

ГОМОЦИСТЕИНПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А. В. РАЗЫГРАЕВ

НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. В предыдущем исследовании было установлено, что плазма крови человека способна ускорять пероксидзависимую убыль гомоцистеина в реакционной смеси, состоящей из трис-НСl-буфера (рН 8,5), этилендиаминтетраацетата, NaN_3 , D, L-гомоцистеина и H_2O_2 , что служит свидетельством в пользу существования гомоцистеинпероксидазной активности в плазме. В настоящем исследовании было установлено, что выявленная активность принадлежит белковой фракции сыворотки крови (фракция выделяется в диапазоне насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, равном 0–35%), при этом наблюдается возрастание удельной активности. Установлено, что уровень обусловленного присутствием биоматериала пероксидзависимого расхода гомоцистеина соответствует стехиометрии гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной реакции, т. е. на 1 моль пероксида водорода приходится 2 моля гомоцистеина. Зависимость между концентрацией пероксида водорода и начальной скоростью реакции (измерено при начальной концентрации гомоцистеина, равной 0,25 мМ) имеет характер насыщения и может быть линеаризована с использованием двойных обратных координат. Кажущаяся K_m по пероксиду водорода в используемых условиях составила приблизительно 6,5 мкМ. Результаты, полученные в настоящем исследовании, указывают на ферментативный характер реакции и являются весомым подтверждением наличия гомоцистеинпероксидазной активности в сыворотке крови человека. Данная активность не является проявлением обнаруженной ранее тиолпероксидазной активности сывороточного альбумина. Исследование обнаруженной активности может иметь практическую ценность в медицине, поскольку в данном процессе происходит элиминация как пероксида водорода, так и свободной SH-формы гомоцистеина, служащей предшественником в образовании других, в том числе токсичных, форм данного аминотиола.

Ключевые слова: аминотиол, гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктаза, фермент, стехиометрия, реактив Элмана, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота).

HOMOCYSTEINE PEROXIDASE ACTIVITY IN HUMAN SERUM

A. V. RAZYGRAEV

D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS, St. Petersburg

Summary. In a previous study it was found that the human plasma is able to accelerate the H_2O_2 -dependent homocysteine decline in a reaction mixture consisting of Tris-HCl-buffer (pH 8,5), EDTA, NaN_3 , D, L-homocysteine and H_2O_2 . This fact can be considered as evidence of the existence of homocysteine peroxidase activity in plasma. In the present study it has been found that the activity belongs to the identified protein fraction of serum (the fraction precipitated in the range of ammonium sulfate saturation, equal to 0–35%). The increase in specific activity, which is a result of isolation of fraction has been observed. The level of the H_2O_2 -dependent homocysteine decline corresponds to the stoichiometry of homocysteine: H_2O_2 -oxidoreductase reaction, i. e. to 1:2 mole ratio between hydrogen peroxide and homocysteine, respectively. The relation between the concentration of hydrogen peroxide and rate (measured at fixed homocysteine initial concentration, equal to 0.25 mM) has a saturation character and can be successfully linearised by conversion of data to double-reciprocal form. The apparent Michaelis constant value for hydrogen peroxide was approximately 6.5 microM at 0.25 mM homocysteine. The results obtained in this study indicate the enzymatic character of the reaction and provide considerable evidence of the presence of homocysteine peroxidase activity in human serum. This activity is not serum albumin thiol peroxidase activity. Further study of homocysteine peroxidase activity may be useful in medicine, because the activity is the elimination of hydrogen peroxide and free SH-form of homocysteine, whereas homocysteine SH-form is a precursor in the formation of others, including toxic forms of this aminothiols.

Key words: aminothiols, homocysteine: H_2O_2 -oxidoreductase, enzyme, stoichiometry, Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid).

Повышенные уровни гомоцистеина в организме в настоящее время рассматриваются как важный фактор развития ряда патологических состояний, таких как атеросклероз, тромбозы, ишемическая болезнь сердца, воз-

растные деменции. Для гипергомоцистеинемии во время беременности хорошо известны токсические эффекты, проявляющиеся в нарушениях развития плода [1–3]. Гомоцистеин циркулирует в организме в виде разных

форм, токсическое влияние которых может различаться, в связи с чем большое значение приобретают исследования, направленные на выяснение механизмов регуляции уровней отдельных форм гомоцистеина. В этом отношении особый интерес представляет известная способность SH-формы гомоцистеина участвовать в ферментативном восстановлении органических гидроперекисей [4], поскольку на основании такого факта можно предполагать существование общего механизма регуляции уровней SH-формы гомоцистеина и соединений, содержащих пероксидные группы.

