



УДК 577.152.193.01:612.128

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИИ И ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. И. В. Горудко^{*,#}, О. С. Черкалина^{**}, А. В. Соколов^{**}, М. О. Пулина^{**},
Е. Т. Захарова^{**}, В. Б. Васильев^{**}, С. Н. Черенкевич^{*}, О. М. Панасенко^{***}

^{*}Белорусский государственный университет, кафедра биофизики,
220030, Минск, просп. Независимости, 4;

^{**}ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

^{***}ФГУ НИИ физико-химической медицины Росздрава, Москва

Поступила в редакцию 02.03.2009 г. Принята к печати 20.03.2009 г.

В работе впервые описан спектрофотометрический метод определения пероксидазной активности миелопероксидазы (МПО) в плазме крови человека с использованием *o*-дианизидина (DA) в качестве субстрата и специфических ингибиторов МПО (салицилгидроксамовой кислоты или гидразида 4-аминобензойной кислоты), позволяющих исключить возможный вклад других гемсодержащих пероксидаз (главным образом, гемоглобина и его производных). Определены оптимальные условия (рН, концентрация H₂O₂), при которых основной вклад в реакцию окисления DA плазмой вносит МПО. Концентрацию МПО определяли с помощью оригинальной методики иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител, полученных иммунизацией крыс и кроликов. Разработанная методика ИФА характеризуется высокой чувствительностью (0.2–250 нг/мл). Между активностью МПО, определенной спектрофотометрическим методом, и уровнем МПО, измеренным с помощью ИФА, в плазме крови 38 здоровых доноров выявлена достоверная положительная корреляционная зависимость ($P < 0.0001$). Предложенные новые подходы к определению МПО в плазме могут быть использованы для оценки концентрации и активности фермента, а также эффективности механизмов, регулирующих функцию МПО в физиологических условиях и при различных воспалительных заболеваниях.

Ключевые слова: миелопероксидаза, пероксидазная активность плазмы, плазма крови, *o*-дианизидин, гемоглобин, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Миелопероксидаза (МПО, донор: H₂O₂–оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7) представляет собой гликопротеин, состоящий из двух идентичных, соединенных между собой дисульфидной связью димеров, каждый из которых содержит гликозилированную тяжелую α -субъединицу (57 кДа) с ковалентно связанным гемом (протопорфирин IX с ионом Fe³⁺ в центре) и негликозилированную легкую β -субъединицу (12 кДа) [1]. Данный фермент локализуется, главным образом, в азурофильных гранулах нейтрофилов (до 5% общего клеточного белка) [2], а также в моноцитах (около 0.9% по весу) [3].

Упрощенная схема функционирования МПО приведена на рис. 1. Используя в качестве субстрата H₂O₂, продуцируемый *in vivo* при респираторном взрыве, высвобождаемая из активированных нейтрофилов МПО превращается в соединение I (рис. 1,

реакция 1). Эта форма МПО обладает высоким редокс-потенциалом и может далее участвовать в двух альтернативных процессах. Первый – двухэлектронное окисление галогенидов (Cl⁻, Br⁻, I⁻) и псевдогалогенидов (SCN⁻) с образованием высокореакционных гипогалоидных кислот (HOX, где X⁻ – галогенид или псевдогалогенид), замыканием так называемого цикла галогенирования и возвращением фермента в нативную ферри-форму (рис. 1, реакции 1 и 2). Второй процесс – превращение соединения I сначала в соединение II, а затем – в нативный фермент в результате последовательного одноэлектронного окисления ряда веществ (АН на рис. 1, субстраты пероксидаз) с замыканием так называемого пероксидазного цикла (рис. 1, реакции 1, 3 и 4). Таким образом, фермент может проявлять как галогенирующую, так и пероксидазную активность [4, 5].

Генерируемые МПО окислители (НОСl, НОВr, свободные радикалы и др.) являются высокореакционными соединениями; именно им принадлежит основная антимикробная функция нейтрофилов [4].

