

УДК 577.15 : 612.128
©Коллектив авторов

ТИОЛПЕРОКСИДАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И 5,5'-ДИТИБИС(2-НИТРОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ)

А.В. Разыграев, К.И. Таборская, М.А. Петросян, Ж.Н. Тумасова*

НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3;
тел.: (812) 328-98-29; факс: (812) 328-23-61; эл. почта: alexeyrh@mail.ru

Ранее установлено, что внеклеточная глутатионпероксидаза (GPx3) из плазмы человека способна утилизировать цистеин (Cys-SH) в качестве тиолового субстрата вместо глутатиона (GSH). В настоящей работе подтверждена гипотеза о том, что плазма крови крыс обладает тиолпероксидазной активностью не только по отношению к GSH (глутатионпероксидазная активность), но и по отношению к Cys-SH и гомоцистеину (Hcy-SH). Мольное соотношение между каждым из тиоловых субстратов и пероксидом водорода в катализируемой реакции составляет 2:1, удельная активность возрастает при выделении соответствующей белковой фракции. При фиксированной концентрации тиола (230 мкМ) выявляется насыщение по H_2O_2 с v_{max} каж., равной 100, 128 и 132 нмоль H_2O_2 / (с × мл плазмы) для DL-Cys-SH, L-GSH и DL-Hcy-SH, соответственно. Ранговое распределение активностей со всеми тремя тиоловыми субстратами среди белковых фракций плазмы полностью идентично (вероятность случайного полного совпадения – менее 0,01), что статистически подтверждает тесную связь цистеинпероксидазной, гомоцистеинпероксидазной и глутатионпероксидазной активностей между собой. Наиболее вероятным выводом из этого является способность GPx3 крысы использовать все три тиола в качестве окисляемых субстратов. Возможно, тиолпероксидаза вносит вклад в преобладание цистина (Cys-SS-Cys) над Cys-SH в плазме крови. Можно предположить, что при гипергомоцистеинемии тиолпероксидаза плазмы крови, модулируя редокс-соотношение Hcy, вносит вклад в выраженность токсических эффектов последнего.

Ключевые слова: цистеин, гомоцистеин, стехиометрия, реактив Элмана, глутатионпероксидаза

DOI 10.18097/PBMC20166204431

ВВЕДЕНИЕ

Селеновые глутатионпероксидазы (GPx) (КФ 1.11.1.9, 1.11.1.12) – ферменты, осуществляющие катализ восстановления пероксидов (ROOH) с использованием глутатиона (GSH) в качестве донора электронов по схеме:



где GSSG – окисленная форма глутатиона, ROH – гидрокси-производное (либо вода в том случае, если ROOH – H_2O_2).

Первым открытым ферментом этого семейства стала внутриклеточная, цитозольная глутатионпероксидаза, называемая также “классической” (GPx1), и долгое время оставалась единственной известной селеновой глутатионпероксидазой [1]. Для “селеновой GSH-пероксидазы” было установлено, что GSH является едва ли не единственным тиоловым субстратом, эффективным в одном из двух тиол-зависимых этапов каталитического цикла [2]. В отношении некоторых других тиолов сообщалось об их ингибирующем эффекте на GPx [3], в частности, есть сообщение об ингибирующем действии гомоцистеина (Hcy-SH) на GPx1 [4].

Вывод об узкой субстратной специфичности (необходимость участия GSH в реакции), сформированный на основании исследований GPx1, может невольно экстраполироваться на другие ферменты семейства GPx. Большинство описаний GPx

содержит упоминание о GSH; об альтернативных тиоловых субстратах для других изоферментов говорится довольно редко. В этом можно убедиться, ознакомившись с описанием GPx (КФ 1.11.1.9) в базе <http://www.brenda-enzymes.org/>: почти во всех случаях в качестве тиолового субстрата приводится GSH, лишь в трёх случаях из более чем ста упоминаются альтернативные субстраты: тиоредоксин и цистеинсодержащие протамины; для GPx4 (КФ 1.11.1.12), помимо GSH, упоминаются пептиды со смежными цистеиновыми остатками (по состоянию на апрель 2015). Что касается GPx3, внеклеточной, секретируемой GPx, то исследователи периодически упоминают, что хорошими восстановителями этого фермента являются тиоредоксин и глутаредоксин [1], но про такой субстрат как цистеин (Cys-SH) упоминается редко [5].

Однако тот факт, что Cys-SH является потенциальным тиоловым субстратом для GPx3 человека, установлен уже достаточно давно [6], и об этом важно помнить, ведь Cys-SH – мажорный низкомолекулярный тиол плазмы крови [7]. Показано, что дитиотреитол и меркаптоэтанол также служат хорошими субстратами для GPx3 [6], что, несомненно, уже позволяет говорить о широкой субстратной специфичности этого изофермента по отношению к тиолам. Помимо Cys-SH, среди тиолов плазмы крови особый интерес представляет Hcy-SH как возможный субстрат для окисления GPx: в норме концентрация Hcy-SH в плазме очень низка, однако доля Hcy-SH

* - адресат для переписки

в общем пуле Hcy плазмы крови бывает повышена при гипергомоцистеинемии [8]. В таком случае, ферментативное окисление Hcy-SH может иметь значение в регуляции токсических эффектов данного метаболического нарушения.

