20 \cdot 10,4$),
- 3 — при разведении плазмы в 416 раз ($40 \cdot 10,4$).

При повторной проверке величины расхода гомоцистеина с использованием индивидуальных образцов плазмы от 5 крыс (разведение плазмы реакционной средой в 104 раза, время инкубации — 90 с) величина ΔOD (Me [min; max]) составила 0,157 [0,155; 0,159] единиц оптической плотности; соответствующий

ГОМОЦИСТЕИНПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

максимальный расход гомоцистеина – 77,4 [76,4; 78,4] мкМ. Таким образом, выявленный расход гомоцистеина вновь близок к ожидаемой величине, равной 79,4 мкМ, что свидетельствует о мольном соотношении 2:1 в реакции между гомоцистеином и H_2O_2 .

Определение каталитической активности в белковых фракциях плазмы показало присутствие активности в одной из выделенных фракций, а именно во фракции I (с применением вышеописанной методики активность во фракциях II и III не определяется). Значения удельной активности во фракции I (нмоль израсходованного гомоцистеина/(мин·мг белка)) образуют следующий ряд (значения упорядочены по возрастанию):

270,9; 317,6; 374,0; 406,7; 415,2; 429,9 (Ме – 390,30).

Им соответствуют следующие значения удельной активности в плазме (упорядочены по предыдущему ряду, т. к. варианты попарно связаны):

149,9; 156,2; 186,0; 197,1; 190,7; 199,4 (Ме – 188,33).

Очевидно, что исследуемая каталитическая активность сохраняется в белковой фракции. Более того, удельная активность возрастает в результате выделения фракции I. В W-тесте Уилкоксона выявлены только положительные разности между попарно связанными вариантами. Поскольку минусовые разности не выявлены (т.е. в каждом отдельном случае удельная активность для фракции I выше, чем в плазме, из которой данная фракция была выделена), нулевая гипотеза о случайном характере выявленных различий опровергается на более высоком уровне значимости, чем 0,05 (вероятность ошибки I рода составляет менее 3,2%). Это означает, что различия в удельной активности между фракцией I и плазмой являются статистически значимыми.

Таким образом, результаты настоящего исследования являются весомым подтверждением того, что активность, присутствующая в плазме крови крыс и устраняющая свободную SH-форму гомоцистеина с участием пероксида водорода, является гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной (гомоцистеинпероксидазной) активностью. В дальнейшем следует определить принадлежность данной активности конкретному белку (либо группе белков) плазмы и исследовать кинетические характеристики.

Присутствие высокой концентрации азидата натрия в реакционной среде исключает какое-либо участие гемопротеинов, обладающих пероксидазной активностью, в катализе исследуемой реакции [12] (в связи с этим также уместно подчеркнуть, что измерялась убыль тиолового субстрата, а не H_2O_2). Выявленная активность не является проявлением тиолпероксидазной активности сывороточного альбумина, т.к. альбумины осаждаются более высоким насыщением сульфатом аммония, чем 50% [13, 14]. Весьма вероятно принадлежность исследуемой активности внеклеточной форме селензависимой глутатионпероксидазы (GPx3), которая, как известно, осаждается относительно низким насыщением $(NH_4)_2SO_4$ (из плазмы человека GPx3 выделяют насыщением до 33% [15] или 40% [16]). В пользу данного предположения также говорит тот факт, что в функциональном отношении GPx3 может являться не только глутатион-, но также тиоредоксин- и цистеинпероксидазой [17, 18].

Независимо от вероятной принадлежности гомоцистеинпероксидазной активности уже известному ферменту, данную активность следует рассматривать как отдельную функцию, заключающуюся в одновременной элиминации свободной SH-формы гомоцистеина и H_2O_2 . Следует особо подчеркнуть важность изучения обнаруженной активности в контексте медицинских исследований, направленных на выяснение причин токсического

действия гипергомоцистеинемии. Свободная SH-форма, устраняемая в гомоцистеинпероксидазной реакции, является предшественником гомоцистеинтиолактона, считающегося одной из наиболее токсичных форм гомоцистеина [1]. По различным данным, примерно 1-2,5% общего гомоцистеина плазмы крови находится в виде свободной SH-формы, тогда как основную долю циркулирующего гомоцистеина составляют окисленные формы, главным образом связанные с белками [1, 3, 5]. Не исключено, что гомоцистеинпероксидазная активность вносит определенный вклад в поддержание низкой концентрации свободной SH-формы гомоцистеина, образуя его дисульфидную форму (гомоцистин) и тем самым препятствуя её превращению в гомоцистеинтиолактон. В случае нарушения подобного механизма утилизации гомоцистеина можно предполагать усиление токсических эффектов гипергомоцистеинемии.

