

КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

Соколов А.В.^{1,2}, Костевич В.А.^{1,2}, Васильев В.Б.¹, Панасенко О.М.²

¹ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия, biochemsokolov@gmail.com

²ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Миелопероксидаза (МРО, К.Ф. 1.7.1.11, донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза) – фермент азурофильных гранул нейтрофильных лейкоцитов. Высокий редокс-потенциал соединения I, образующегося при реакции МРО с пероксидом водорода, обеспечивает образование гипохлорита при двухэлектронном переносе на хлорид, бромид и тиоцианат. Доноры электронов, в том числе ароматической природы, окисляются по пероксидазному циклу. Образование гипохлорита, гипобромита и гипотиоцианата в ходе галогенирующего цикла лежит в основе антимикробной функции МРО и наряду с другими механизмами врожденного иммунитета обеспечивает защиту организма от патогенов. Не следует забывать, что продуцируемые МРО оксиданты могут приводить к развитию окислительного стресса, сопровождающего развитие воспалительных заболеваний. В настоящее время МРО рассматривается как мишень для новых противовоспалительных препаратов, однако список соединений, претендующих на роль регуляторов активности МРО, в настоящее время сравнительно мал [1]. В настоящее время нет прямых данных относительно физиологической роли пероксидазной активности МРО. Однако определение скорости образования продуктов галогенирующего цикла МРО затруднено их чрезвычайной реакционной способностью. В связи с этим методы определения галогенирующей активности МРО, как правило, основаны на измерении окисления соединений под действием галогенидамина таурина (Tau). Такой подход оправдан, прежде всего, тем, что Tau, секретируемый вместе с МРО при респираторном взрыве нейтрофилов, образует с гипохлоритом и гипобромитом долгоживущие галогенидамины. Однако существующие методы определения продукции галогенидамина Tau позволяют измерить лишь конечную концентрацию продуцированного МРО оксиданта после остановки реакции азидом натрия и каталазой. Это нужно для удаления остаточного H_2O_2 , поскольку соединения, окисляемые производным Tau (5-тио-2-нитробензойная кислота (TNB) и тетраметилбензидин (ТМВ)), могут окисляться МРО по перокси-

дажному циклу. В качестве катализатора окисления соединений галогенидами Тау применяют иодид: образующийся ICl (IBr) окисляет соединения, а выделяющийся при этом иодид вновь участвует в катализе. Важно отметить, что данные измерения количества образовавшегося гипохлорита или гипобромита по одной конечной точке не говорят о том, вышла ли реакция на плато – в этом отношении кинетические методы более информативны [2]. Учитывая сказанное выше, представляется актуальной разработка кинетического метода измерения продукции галогенидами Тау. Для этого было необходимо выбрать вещество, не являющееся пероксидазным субстратом МРО, стойким к миллимолярным концентрациям H_2O_2 , максимум поглощения которого находился бы в видимой области спектра и не изменялся в диапазоне рН 5-8. Скрининг более 50 красителей, на их толерантность к действию H_2O_2 и способность к обесцвечиванию хлорамином и бромамином Тау, выявил применяемый в микроскопии краситель целестиновый синий (СВ).

В экспериментах по сравнению реакции СВ с гипохлоритом и гипобромитом, а также хлорамином и бромамином Тау мы не наблюдали статистически значимых различий в действии этих оксидантов. Исследование стехиометрии реакции СВ (200 мкМ) с гипохлоритом (гипобромитом) показало, что 2 моль красителя полностью обесцвечивались при добавлении 1 моль окислителей, что сопровождалось дозо-зависимым падением максимума поглощения при 650 нм. В присутствии Тау (200 мкМ) обесцвечивание СВ гипохлоритом (гипобромитом) замедлялось, однако добавление в систему 5 мкМ KI приводило к быстрому обесцвечиванию красителя, не уступавшему по скорости с внесением гипохлорита (гипобромита) без Тау. С помощью калибровочных графиков уменьшения A_{650} СВ от концентрации оксидантов был рассчитан молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{650}=15200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Графики, полученные для пяти буферных растворов с рН 5.0-7.4 для гипохлорита и гипобромита практически совпали. В контрольных опытах было показано, что H_2O_2 не вызывает обесцвечивания СВ вплоть до концентрации 10 мМ. Необходимым критерием использования СВ для измерения галогенирующей активности МРО было отсутствие его окисления в пероксидазном цикле МРО. Действительно, в отсутствие хлорида (бромид) в системе, содержащей 5 нМ МРО, 200 мкМ СВ, 500 мкМ Тау, 5 мкМ KI, 50 мкМ H_2O_2 в натрий-фосфат-цитратном буфере, рН 5.8 и 7.0, не происходило обесцвечивания красителя. В той же системе в присутствии хлорида (бромид) скорость обесцвечивания СВ зависела линейным образом от концентрации МРО. Значения k_{cat} $94.7\pm 1.4 \text{ s}^{-1}$ (хлорид) и $67.5\pm 1.1 \text{ s}^{-1}$ (бромид) при рН 5.8 близки к описанным в литературе данным. Оптимальной концен-

трацией катализатора KI была 5 мкМ, скорость реакции практически не изменялась при увеличении концентрации Тау. Зависимость от концентрации H₂O₂ была экстремальной: при концентрации 100 мкМ и выше наблюдалась инактивация МРО. Полученные зависимости активности МРО от концентрации хлорида и бромида свидетельствуют в пользу большего сродства фермента к бромиду. Активность МРО, определенная предлагаемым методом и традиционными методами, с помощью TNB и ТМВ, практически совпадала. Мы наблюдали ингибирование активности МРО в присутствии синтетических ингибиторов (NaN₃, салицилгидроксамовая кислота, дапсон, гидразид аминобензойной кислоты), а также скавенджеров H₂O₂ и гипогалогенитов (каталаза, метионин, цистеин). Физиологический ингибитор МРО, непротеолизированный церулоплазмин, и синтетический пептид, имитирующий петлю между 5 и 6 доменами ЦП (RPYLKVNPR), оказывали выраженный ингибирующий эффект. Вместе с тем эффект протеолизованного церулоплазмينا был сравним с эффектами таких белков плазмы, как альбумин, фибриноген и трансферрин. Исследование влияния церулоплазмينا на кинетические параметры хлорирующей и бромирующей активности МРО показало, что он является неконкурентным ингибитором, поскольку не влияет на константу Михаэлиса для хлорида и бромида. Сродство МРО к H₂O₂ в присутствии ЦП значимо не изменялось. Полученные результаты демонстрируют ряд преимуществ предлагаемого метода, характеризующего галогенирующую активность МРО. Во-первых, кинетический режим позволяет в режиме реального времени измерять активность МРО, в отличие от методов с использованием ТМВ и TNB, требующих остановки реакции и инкубации с реагентами. Во-вторых, максимум поглощения СВ лежит в видимой области спектра и не изменяется в широком диапазоне рН. В-третьих, обесцвечивание СВ активными формами хлора и брома не отличается, что позволяет измерить активность МРО как в отношении хлорида, так и бромида.

Работа поддержана РФФИ (10-04-00820, 11-04-01262, 12-04-00301 и 12-04-90003) и грантом президента РФ МК-1484.2012.4.

Литература

1. Malle E., Furtmüller P.G., Sattler W., Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? // Br. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 152, N 6. – P.838 – 854.
2. Kettle A.J., Winterbourn C.C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase // Methods Enzymol. – 1994. Vol. – 233. – P.502 – 512.