Нами была поставлена цель изучить плазму крови лабораторных крыс – животных, часто используемых в качестве модельных объектов биомедицинских исследований – для выявления потенциальных тиолпероксидазных активностей не только с использованием GSH, но и других низкомолекулярных тиоловых субстратов, и первые результаты опубликованы в работах [9-11]. При этом использовался реактив Элмана (5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), ДТНБ), равноэффективный для детекции любого из тиолов. В настоящей статье изложено исследование тиол:H₂O₂-оксидоредуктазных активностей плазмы крови крыс по отношению к Cys-SH, Hcy-SH и GSH. В задачи работы входила последовательная проверка следующих конкретных гипотез (через проверку их следствий): катализатор реакции имеет белковую природу; катализируемая реакция является тиолпероксидазной реакцией; катализатором является глутатионпероксидаза плазмы крови. Выполненная проверка гипотез, как будет показано ниже, удовлетворяет критерию Поппера, то есть через проверку их следствий есть возможность их опровержения.

МЕТОДИКА

Реактивы

Список использованных реактивов идентичен изложенному в работе [10], L-GSH и DL-цистеин (гидрохлорид) получены от “Sigma-Aldrich” (США), трихлоруксусная кислота (ТХУ) – от фирмы “Вектон” (Россия).

Биоматериал

Работа проведена на половозрелых самцах и самках крыс (*Rattus norvegicus*) линии “Вистар” (вес 220-300 г), полученных из ФГУП “Питомник лабораторных животных “Рапполово” РАМН” и содержащихся в условиях вивария “НИИАГиР имени Д.О. Отта” с режимом освещения 12 ч света: 12 ч темноты. Далее, если указан возраст крысы, то использовалось потомство полученных животных, рождённое и выращенное в условиях вивария. Необходимое количество животных (объёмы выборок) оценивалось в каждом опыте, исходя из разрешающей способности методов статистических сравнений [12], и указано при изложении соответствующих результатов.

Для получения крови крыс декапитировали после наркотизации трихлорметаном. Также использовали метод забора крови, описанный в работе [13]. Кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (Vacuette, КЗЕ), объём собранной крови для каждой пробирки составлял 1-1,5 мл. Плазму отделяли от форменных элементов центрифугированием при 1600 g в течение 15 мин. Выделение белковых

фракций проводили по методу, описанному в работах [10, 11, 14, 15], используемые диапазоны насыщения (NH₄)₂SO₄ – в пределах от 0 до 89%. Белковые фракции растворяли в физиологическом растворе (0,9% NaCl (масса/объём)) с максимальным концентрированием в 3,66 раз по отношению к плазме. Биоматериал замораживали при -85°C, после размораживания использовали для исследования.

Определение ферментативной активности

Использовали модифицированный метод определения активности GPx с применением H₂O₂ и ДТНБ; окисляемыми тиоловыми субстратами служили L-глутатион, DL-цистеин и DL-гомоцистеин. Используемые в настоящем исследовании варианты метода описаны в работах [10, 15, 16], здесь приводится их обобщённое описание. Реакционная смесь для проведения тиолпероксидазной реакции (реакционная смесь I) состояла из 0,084 М трис-HCl-буфера (pH 8,5), 0,28 мМ ЭДТА, 19,2 мМ NaN₃, одного из трёх тиоловых субстратов (0,1-1,1 мМ), 0-0,209 мМ H₂O₂ и биологического материала (разведённой плазмы либо белковой фракции). Время инкубации с H₂O₂ варьировали от 0 до 300 с. Температура инкубации – 37°C. Реакцию останавливали добавлением ТХУ до конечной концентрации 4,8% (масса/объём). После отделения денатурировавшего белка центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин при комнатной температуре надосадочную жидкость использовали для определения концентрации непрореагировавшего тиола в реакции с ДТНБ (реакционная смесь II). Надосадочную жидкость смешивали с 100 мМ трис-HCl-буфером (pH 8,5), содержащим 0,34 мМ ЭДТА (тот же буфер, который использовали для приготовления реакционной смеси I), в объёмном соотношении ≤5:24 (при превышении данного соотношения буферная ёмкость смеси II недостаточна для поддержания необходимого pH). Далее добавляли избыток ДТНБ (раствор в абсолютном метаноле, 4 мг/мл) по отношению к тиолу с последующей регистрацией оптической плотности при 412 нм. Время инкубации с ДТНБ – 7,5-12 мин при комнатной температуре, в каждой серии определений использовалось одно время инкубации для всех проб. Для расчетов концентрации тиола использовали коэффициент молярного поглощения 2-нитро-5-тиобензоата при 412 нм, равный 14150 М⁻¹×см⁻¹ (по стехиометрии реакции на 1 моль образующегося 2-нитро-5-тиобензоата приходится 1 моль прореагировавшего тиола) [17]. Выбор способа определения тиолов в реакции с ДТНБ обусловлен тем, что его чувствительность достаточна для работы с используемыми концентрациями тиолов, метод характеризуется хорошей воспроизводимостью, что отмечают и другие авторы [18]. Замечание Wendel [2], касающееся возможной интерференции низкомолекулярных тиолов, уже содержащихся в биоматериале, при использовании ДТНБ, в нашем случае может не приниматься во внимание по той причине, что плазма имеет низкое содержание свободных низкомолекулярных восстановленных тиолов [7] и имеет итоговое разведение более чем

в 100 раз в большинстве случаев при использовании данной методики (то же справедливо для плазмы человека, которая по методике разбавляется более чем в 10 раз реакционной смесью [15]).