Недавно нами были получены данные, свидетельствующие в пользу того, что не только органические пероксиды, но и пероксид водорода способен участвовать в ферментативной утилизации свободной SH-формы гомоцистеина [5]. Добавление плазмы крови в реакционную смесь, содержащую SH-форму гомоцистеина, а также трис-HCl-буфер (pH 8,5), хелатирующий агент (этилендиаминтетраацетат, ЭДТА) и ингибитор гемопротеинов (азид натрия), приводило к ускорению убыли гомоцистеина, инициированной внесением пероксида водорода. Скорость реакции в присутствии биоматериала статистически значимо превышала скорость неферментативного окисления гомоцистеина пероксидом водорода, также наблюдаемого при используемых концентрациях реагирующих соединений. В период преинкубации с плазмой (перед добавлением перекиси) отсутствовали значительные изменения начальной концентрации аминотиола, т.е. наблюдаемая убыль гомоцистеина является истинно пероксидзависимой. Это позволяет говорить о наличии в плазме крови активности, устраняющей гомоцистеин с участием H_2O_2 (предположительно гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазная, или гомоцистеинпероксидазная, активность).

Из предположения о том, что обнаруженная активность является гомоцистеинпероксидазной, исходит ряд следствий, подлежащих проверке: 1) обнаруженная активность должна принадлежать к белковой фракции плазмы, 2) должно наблюдаться соответствие между стехиометрией гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазной реакции и наблюдаемым уровнем пероксидзависимого расхода концентрации гомоцистеина, происходящего вследствие присутствия материала плазмы крови в реакционной смеси, 3) возможна оценка свойственных для ферментативных реакций характеристик, а именно K_M и V_{max} , т.е. кинетических констант фермента по соответствующему субстрату реакции (в данном случае K_M — кажущаяся K_M для двухсубстратной реакции). Соответственно, в задачи настоящего исследования вошла проверка каждого из этих следствий с использованием сыворотки крови в качестве биоматериала.

Материалы и методы

В данном исследовании была использована сыворотка крови небеременных женщин-доноров (возрастной диапазон 20–31 лет). На стадии планирования исследо-

вания было определено необходимое их число. Для обоснования принадлежности изучаемой активности к белковой фракции сыворотки было решено использовать 1) смешанный образец сыворотки от 5 доноров (возраст 26,0 [21, 30] лет, Me [min; max]) для выделения нескольких белковых фракций с выбором фракции, сохраняющей исследуемую активность, 2) индивидуальные образцы от 6 доноров (27,0 [20, 31] лет) для работы с выбранной конкретной белковой фракцией; данное количество было определено как минимально необходимое в связи с выбором метода статистического сравнения групп. Ввиду того, что характер распределения изучаемого признака неизвестен, было решено использовать непараметрический критерий для статистического сравнения. Статистическому сравнению планировалось подвергнуть 2 группы (первая — значения удельной активности для выбранной белковой фракции; вторая группа — значения удельной активности для образцов сыворотки, из которых выбранная фракция была выделена); при таком условии может быть использован парный W-критерий Уилкоксона. Применение данного критерия для обнаружения статистически значимых различий на 5%-м уровне значимости требует как минимум 6 вариант в каждой из двух групп (соответственно, необходимо использовать как минимум 6 доноров) [6]. Те же 6 образцов выделенной фракции использовались для определения максимального расхода гомоцистеина в исследуемой реакции для оценки ее стехиометрии. Для оценки кинетических констант был использована белковая фракция, выделенная из смешанного образца сыворотки от 6 женщин (27,5 [22, 29] лет). Все смешанные образцы готовились путем объединения равных по объему аликвот из индивидуальных образцов.