Сокращения: МПО – миелопероксидаза; DA – *o*-дианизидин.
[#] Автор для связи (тел.: (375-17) 209-5437; факс: (375-17) 209-5445; эл. почта: irinagorudko@rambler.ru).

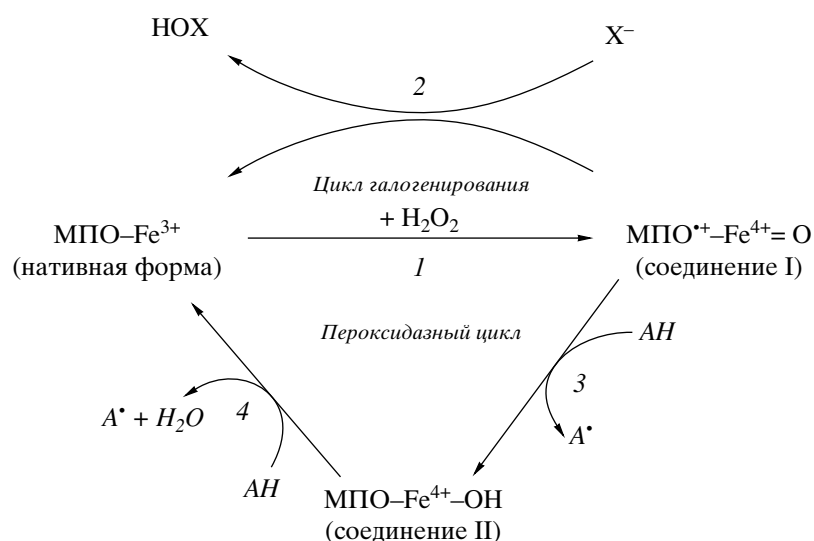


Рис. 1. Схема основных реакций МПО в галогенирующем и пероксидазном циклах. X⁻ – галогенид или псевдогалогенид (SCN⁻), AH – пероксидазный субстрат.

Эту роль МПО подтверждает тот факт, что у пациентов с дефицитом МПО, как правило, снижается сопротивляемость организма и повышается чувствительность к инфекциям [6].

Биологическое действие МПО в значительной мере определяется балансом между эффективностью секреции этого фермента во внеклеточное пространство на стадии дегрануляции нейтрофилов, с одной стороны, и его инактивацией и утилизацией в ткани, а также деградацией окислителей, образующихся в реакциях с участием МПО, с другой стороны. При секреторной дегрануляции или гибели нейтрофила может проявляться патологическое действие фермента [4]. В этом случае образующиеся в результате функционирования МПО сильные окислители инициируют пероксидацию липидов, модификацию белков и нуклеиновых кислот (включая галогенирование, нитрование, окисление и образование сшивок), вызывая тем самым повреждение собственных тканей организма в очагах воспаления. Являясь биохимическим маркером активации нейтрофилов, МПО может играть решающую роль при атеросклерозе [7], сердечно-сосудистых [8], онкологических [9], нейродегенеративных заболеваниях [10], нарушении дыхательной функции легких [11], при заболеваниях почек [12], системных васкулитах [13], ревматоидном артрите [14] и др.

В результате дегрануляции или лизиса нейтрофилов МПО может в значительном количестве попадать в кровь (до 1.11 мкг/мл, что составляет ~7.78 нМ [8]), что, безусловно, требует эффективных методов контроля содержания фермента. В клинических условиях определение уровня МПО в крови осуществляется с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением моноклональных антител к МПО [7, 8, 15]. Ме-

тод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но он не позволяет оценивать функциональную активность фермента [15], которая в конечном итоге определяет степень участия МПО в патогенезе целого ряда социально значимых заболеваний. Активность МПО можно характеризовать как через продукцию гипогалоидных кислот (галогенирующая активность) [5, 16], так и через окисление субстратов по пероксидазному циклу (пероксидазная активность) [5, 17]. Однако скорость реакции HOCl и HOBr с биологически важными молекулами плазмы крови по их функциональным группам зачастую настолько высока ($k > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [18], что современные методы не в состоянии зарегистрировать образование гипогалоидных кислот в сыворотке крови, а значит и определить в ней галогенирующую активность МПО. К сожалению, имеющиеся методы позволяют измерять галогенирующую активность МПО только при использовании очищенного фермента (в крайнем случае, в суспензии нейтрофилов [16]).