Концентрацию H_2O_2 определяли как описано в работе [10]. Концентрацию белка в биоматериале (для выражения удельной ферментативной активности) определяли по методу Лоури; при работе с цельной плазмой определение общего белка также контролировали на биохимическом анализаторе UniCel DxС 600 ("Beckman Coulter", США). После подтверждения протекания реакции по тиолпероксидазному пути, для выражения скорости реакции через расход H_2O_2 использовали соответствующую стехиометрию (2 моля тиола : 1 моль H_2O_2).

Представление данных и их статистическая обработка

Поскольку закон распределения у изучаемых признаков неизвестен, и мы вправе не делать предположения о нём (особенно ввиду малочисленности выборок, что делает невозможным выявление даже достаточно серьёзных отклонений от нормальности) [12, 19], выборки характеризовали

с использованием медиан, минимумов и максимумов (Me [min—max]), а статистические сравнения (между плазмой и белковыми фракциями) проводили с использованием непараметрического, свободного от формы распределения, парного критерия Уилкоксона [12]. Точные значения вероятности ошибки I рода высчитывались в программной среде R (версия 2.13.1). Для оценки совпадения распределений трёх тиолпероксидазных активностей среди белковых фракций использовался коэффициент конкордации Кендалла (W), рассчитываемый в среде R по алгоритму, представленному Wickerhauser (<http://www.math.wustl.edu/~victor/classes/ma322/r-eg-17>, дата обращения – июль 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ускорение окисления GSH, Cys-SH и Hcy-SH пероксидом водорода в присутствии плазмы

Внесение плазмы крови крыс в реакционную смесь, содержащую тиол, хелатирующий агент (ЭДТА), ингибитор гемопротеинов, обладающих пероксидазной активностью (NaN_3), приводило к значительному ускорению убыли тиола, индуцированной добавлением H_2O_2 (рис. 1А,В,Д).