Венозную кровь брали натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette Premium с активатором образования сгустка и гелем для отделения сыворотки (объем 4 мл). Сыворотку получали посредством центрифугирования при 1600 g в течение 10 мин. Для выделения белковых фракций использовали раствор сульфата аммония различной степени насыщенности (при комнатной температуре) [7]. Вначале из смешанного образца выделяли фракции в следующих диапазонах насыщения сульфатом аммония: 0–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–80%. После обнаружения исследуемой активности лишь в первых двух фракциях (с выраженным максимумом в диапазоне 0–30%) при последующей работе с индивидуальными образцами и смешанным образцом сыворотки использовали насыщение до 35% (т.е. диапазон 0–35%). Пробы с осажденной фракцией центрифугировали 10 мин при 10 000 g при 10 °С. Белковый осадок промывали водным раствором $(NH_4)_2SO_4$ с насыщением 35% с повторным центрифугированием в тех же условиях. Отмытый осадок растворяли в физиологическом растворе (0,9% NaCl (вес/объем)): к осадку, полученному из 450 мкл индивидуального образца, добавляли 70 мкл физиологического раствора и переме-

шивали до полного растворения; полученный раствор белковой фракции в дальнейшем использовали для определения изучаемой активности в одной серии с соответствующим образцом сыворотки. В случае выделения той же фракции из смешанного образца (для последующей оценки кинетических характеристик) из 4,5 мл сыворотки было приготовлено приблизительно 2,6 мл раствора белковой фракции. Образцы сыворотки и выделенных белковых фракций замораживали при -85°C , после размораживания использовали для исследования.

Определение активности проводили при 37°C в реакционной смеси (объем 416 мкл), содержащей 0,084 М трис-НСI-буфер (рН 8,5), 0,28 мМ ЭДТА, 9,6 мМ NaN_3 , 0,25 мМ D, L-гомоцистеин, 39,7 мкМ H_2O_2 и биоматериал (сыворотка либо выделенная из сыворотки белковая фракция). В случае оценки кинетических характеристик использовали несколько концентраций пероксида водорода в диапазоне 0–79,4 мкМ. К 360 мкл раствора гомоцистеина на трис-НСI-буфере с ЭДТА и азидом натрия добавляли 40 мкл биоматериала. Для оценки уровня неферментативного окисления вместо биоматериала в реакционную смесь вносили дистиллированную воду (40 мкл). После добавления 40 мкл биоматериала (либо дистиллированной воды) в пробы сразу же (0 с), либо через 40 с добавляли 16 мкл 1,032 мМ H_2O_2 , что позволяло учесть возможные изменения начальной концентрации гомоцистеина, вызванные исключительно присутствием биоматериала. Время инкубации с перекисью составляло 0 и 40 с (0 и 30 с в случае оценки кинетических характеристик). Реакцию останавливали добавлением 80 мкл 30% (масса/объем) трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Концентрированные растворы белковой фракции, полученные из шести индивидуальных образцов сыворотки, перед внесением в реакционную смесь разбавляли в 5 раз во избежание преждевременного полного расхода одного из реагирующих соединений (т.е. H_2O_2 , взятого в недостатке по отношению к гомоцистеину). В другой серии определений растворы белковой фракции вносили в реакционную смесь в неразбавленном виде, что приводило к пятикратному ускорению реакции и, соответственно, к максимально возможному расходу перекиси. Величина сопряженного с этим максимально возможного в данных условиях расхода гомоцистеина использовалась для сопоставления с величиной максимального расхода, рассчитанной на основании стехиометрии гомоцистеинпероксидазной реакции.

После добавления ТХУ пробы центрифугировали при 1000 г (10 мин), супернатант использовали для определения содержания непрореагировавшего гомоцистеина с применением реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТНБ). Для этого к 360 мкл супернатанта добавляли 1,73 мл 0,1 М трис-НСI-буфера с 0,34 мМ ЭДТА (рН 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 расчетов 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) [8].

Исследование кинетики заключалось в оценке кинетических констант по пероксиду водорода при фиксированной начальной концентрации гомоцистеина (0,25 мМ) при помощи линеаризации с использованием двойных обратных координат.

Концентрацию белка в биоматериале определяли по методу Лоури [9].

Результаты и обсуждение

На смешанном образце сыворотки от 5 доноров была установлена принадлежность исследуемой активности белковым фракциям, осаждаемым в двух смежных диапазонах насыщения сульфатом аммония, а именно 0–30 и 30–40%, с максимумом в диапазоне 0–30%. В последующем исследовании образцов белковой фракции, выделенной насыщением шести индивидуальных образцов сыворотки сульфатом аммония до 35%, были получены следующие значения удельной каталитической активности (нмоль израсходованного гомоцистеина/(мин · мг белка)):

36,16; 42,05; 46,73; 48,60; 53,23; 58,98 (Ме – 47,665).