Оценка пероксидазной активности МПО осложнена тем обстоятельством, что в плазме крови присутствуют гемсодержащие белки, выполняющие функцию пероксидазы – главным образом гемоглобин и его производные [19]. Уровень гемоглобина в плазме в результате даже незначительного гемолиза может достигать микромолярных значений. Более того, некоторые белки, например церулоплазмин, способны окислять ароматические субстраты без участия пероксида водорода, проявляя оксидазную активность [20]. Необходимо также учитывать, что в крови существуют механизмы, регулирующие активность МПО. В частности, церулоплазмин, образуя комплексы с МПО, ингибирует фермент [21]. Понятно, что для определения реаль-

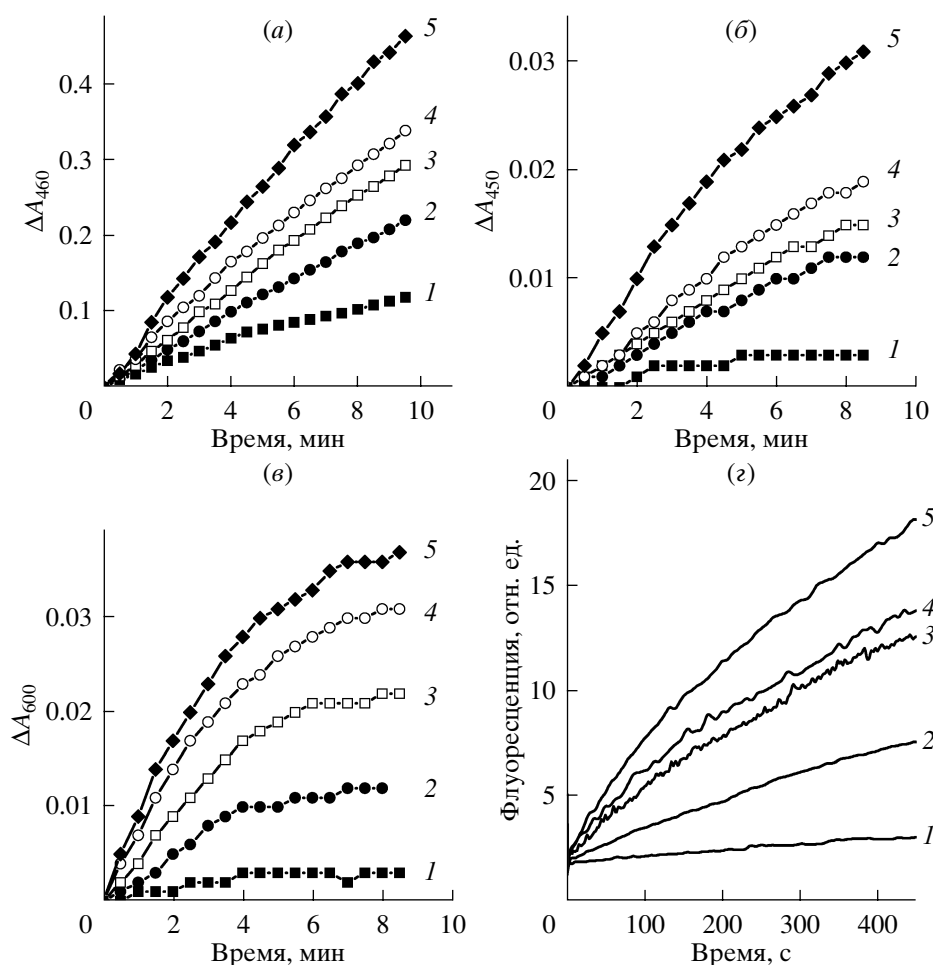


Рис. 2. Кинетические кривые изменения поглощения (ΔA) при окислении DA (а), гваякола (б), 4-хлор-1-нафтола (в) и изменения интенсивности флуоресценции при окислении тирозина (г) 1 мМ пероксидом водорода в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0 в присутствии МПО в концентрациях: 150 (1); 300 (2); 400 (3); 500 (4); 700 нг/мл (5).