ВЫВОДЫ. Полученные данные по уровню расхода гомоцистеина в реакции окисления пероксидом водорода, обусловленной присутствием плазмы крови в реакционной смеси, соответствуют стехиометрии гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной (гомоцистеинпероксидазной) реакции.

Обнаруженная каталитическая активность плазмы принадлежит белковой фракции. При выделении фракции, сохраняющей каталитические свойства, наблюдается возрастание удельной активности.

Результаты проведенного исследования указывают на ферментативную природу катализа окисления гомоцистеина пероксидом водорода в присутствии плазмы крови.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Жлоба А.А. (2009) Клинико-лаб. консилиум, **26**, 49-60.
2. Herrmann W., Obeid R. (2011) Clin. Chem. Lab. Med., **49**, 435-441.
3. Madonna R., De Caterina R. (2007) in: Endothelial dysfunctions and vascular disease (De Caterina R. and Libby P. eds.). Blackwell Publishing, pp. 129-139.
4. Ueland P.M., Vollset S.E. (2004) Clinical Chemistry, **50**, 1293-1295.
5. Carmel R., Jacobsen D.W. (2001) Homocysteine in Health and Disease. Cambridge University Press, New York.
6. Разыграев А.В. (2012) Биомед. химия, **58**, 592-598.
7. Гланц С. (1998) Медико-биологическая статистика (пер с англ.). Практика, М.
8. Burgess R.R. (2009) Methods Enzymol., **463**, 332-337.
9. Cheeseman J.M. (2006) J. Exper. Bot., **57**, 2435-2444.
10. Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. (1979) Analyt. Biochem., **94**, 75-81.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.G. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
12. Моин В.М. (1986) Лаб. дело, **12**, 724-727.
13. Cha M.-K., Kim I.-H. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., **222**, 619-625.
14. Hurst R., Bao Y., Ridley S., Williamson G. (1999) Biochem. J., **338**, 723-728.

15. Broderick D.J., Deagen J.T., Whanger P.D. (1987) J. Inorgan. Biochem., **30**, 299-308.
16. Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H. (1987) Arch. Biochem. Biophys., **256**, 677-686.
17. Björnstedt M., Xue J., Huang W., Akesson B., Holmgren A. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 29382-29384.
18. Takebe G., Yarimuzu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S., Takahashi K. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 41254-41258.

Поступила: 10. 05. 2012.

HOMOCYSTEINE PEROXIDASE ACTIVITY IN RAT BLOOD PLASMA: STOICHIOMETRY AND ENZYMATIC CHARACTER OF THE REACTION

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

Recently it was shown that the presence of rat blood plasma (as well as of erythrocyte hemolysate) in the reaction mixture containing 43 mM Tris-HCl-buffer (pH 8.5), 0.29 mM EDTA, 19.2 mM sodium azide, 1 mM DL-homocysteine (Hcy), and 198 mM hydrogen peroxide (incubation at 37°C) results in a significant acceleration of the decrease in Hcy concentration caused by addition of H₂O₂. In this paper, we present data indicating that the observed activity is the homocysteine:H₂O₂-oxidoreductase (homocysteine peroxidase) activity. It has been found that the level of H₂O₂-dependent Hcy decrease observed in the presence of blood plasma corresponds to homocysteine:H₂O₂-oxidoreductase reaction stoichiometry of 2:1 (mole ratio). The activity observed belongs to the protein fraction isolated by saturation with ammonium sulfate to 50%; the specific activity in this protein fraction is significantly higher than that in the whole plasma. The results confirm the hypothesis that the reaction between Hcy and H₂O₂ at the presence of plasma is catalyzed by the protein component of plasma and this is the homocysteine peroxidase reaction. This activity is not associated with serum albumin, which is known to function as thiol peroxidase, and probably belongs to extracellular glutathione peroxidase (Gpx3).

Key words: homocysteine peroxidase, hydrogen peroxide, stoichiometry, rat blood plasma.