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

6,07; 7,13; 5,96; 6,60; 5,92; 6,53 (Ме – 6,300).

Очевидно, что удельная активность возрастает в результате выделения данной белковой фракции. 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 белковой фракции выше, чем для сыворотки, 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 3,125%). Это означает, что различия в удельной активности между белковой фракцией и сывороткой являются статистически значимыми.

Предполагаемая схема гомоцистеинпероксидазной реакции (по аналогии с реакцией, которую катализирует глутатионпероксидаза) со стехиометрическими коэффициентами выглядит следующим образом:



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

По стехиометрии реакции ожидаемый максимальный расход концентрации гомоцистеина в два раза превосходит начальную концентрацию H_2O_2 , которая равна 39,7 мкМ (т. е. должен быть равен приблизительно 80 мкМ) при условии, что весь пероксид водорода утилизируется в реакционной смеси по гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазному пути. Пятикратное увеличение содержания белковой фракции (выделенной из тех же 6 индивидуальных образцов) в реакционной смеси позволило оценить максимальный расход гомоцистеина при выбранной концентрации H_2O_2 . Значения разницы в оптической плотности, полученной для проб с длительностью инкубации в присутствии пероксида водорода, равной 0 и 40 с ($\Delta OD_{412\text{ нм}}$), в данных условиях составили (в единицах оптической плотности):

0,154; 0,155; 0,163; 0,164; 0,167; 0,168 (Me — 0,1635).

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 пересчетом на разведение). Следовательно, значение ΔOD , равное 0,1635, соответствует убыли концентрации гомоцистеина, равной 80,6 мкМ. Данное значение, представляющее максимальный расход концентрации гомоцистеина в используемых реакционных средах, практически совпадает со значением 80 мкМ, предсказанным на основании стехиометрии гомоцистеинпероксидазной реакции.

Исследование зависимости начальной скорости реакции от концентрации пероксида водорода при фиксированном значении концентрации гомоцистеина с последующей линеаризацией (рис. 1) позволило оценить кажущуюся K_m по пероксиду водорода. Значение кажущейся K_m по пероксиду водорода составило приблизительно 6,5 мкМ (значение V_{max} для данного конкретного смешанного образца — 45,83 нмоль гомоцистеина/(мин · мг белка)). Полученный результат по кинетическим характеристикам, безусловно, носит лишь ориентировочный и предварительный характер, и его ценность в контексте данного исследования заключается в первую очередь в подтверждении ферментативного характера исследуемого процесса.

Результаты проведенного исследования указывают на ферментативную природу катализа окисления гомоцистеина пероксидом водорода, обусловленного присутствием сыворотки крови. Поскольку уровень расхода гомоцистеина в данной реакции соответствует стехиометрии окисления гомоцистеина по гомоцистеин: H_2O_2 -оксидоредуктазному пути, данный фермент может быть обозначен как гомоцистеинпероксидаза, причем независимо от возможной принадлежности данной активности какому-либо другому белку-ферменту с иными функциями. В связи с этим можно заметить, что данная

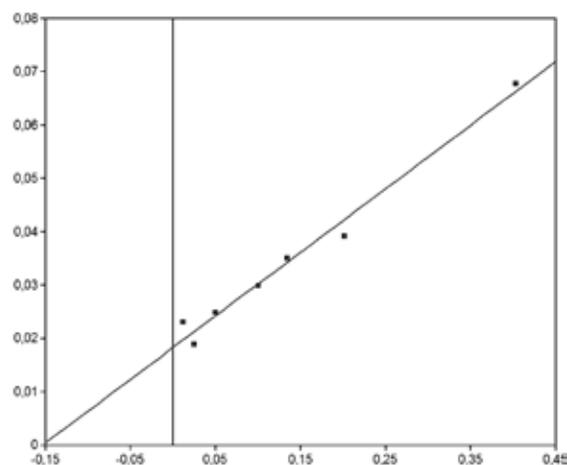


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации пероксида водорода, линеаризованная с использованием двойных обратных координат (начальная концентрация гомоцистеина — 0,25 мМ, содержание белка в реакционной смеси — 1,19 мг/мл).