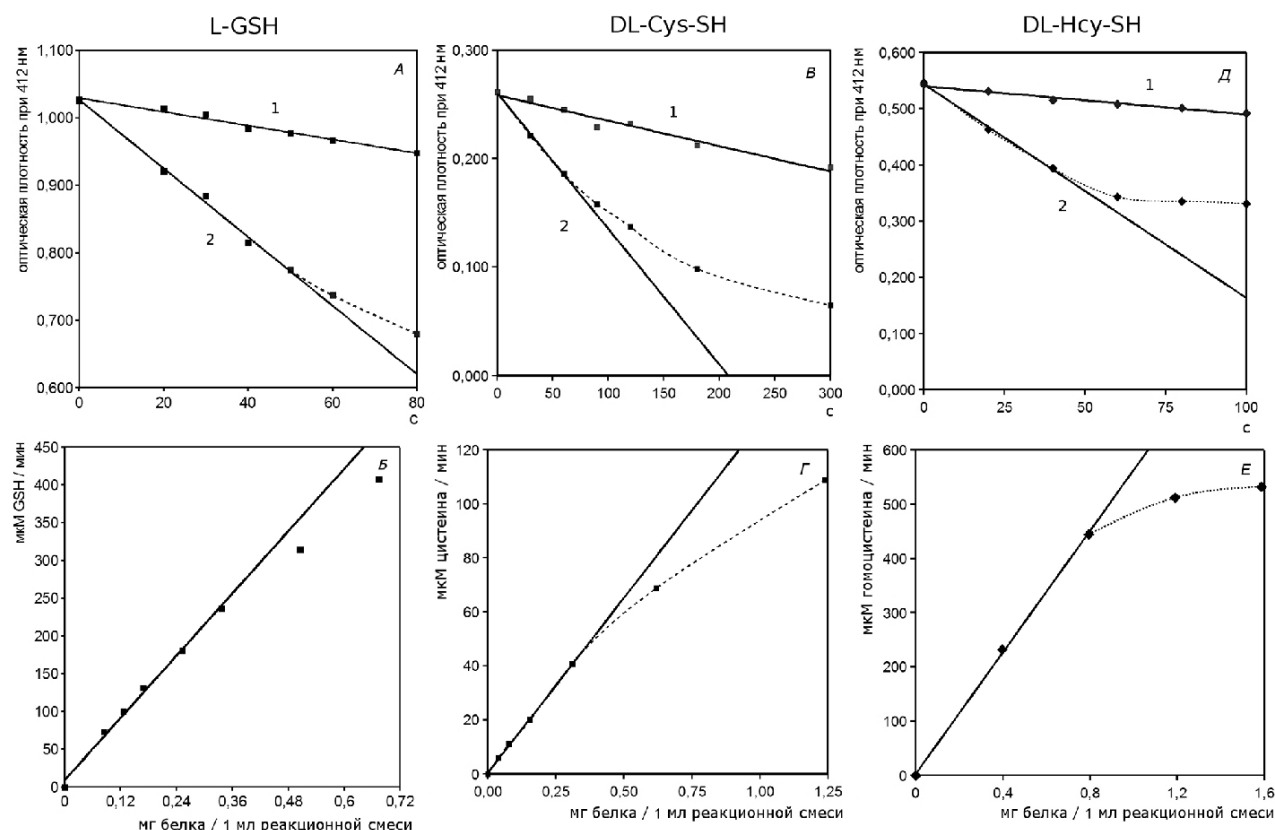


Рисунок 1. Скорости реакций окисления тиолов пероксидом водорода и их зависимость от концентрации белка в реакционной смеси. А, В, Д - зависимость оптической плотности реакционной смеси II после окрашивания реактивом Эллмана от длительности инкубации (с) с пероксидом водорода в реакционной смеси I (1 - неферментативное окисление тиола пероксидом, 2 - окисление тиола в присутствии плазмы). Б, Г, Е - зависимость скорости реакции (мкМ тиола/мин), обусловленной биоматериалом, от концентрации белка (мг/мл). Начальные концентрации субстратов: А, Б - 1,1 мМ L-GSH, 192 мкМ H_2O_2 ; В, Г - 125 мкМ DL-Cys-SH и 40,8 мкМ H_2O_2 ; Д, Е - 1,1 мМ DL-Hcy-SH и 198 мкМ H_2O_2 . Итоговые разведения плазмы реакционной смесью: А - 208, В - 260, Д - 104 раза. Суммарное разведение реакционной смеси I при добавлении ТХУ и при сборе реакционной смеси II: А, Б - 14,076; В, Г - 6,972; Д, Е - 27,887 раза. Использовались смешанные образцы от 3-5 животных.

ТИОЛПЕРОКСИДАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС

В используемых условиях выявляется постоянная скорость суммарной реакции в течение первых 40-60 с от момента внесения H_2O_2 . В тех же условиях с длительностью инкубации, равной 40 с, выявляется диапазон, в котором скорость реакции, обусловленная присутствием биоматериала (то есть за вычетом скорости спонтанного взаимодействия тиола и H_2O_2), пропорциональна концентрации белка в реакционной смеси (рис. 1Б,Г,Е). Необходимо отметить, что сам по себе материал плазмы крыс в указанных разведениях в течение 40 с не оказывает влияние на начальную концентрацию тиолов в реакционной смеси – убыль тиола наблюдается только после добавления H_2O_2 .

Сравнение активностей в цельной плазме и в белковой фракции плазмы

Гипотеза о белковой природе катализатора опровергается в том случае, если активность не принадлежит белковой фракции (присутствует возможность опровержения гипотезы). На смешанных образцах плазмы от 3 крыс с повтором на индивидуальных образцах от 6 животных была установлена принадлежность исследуемых активностей белковым фракциям, осаждаемым в диапазоне насыщения сульфатом аммония, равном 0-56%. В опытах с Cys-SH также было выявлено, что наибольшая часть общей активности приходится на белковую фракцию, осаждаемую в 30-44%-ом диапазоне. Во фракциях, выделенных более высоким насыщением, чем 56%, активности в используемых условиях не выявлялись.

Для образцов белковой фракции, выделенной из индивидуальных образцов плазмы и сохраняющей исследуемую активность, значения удельной активности во всех случаях выше, чем в плазме, из которой фракция была выделена. В каждом из трёх случаев нулевая гипотеза о случайном характере выявленных различий опровергается с вероятностью ошибки I рода, равной 3,125% (табл. 1).

Влияние температурной обработки на исследуемые активности

Гипотеза о белковой природе катализатора может быть опровергнута отсутствием снижения

удельной активности при прогреве. В результате 5-минутной инкубации при 60°C водного раствора пулированной плазмы (концентрация белка – 4,32 мг/мл) активности по отношению ко всем трём тиолам снижены до 17-24% от уровней, выявляемых в непрогретом растворе; 10-минутный прогрев приводит к практически полному исчезновению всех трёх активностей.

Мольное соотношение в реакции между тиолом и H_2O_2

Глутатионпероксидазная и другие тиолпероксидазные реакции характеризуются мольным соотношением между тиолом и ROOH, равным 2:1, соответственно (см. схему реакции в разделе “Введение”). Соответственно, ожидаемый максимальный расход концентрации тиола должен в два раза превосходить начальную концентрацию H_2O_2 при условии, что весь пероксид водорода утилизируется в реакционной смеси по тиол: H_2O_2 -оксидоредуктазному пути. При значительном отклонении экспериментально найденного значения от ожидаемого было бы получено опровержение гипотезы о катализе реакции посредством тиолпероксидазы. Однако, экспериментально полученные значения максимального расхода концентрации каждого из трёх тиолов практически совпадают с ожидаемыми значениями (табл. 2).

Сопоставление уровней активности, определяемых с разными тиоловыми субстратами

При идентичных начальных концентрациях тиолов (230 мкМ) были определены величины активности с каждым из трех тиоловых субстратов; при этом использовался один и тот же смешанный образец плазмы от 5 крыс (возраст крыс – 5-7 мес, вес – 220-350 г, общий белок в образце – 57,0 г/л) с предварительным 15-кратным разведением и последующим разведением реакционной смеси в 10,4 раза (итоговое разведение – 156 раз); время инкубации с H_2O_2 – 30 с, диапазон концентраций H_2O_2 – от 10,45 до 418 мкМ. В случае цистеина также использовали вдвое сниженную концентрацию тиола (115 мкМ). После достижения максимальной

Таблица 1. Удельная активность (нмоль израсходованного тиола/(мин×мг белка)) в белковой фракции и цельной плазме

Тиоловый субстрат	L-GSH (1,1 мМ)		DL-цистеин (0,25 мМ)		DL-гомоцистеин (0,25 мМ)	
	Фракция (0-50%)	Цельная плазма	Фракция (30-44%)	Цельная плазма	Фракция (0-50%)	Цельная плазма
Биоматериал (используемый диапазон насыщения $(NH_4)_2SO_4$)						
Индивидуальные значения активности	1961	797	846	222	270,9	149,9
	1967	922	904	178	317,6	156,2
	2027	636	955	220	374,0	186,0
	2163	1263	975	204	406,7	197,1
	2170	813	979	226	415,2	190,7
	2286	771	1010	237	429,9	199,4
Медиана	2095,4	804,9	965,0	221,0	390,30	188,33

Примечание. В случае каждого из тиоловых субстратов варианты для фракции и цельной плазмы попарно связаны, в каждом сравнении $p=0,03125$ (парный критерий Уилкоксона). Общее $n=18$: L-GSH - самки, 2-3 мес, DL-цистеин - самки, 4 мес, DL-гомоцистеин - половозрелые самки, 280-300 г; сравнения между данными для разных тиоловых субстратов, животных разного возраста не проводились. Концентрации H_2O_2 (мкМ) - 192; 41,8; 39,7 при использовании L-GSH, DL-цистеина и DL-гомоцистеина, соответственно.