ной активности МПО в плазме крови необходимо учитывать все осложняющие обстоятельства. Одновременное измерение концентрации МПО и ее активности даст возможность не только сделать вывод о количественном содержании МПО и ее функциональной способности в плазме, но и, в результате сравнительного анализа изменений данных показателей, оценить эффективность механизмов, регулирующих активность МПО в крови.

В настоящей работе впервые предложен спектрофотометрический метод, позволяющий определить пероксидазную активность МПО непосредственно в плазме крови, а также усовершенствован метод ИФА для определения содержания в ней МПО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка спектрофотометрического метода.

При подборе эффективной системы детекции пероксидазной активности МПО были изучены четы-

ре общепринятых ароматических субстрата: гваякол, 4-хлор-1-нафтол, *o*-дианизидин (DA) и тирозин. Как показано на рис. 2, в модельной буферной системе для всех субстратов в присутствии H_2O_2 наблюдалось дозозависимое увеличение активности МПО. Однако при проведении аналогичных экспериментов в присутствии плазмы крови с добавлением экзогенной МПО пероксидазная активность выявлялась только в реакции с DA (рис. 3, кривая 3). Добавление плазмы, содержащей МПО, в реакционную смесь с гваяколом, тирозином или 4-хлор-1-нафтолом не приводило к иницированию ферментативной реакции (данные не приведены). Прироста поглощения не наблюдали и в том случае, если в реакционную смесь не был добавлен пероксид водорода (рис. 3, кривая 1). Добавление H_2O_2 к плазме сопровождалось хотя и незначительным, но достоверным увеличением поглощения (рис. 3, кривая 2), обусловленным окислением DA именно в ходе пероксидазной реакции.

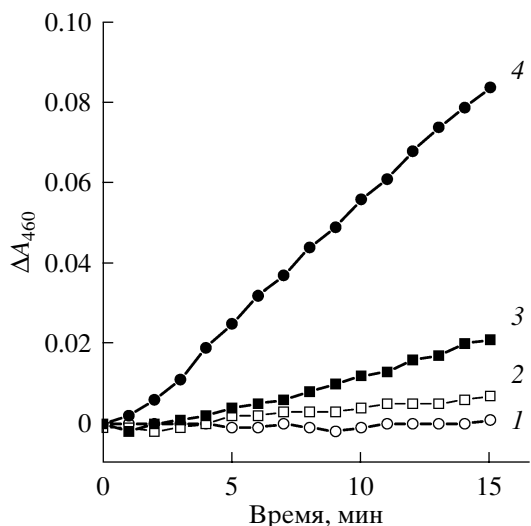


Рис. 3. Кинетические кривые окисления DA (380 мкМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0 в присутствии плазмы крови (1 : 13.3 по объему): 1 – оксидазная активность (в отсутствие H_2O_2); пероксидазная активность (в присутствии 1 мМ H_2O_2) исходной плазмы (2), плазмы, содержащей МПО (300 нг/мл, 3) и гемоглобин (1 мкМ, 4).

Как было сказано выше, общая пероксидазная активность плазмы помимо МПО определяется также гемоглобином и другими гемсодержащими белками, утилизирующими H_2O_2 [19]. Действительно, добавление к плазме 1 мкМ гемоглобина приводило к значительному приросту A_{460} (рис. 3, кривая 4), доказывая, что при таких условиях (1 мМ H_2O_2 , pH 7.0) гемоглобин вносит существенный вклад в общую пероксидазную активность.