Ось абсцисс — $1/[H_2O_2]$, 1/мкМ; ось ординат — $1/V_0$, 1/(мкМ гомоцистеина/мин).

Обозначения: $[H_2O_2]$ — концентрация пероксида водорода, V_0 — начальная скорость

активность не связана с альбуминовой фракцией¹, т. е. не является еще одним проявлением тиолпероксидазной активности сывороточного альбумина, обнаруженной ранее с использованием гидроперекиси фосфолипида [4].

Изучение обнаруженной активности в контексте медицинских исследований представляется весьма важным, поскольку может способствовать выяснению причин гипергомоцистеинемии и возможностей коррекции данного патологического состояния. Свободная SH-форма, устраняемая в гомоцистеинпероксидазной реакции, является предшественником гомоцистеинтиолактона, считающегося одной из наиболее токсичных форм гомоцистеина [1]. По различным данным, всего 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, 10, 11]. Не исключено, что гомоцистеинпероксидазная активность вносит определенный вклад в поддержание низкой концентрации свободной SH-формы гомоцистеина, образуя его дисульфидную форму и тем самым препятствуя ее превращению в гомоцистеинтиолактон. В случае нарушения утилизации гомоцистеина по гомоцистеинпероксидазному пути можно предполагать усиление токсических эффектов гипергомоцистеинемии.

¹ Альбумины сыворотки крови выпадают в осадок лишь при высоком насыщении сульфатом аммония, и в настоящем исследовании интенсивное образование преципитата, соответствующего альбуминовой фракции, наблюдалось только в результате более чем 60%-го насыщения.

Автор выражает благодарность руководителю лаборатории биохимии профессору А. В. Арутюняну, врачам лабораторной диагностики Ж. Н. Тумасовой и Н. М. Булдаковой за содействие в проведении данного исследования и руководителю отдела биохимии СПбГМУ им. И. П. Павлова, профессору А. А. Жлобе за полезные рекомендации.

Литература

1. Жлоба А. А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии // Клинико-лабораторный консилиум. 2009; 1 (26): 49–60.
2. Herrmann W., Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases // Clin. Chem. Lab. Med. 2011; 49 (3): 435–441.
3. Ueland P. M., Vollset S. E. Homocysteine and Folate in Pregnancy // Clinical Chemistry. 2004; 50 (8): 1293–1295.
4. Hurst R., Bao Y., Ridley S., Williamson G. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin // Biochem. J. 1999; 338: 723–728.
5. Разыграев А. В. Активность плазмы крови, устраняющая го-моцистеин с участием пероксида водорода. Перспективы исследования // Клинико-лабораторный консилиум. 2011; 2 (38): 105–108.

6. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999: 459.

7. Burgess R. R. Protein Precipitation Techniques // In: Methods in Enzymology (Burgess R. R. and Deutscher M. P. eds.). Academic Press, 2009: 332–337.

8. Riddles P. W., Blakeley R. L., Zerner B. Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic Acid) — a Reexamination // Analyt. Biochem. 1979; 94 (1): 75–81.

9. Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. Data for biochemical research (third edition). Oxford: Oxford Science Publications, OUP, 1986: 580.

10. Jacobsen D. W. Cellular mechanisms of homocysteine pathogenesis in atherosclerosis // Homocysteine in Health and Disease (Carmel R. and Jacobsen D. W. eds.). New York: Cambridge University Press, 2001: 510.

11. Madonna R., De Caterina R. Homocysteine and Endothelial Dysfunction // In: Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease (De Caterina R. and Libby P. eds.). Blackwell Publishing, 2007: 129–139.

Данные для корреспонденции:

Разыграев Алексей Вячеславович, к. б. н.,

научный сотрудник лаборатории биохимии с клинико-диагностическим отделением

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, e-mail: alexeyrh@mail.ru



ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА ПРОСИМ ОБРАЩАТЬСЯ:

- ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ
в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»

Эмануэль Владимир Леонидович

Тел. 8-905-229-60-22,

e-mail: ejvcons@mail.ru

- РЕКЛАМНЫЙ ОТДЕЛ:

Венкович Татьяна Анатольевна

Морозова Ирина Александровна

Тел./ф: (812) 600-22-74,

e-mail: akvatest@mail.ru