Таблица 2. Максимальный расход тиола при недостатке H_2O_2 в присутствии биоматериала плазмы (ожидаемый на основании стехиометрии тиолпероксидазной реакции и экспериментально найденный)

Тиоловый субстрат	DL-цистеин (0,25 мМ)		DL-гомоцистеин (0,25 мМ)	L-GSH (1,1 мМ)
биоматериал	Фракция, сконцентрированная в 10 раз*	Фракция, сконцентрированная в 5 раз*	Цельная плазма (с разведением реакционной смесью в 104 раза)	Цельная плазма (с разведением реакционной смесью в 104 раза)
$[H_2O_2]$, мкМ	41,8	41,8	39,7	192
Ожидаемый расход тиола, $2 \times [H_2O_2]$, мкМ	83,6	83,6	79,4	384
Время инкубации, с	40 **	40 **	90 #	80 #
Схема сбора реакционной смеси II	360 мкл надосадочной жидкости + 1,73 мл трис-HCl-буфера + 15 мкл раствора ДТНБ	360 мкл надосадочной жидкости + 1,73 мл трис-HCl-буфера + 15 мкл раствора ДТНБ	360 мкл надосадочной жидкости + 1,73 мл трис-HCl-буфера + 15 мкл раствора ДТНБ	90 мкл надосадочной жидкости + 0,965 мл трис-HCl-буфера + 7,5 мкл раствора ДТНБ
Соответствующая величина $OD_{412 \text{ нм}}$ *** для реакционной смеси II на 1 мМ тиола в реакционной смеси I	2,028	2,028	2,028	1,005
$\Delta OD_{412 \text{ нм}}$ для индивидуальных образцов	0,158 0,165 0,166 0,169 0,170 0,171	0,158 " 0,170 " 0,165 " 0,168 " 0,172 " 0,172 "	0,155 0,156 0,157 0,158 0,159	0,362 0,366 0,387 0,391 0,395
$\Delta OD_{412 \text{ нм}}$, медиана	0,1675	0,169	0,157	0,387
Экспериментально найденный расход тиола, мкМ (Me [min—max])	82, 6 ' [77,9—84,3]	83,3 ' [77,9—84,8]	77,4 ' [76,4—78,4]	385 ' [360—393]

Примечание: * - по сравнению с предыдущим опытом (см. табл. 1); увеличение содержания фракции обеспечивает полный расход пероксида водорода, взятого в недостатке. ** - обычное время инкубации. # - удлинённое время инкубации, обеспечивает полный расход H_2O_2 . *** - значение, вычисленное на основании коэффициента молярного поглощения 2-нитро-5-тиобензоата при 412 нм, равного $14150 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. " - значения упорядочены по предыдущему ряду. ' - значения почти идентичны ожидаемым.

Таблица 3. Сопоставление активностей при разных концентрациях цистеина и при эквимольных концентрациях трёх тиолов

Тиоловый субстрат	DL-цистеин		DL-гомоцистеин	L-GSH
Концентрация тиола в реакционной смеси, мкМ	115	230	230	230
v_{\max} , нмоль H_2O_2 /(с × мл плазмы)	56	100	132	128
Диапазон $[H_2O_2]$, в котором выявляется v_{\max} , мкМ	20,9-52,2	52,5-104,5	41,8-104,5	41,8-104,5

величины активности, при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 скорость реакции снижается, то есть можно говорить о достижении v_{\max} (не V_{\max}). При использовании L-GSH и DL-гомоцистеина в качестве тиоловых субстратов при их фиксированных концентрациях, равных 230 мкМ, выявлены сходные значения v_{\max} , которые выше, чем при использовании 230 мкМ DL-цистеина. При двукратном уменьшении

концентрации DL-цистеина значение v_{\max} для того же смешанного образца также снижается приблизительно вдвое (табл. 3).

Таким образом, Hcy-SH является не менее эффективным субстратом в заданных условиях, чем GSH. Если фермент стереоселективен по отношению к тиолам, то L-Hcy-SH и L-Cys-SH, вероятно, более эффективные субстраты, чем L-GSH.