Таким образом, пероксидазная активность МПО в плазме выявлялась только при использовании в качестве субстрата DA. Однако данный субстрат не является специфичным для МПО, другие гемсодержащие белки плазмы также могут участвовать в превращении DA и таким образом маскировать пероксидазную активность МПО. В связи с этим, для оценки активности МПО в плазме необходимо было решить, по крайней мере, две проблемы. Во-первых, подобрать условия, при которых вклад МПО в реакцию окисления DA плазмой максимален; во-вторых, исключить влияние пероксидазной активности, не связанной с действием МПО, то есть в первую очередь минимизировать вклад гемоглобина в окисление DA плазмой.

Известно, что активность МПО в значительной степени зависит от концентрации H_2O_2 [22, 23]. Зависимости пероксидазной активности плазмы с добавками МПО или гемоглобина от концентрации H_2O_2 приведены на рис. 4а. Видно, что в случае МПО эта зависимость имеет экстремальный характер с максимумом при 100 мкМ (дальнейшее увеличение концентрации H_2O_2 приводит к резкому паде-

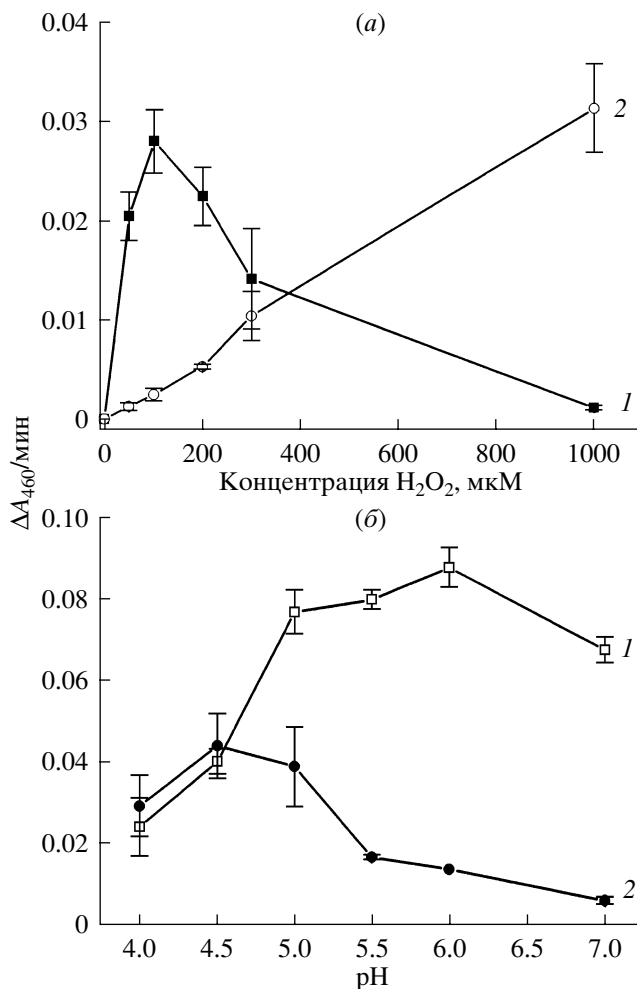


Рис. 4. а – Зависимость пероксидазной активности МПО (300 нг/мл) (1) и гемоглобина (1 мкМ) (2) от концентрации H_2O_2 (50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7.0, 380 мкМ DA). б – pH-зависимость пероксидазной активности МПО (фосфат-цитратный буфер, 380 мкМ DA, 100 мкМ H_2O_2) в отсутствие (1) и в присутствии плазмы крови (1 : 13.3 по объему, 2).

нию активности МПО, что вполне согласуется с литературными данными [22, 24]). В присутствии гемоглобина пероксидазная активность плазмы практически линейно увеличивалась с ростом концентрации H_2O_2 вплоть до 1 мМ. Вклад пероксидазной активности гемоглобина при 100 мкМ H_2O_2 крайне незначителен. Таким образом, оптимальная концентрация H_2O_2 для измерения пероксидазной активности МПО в плазме составляет 100 мкМ.