Сопоставление распределений тиолпероксидазных активностей среди белковых фракций

Осаждённые в диапазоне насыщения сульфатом аммония, равном 0-56%, белковые фракции были подвергнуты более детальному изучению на предмет распределения среди них активностей, выявляемых с использованием Cys-SH, Hcy-SH и GSH. Опровержение гипотезы о том, что все три активности принадлежат одному ферменту, могло бы быть получено при полном или существенном несовпадении их распределений по белковым фракциям. Однако, со всеми тремя субстратами выявлена практически идентичная форма распределения активности среди белковых фракций (рис. 2А,Б). При этом совпадение рангов полное: коэффициент конкордации Кендалла (W) в точности равен единице, вероятность случайного полного совпадения рангов для всех трёх распределений составляет менее 0,01. Таким образом, получено статистически значимое подтверждение того, что все три активности тесно связаны друг с другом. В каждой из фракций активности с тиоловыми субстратами, начальные концентрации которых во всех случаях были равны 1,1 мМ, располагаются в порядке убывания следующим образом: L-GSH, DL-гомоцистеин, DL-цистеин, причём в трёх фракциях с наибольшими значениями активности соотношение между ними практически идентично: 1 : 0,69-0,71 : 0,42-0,45 (активность по отношению к L-GSH принята за единицу, для остальных активностей относительно неё указаны диапазоны min-max). Соотношение между тремя различными тиолпероксидажными активностями, по-видимому, меняется при изменении начальных

концентраций используемых тиолов (в предыдущем эксперименте (табл. 3) использовали иные начальные концентрации (230 мкМ), и активности, выявленные с использованием L-GSH и DL-гомоцистеина, были сходны), и это требует дальнейшего изучения с использованием фиксированной концентрации H_2O_2 и меняющихся концентраций тиолов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сохранение активностей, определяемых с использованием GSH, Hcy-SH и Cys-SH, в белковом компоненте плазмы с возрастанием удельных активностей при фракционировании сульфатом аммония подтверждает белковую природу катализатора. Подтверждением белковой природы катализатора также является быстрое исчезновение активности в результате прогрева при 60°C. Выявление мольного соотношения 2:1 между тиолом и H_2O_2 подтверждает протекание катализируемого процесса по тиолпероксидазному пути. Тиолпероксидазная активность известна также для альбумина плазмы крови, причём наиболее убедительные результаты получены в отношении его Cys-SH:фосфолипидгидропероксид-оксидоредуктазной активности [20]. Однако альбумины осаждаются сульфатом аммония в высоком насыщении, и в настоящем исследовании при использовании H_2O_2 в качестве восстанавливаемого субстрата и реактива Элмана для детекции убыли тиола, ни одна из исследуемых тиолпероксидазных активностей в белковой фракции, соответствующей альбумину, не выявлялась – все активности регистрировались во фракциях с насыщением сульфатом аммония

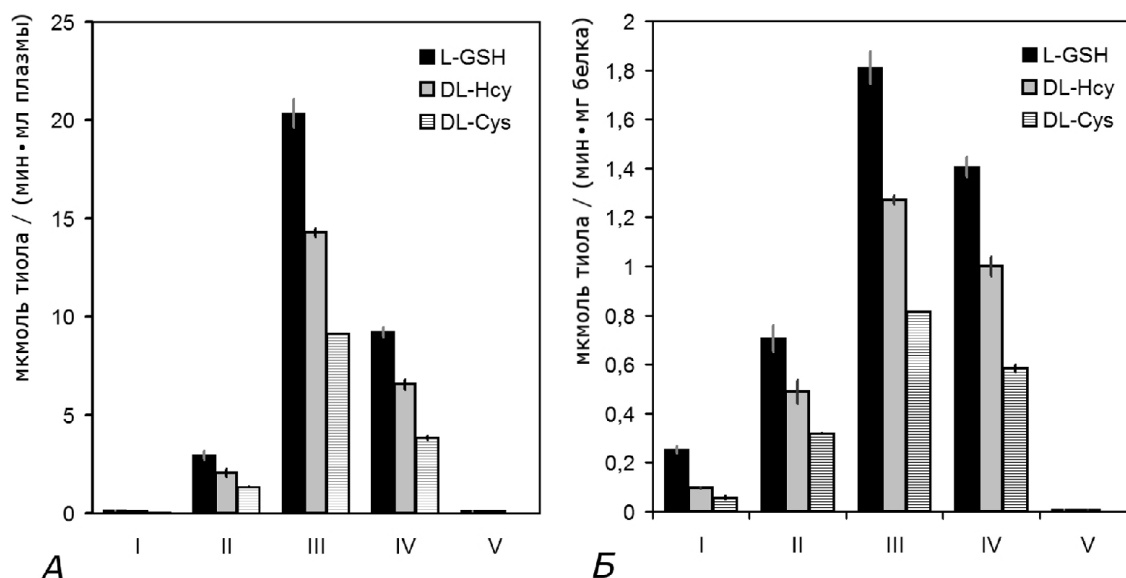


Рисунок 2. Распределение тиолпероксидазных активностей, выявляемых с использованием L-глутатиона (L-GSH), DL-цистеина (DL-Cys) и DL-гомоцистеина (DL-Hcy), среди белковых фракций плазмы. А - активности в пересчёте на 1 мл плазмы, Б - активности в пересчёте на 1 мг белка фракции. Обозначения: I, II, III, IV и V - белковые фракции, выделенные в диапазонах насыщения сульфатом аммония, равных, соответственно, 0-23, 23-30, 30-37, 37-44 и 44-56%. “Усы” - размах между параллельными измерениями (в ряде случаев значения параллельных измерений почти или полностью совпадают, размах близок или равен нулю). Для выделения фракций использовался смешанный в равных объёмах образец плазмы крови от 4-х крыс. Концентрация тиола в реакционной смеси - 1,1 мМ, пероксида водорода - 154 мкМ.

ниже 56%. Это означает, что набор активностей плазмы, изученный в настоящей работе, не связан с тиолпероксидазной активностью альбумина.

Для двухсубстратной реакции, катализируемой ферментами группы GPx, характерен механизм типа “пинг-понг”, реализующийся в последовательном взаимодействии субстратов с ферментом в следующем порядке: молекула гидропероксида, первая и затем вторая молекулы тиола [3, 21]. При этом характерное свойство – отсутствие насыщения по тиолу с неопределённой V_{\max} . Кажущаяся V_{\max} по гидропероксиду является линейной функцией концентрации тиолового субстрата [3]. Результаты, полученные при двух фиксированных концентрациях Cys-SH, согласуются с наличием этого свойства у присутствующего в плазме крови крыс катализатора: рост V_{\max} выявляется почти пропорционально концентрации этого тиола.

Тесная связь между распределениями тиолпероксидазных активностей, выявленных с использованием GSH, Cys-SH и Hcy-SH, среди белковых фракций изначально не рассматривается авторами как доказательство их принадлежности GPx3 (то есть со строгой однозначностью). Такая тесная связь – подтверждение, статистически значимое свидетельство в пользу гипотезы об их принадлежности одному ферменту. Коэффициент конкордации Кендалла $W=1$, $p<0,01$, что означает очень низкую (менее 1%) вероятность того, что все три активности принадлежат независимым друг от друга ферментам. Это также не исключает полностью вклад каких-либо минорных ферментов в определяемые активности, но исключает такой их вклад, который нарушал бы сопряженность распределений активностей по белковым фракциям.

Гипотеза о том, что именно GPx3 крыс способна утилизировать не только GSH, но также Hcy-SH и Cys-SH, не претендует на статус единственно возможного объяснения, но эта гипотеза в ходе исследования стала наиболее вероятным объяснением наличия трёх изученных тиолпероксидазных активностей в плазме крыс. Здесь нужно добавить, что результаты аналогичны полученным нами данным с использованием сыворотки человека, в которых распределения гомоцистеинпероксидазной [16] и цистеинпероксидазной активностей практически совпадают с распределением, выявляемым при использовании GSH, при том, что цистеинпероксидазная активность уже известна для очищенного препарата GPx3 человека [6]. В дальнейшем целесообразно провести иммунопреципитацию GPx3 крысы с последующей проверкой активности в остаточном биоматериале, а также высокую её очистку с исследованием кинетических характеристик с каждым из тиоловых субстратов.

Cys-SH – мажорный низкомолекулярный тиол плазмы – вероятно, может участвовать в опосредованном GPx3 окислении гидропероксидов без последующей регенерации из окисленной формы в восстановленную. Редокс-соотношение между Cys-SH и Cys-SS-Cys в плазме свидетельствует

о преобладании окисленной формы. Средние значения концентраций для плазмы человека составляют: Cys-SS-Cys – 51,7 мкМ, Cys-SH – 11,3 мкМ; для глутатиона – наоборот, GSH (2,8 мкМ) преобладает над GSSG (0,035 мкМ) [7]. Считается, что плазма непрерывно генерирует пероксид водорода в существенных количествах, который, однако, быстро утилизируется и вряд ли успевает достигать концентрации выше 0,25 мкМ [22, 23]. Вероятно, среди низкомолекулярных тиолов именно Cys-SH, мажорный низкомолекулярный тиол плазмы, подвергается преимущественному окислению пероксидом водорода – как в спонтанной реакции, так и при участии GPx3.

Помимо актуальности исследований GPx3 как антиоксидантного фермента, использующего для своей функции свободный Cys-SH, несомненный интерес представляет ферментативное окисление Hcy-SH в Hcy-SS-Hcy, которое, вероятно, также осуществляется в плазме крови крыс и человека при участии GPx3. Именно эту функцию мы называем элиминацией (устранением) гомоцистеина [9], поскольку гомоцистеин *sensu stricto* – это именно свободная SH-форма. Повышенный уровень общего Hcy (то есть включающего все его формы, в том числе Hcy-SS-Hcy, смешанные дисульфиды и формы, связанные с белками) нередко рассматривается как фактор развития атеросклероза, дефектов нервной трубки у плода и ряда других патологических процессов и состояний [24, 25]. По различным данным, всего 1-2,5% общего Hcy плазмы крови находится в виде Hcy-SH, то есть собственно гомоцистеина, тогда как основную долю циркулирующего Hcy составляют окисленные формы, главным образом связанные с белками [24]. При кобаламин-дефицитной гипергомоцистеинемии соотношение между формами Hcy меняется с увеличением доли Hcy-SH (её концентрация в отдельных случаях приближается к значениям концентрации Cys-SH, наблюдаемым в норме) [8]. Если Hcy-SH и Hcy-SS-Hcy различаются по своей токсичности, можно предполагать участие GPx3 в регуляции токсических эффектов Hcy через модуляцию его редокс-соотношения.

Развитие и течение ряда заболеваний, таких как хроническая почечная недостаточность, воспаление кишечника и др., сопровождаются изменениями экспрессии и активности GPx3 [1]. Это указывает на важность изучения роли этого фермента в развитии патологий, в том числе и в моделях на животных, а также проверки возможности использования уровней активности этого фермента для диагностических целей. Использование альтернативных тиоловых субстратов (вместо GSH) открывает новые возможности, например, специфичное определение активности GPx3 в смесях в присутствии GPx1.

ВЫВОДЫ

Подтверждено, что цистеин и гомоцистеин (так же как глутатион) окисляются белковым катализатором по тиолпероксидазному пути в присутствии плазмы крови крыс.

Наряду с глутатионом, цистеин и гомоцистеин могут применяться для количественного определения тиолпероксидазной активности с использованием реактива Эллмана.