Величина pH-оптимума МПО составляет 4.5–6.0 [16, 24] и зависит от условий среды: ионной силы, вида и концентрации субстрата, присутствия других соединений [23]. Известно, что на активность МПО в отношении DA в плазме могут влиять церулоплазмин [21] или липопротеины крови [25], поэтому нами было проведено сравнение pH-зависимости активности МПО в буферном растворе и в присут-

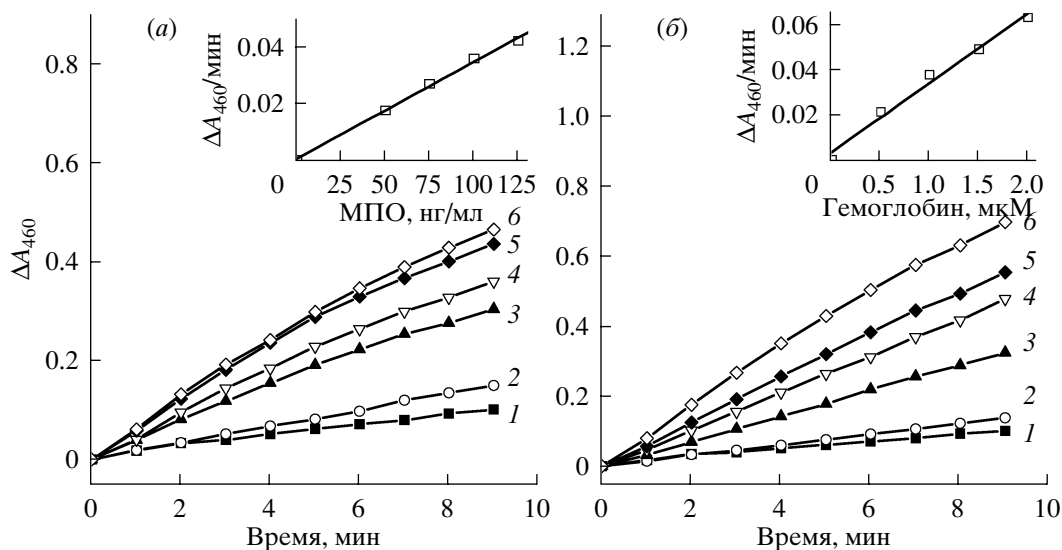


Рис. 5. Кинетические кривые окисления DA в фосфат-цитратном буфере, pH 4.5 плазмой крови (1 : 13.3 по объему) (380 мкМ DA, 100 мкМ H₂O₂) в присутствии экзогенных МПО (а) или гемоглобина (б). 1 – Окисление DA плазмой в отсутствие МПО/гемоглобина и H₂O₂ (оксидазная активность); 2, 3, 4, 5, 6 – концентрация МПО 0; 50; 75; 100 и 125 нг/мл соответственно (а); гемоглобина 0; 0.5; 1; 1.5 и 2 мкМ соответственно (б). На вставках приведены концентрационные зависимости пероксидазной активности МПО (а) и гемоглобина (б), рассчитанные из кинетических кривых за вычетом пероксидазной активности самой плазмы (кривая 2).

ствии плазмы (рис. 4б). Полученные результаты показывают, что присутствие плазмы сдвигает рН-оптимум активности фермента в более кислую область (рН 4.5) по сравнению с рН-оптимумом МПО в буферном растворе (5.5–6.0). Мы предполагаем, что это изменение может быть обусловлено наличием в плазме церулоплазмينا, который, взаимодействуя с МПО, ингибирует ее активность в реакции с DA [21]. Комплекс церулоплазмينا с МПО полностью диссоциирует ниже рН 3.9 [26], поэтому в кислой среде ингибирующее действие церулоплазмينا отсутствует и активность МПО повышается.

Важно отметить, что в присутствии плазмы пероксидазная активность гемоглобина при рН 4.5 снижалась. Так, скорость окисления DA гемоглобином (1 мкМ) в отсутствие и в присутствии плазмы составляла 0.06 и 0.04 ΔA₄₆₀/мин соответственно. Таким образом, минимизация вклада гемсодержащих белков в окисление DA плазмой достигается при концентрации H₂O₂ 100 мкМ и рН 4.5.