Полное совпадение рангов распределений $GSH : H_2O_2$ -, $Cys-SH : H_2O_2$ - и $Hcy-SH : H_2O_2$ -оксидоредуктазных активностей среди белковых фракций плазмы крыс подтверждает их принадлежность одному ферменту.

Авторы выражают благодарность директору ФГБНУ "НИИ АГуР им. Д.О. Отта", академику РАН Э.К. Айламазану за поддержку исследования, вет. врачу Л.И. Вороновой, лаб.-иссл. Н.Н. Балашовой и н.с. Л.С. Полянских за помощь при работе с животными.

ЛИТЕРАТУРА

- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Биомед. химия, **55**, 255-277.
- Wendel A. (1980) in: Enzymatic Basis of Detoxication (Jakoby W.B., ed.) Academic Press, New York, pp. 333-353.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (1993) Успехи современной биологии, **113**, 107-122.
- Duramaz A., Dikmen N. (2007) J. Enzyme Inhib. Med. Chem., **22**, 733-738.
- Wolin M.S. (2011) Circulation, **123**, 1923-1924.
- Takebe G., Yarimuzu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S., Takahashi K. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 41254-41258.
- Johnson J.M., Strobel F.H., Reed M., Pohl J., Jones D.P. (2008) Clinica Chimica Acta, **396**, 43-48.
- Mansoor M.A., Ueland P.M., Svardal A.M. (1994) Am. J. Clin. Nutr., **59**, 631-635.
- Разыграев А.В. (2012) Биомед. химия, **58**, 592-598.
- Разыграев А.В. (2013) Биомед. химия, **59**, 636-643.
- Razygraev A.V. (2013) Egyptian J. Biol., **15**, 54-58.
- Гланц С. (1999) Медико-биологическая статистика (пер. с англ.), Практика, М., 459 с.
- Зильфян В.Н., Кумкумаджян В.А. (1970) Журнал эксперим. клин. мед., **10**, 12-14.
- Burgess R.R. (2009) Methods in Enzymology, **463**, 331-342.
- Разыграев А.В. (2012) Клинико-лабораторный консилиум, **44**, 16-20.
- Разыграев А.В. (2014) Бутлеровские сообщения, **39**, 105-108.
- Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B. (1979) Analytical Biochemistry, **94**, P. 75-81.
- Яковлев А.А., Гуляева Н.В. (2004) Биомед. химия, **50**, 390-397.
- Матюшичев В.Б. (1990) Элементы статистической обработки результатов биохимического эксперимента. Изд-во Ленинградского ун-та, Л., 132 с.
- Hurst R., Bao Y., Ridley S., Williamson G. (1999) Biochem. J., **338**, 723-728.
- Билан Д.С., Шохина А.Г., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. (2015) Биоорган. химия, **41**, 385-402.
- Frei B., Yamamoto Y., Niclas D., Ames B.N. (1988) Analytical Biochemistry, **175**, 120-130.
- Halliwel B., Clement M.V., Long L.H. (2000) FEBS Letters, **486**, 10-13.
- Жлоба А.А. (2009) Клинико-лабораторный консилиум, **26**, 49-60.
- Ueland P.M., Vollset S.E. (2004) Clin. Chem., **50**, 1293-1295.

Поступила: 14. 05. 2015.
Принята к печати: 30. 12. 2015.

THIOL PEROXIDASE ACTIVITIES IN RAT BLOOD PLASMA DETERMINED WITH HYDROGEN PEROXIDE AND 5,5'-DITHIO-BIS(2-NITROBENZOIC ACID)

A.V. Razygraev, K.I. Taborskaya, M.A. Petrosyan, Zh.N. Tumasova

Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology,
3 Mendeleevskaya liniya, Saint Petersburg, 199034, Russia; tel.: (812) 328-98-29; fax: (812) 328-23-61;
e-mail: alexeyrh@mail.ru

Earlier it has been shown that extracellular glutathione peroxidase (GPx3) from human plasma is able to use cysteine (Cys-SH) instead of glutathione (GSH) as a thiol substrate. In the present study, the ability of rat plasma to utilize not only GSH, but also Cys-SH and homocysteine (Hcy-SH), in the thiol peroxidase reaction has been confirmed. The molar ratio between thiol and H_2O_2 in the catalyzed reaction was 2:1. The specific activity increased with fractionation of proteins. At a fixed thiol concentration of 0.23 mM, the saturation by H_2O_2 with $v_{max, app}$ of 100, 128, and 132 nmol H_2O_2 / s per 1 ml of plasma was found for DL-Cys-SH, L-GSH, and DL-Hcy-SH, respectively. Rank distributions of activities towards all three thiol substrates within plasma protein fractions are fully identical (the probability of random full coincidence was less than 0.01). The statistical analysis confirms that Cys-SH peroxidase, Hcy-SH peroxidase, and GSH peroxidase activities are closely associated with each other. The most probable outcome of this result is the ability of rat GPx3 to utilize all three thiols as substrates for oxidation. Probably, thiol peroxidase is a participant of formation of plasma cystine (Cys-SS-Cys) from Cys-SH in plasma. If the forms of Hcy exhibit different toxic effects, it can be suggested that thiol peroxidase regulates Hcy toxicity in hyperhomocysteinemia through Hcy-SH oxidation to homocystine (Hcy-SS-Hcy).

Key words: cysteine, homocysteine, stoichiometry, Ellman's reagent, glutathione peroxidase