Типичные кинетические кривые окисления DA в подобранных нами условиях при различных концентрациях экзогенных МПО и гемоглобина представлены на рис. 5а и 5б соответственно. Видно, что увеличение A₄₆₀ в системе плазма + DA + H₂O₂ хорошо регистрируется уже при добавлении небольшого количества МПО (50 нг/мл, т.е. 0.34 нМ; рис. 5а, кривая 3), а гемоглобин дает сравнимый прирост поглощения только в существенно больших концентрациях (0.5 мкМ; рис. 5б, кривая 3). Концентрационные зависимости активности МПО и гемоглобина, рассчитанные по данным кинетических кри-

вых за вычетом пероксидазной активности самой плазмы (кривой 2 на рис. 5), приведены на вставках. Видно, что они носят линейный характер: активность МПО и гемоглобина прямо пропорционально возрастает с увеличением их концентрации. Таким образом, несмотря на то, что подобранные нами условия минимизируют вклад гемоглобина при определении активности МПО в плазме, априори нельзя полностью исключить его возможного вклада в регистрируемую пероксидазную активность (особенно при гемолизе, когда концентрация гемоглобина в плазме может достигать микромолярных значений).

В литературе описаны попытки исключения вклада гемоглобина при определении активности МПО. Так, при измерении активности МПО в биологической ткани авторы работы [27] отделяли этот белок гель-фильтрацией. В другой работе, с целью селективного определения активности МПО в синовиальной жидкости, было предложено использовать ингибитор фермента – гидразид 4-аминобензойной кислоты [28]. Для возможности выявления вклада гемоглобина в пероксидазную активность плазмы нами были использованы специфические ингибиторы МПО – гидразид 4-аминобензойной кислоты [29] и салицилгидроксамовая кислота [30]. Каждый из ингибиторов добавляли к плазме, содержащей в одном случае разные количества МПО при постоянной концентрации гемоглобина, а в другом – разные количества гемоглобина при постоянной концентрации МПО. Во всех полученных образцах плазмы регистрировали пероксидазную активность при подобранных нами условиях. Результаты экспери-

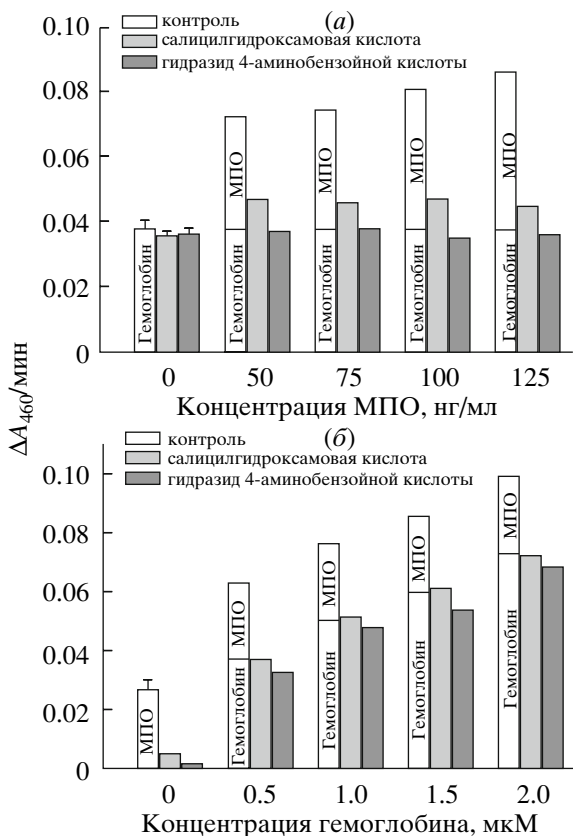


Рис. 6. Влияние салицилгидроксамовой кислоты (100 мкМ) и гидразида 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ) на пероксидазную активность плазмы крови (1 : 13.3 по объему в фосфат-цитратном буфере, рН 4.5; 380 мкМ DA; 100 мкМ H_2O_2), содержащей 1 мкМ гемоглобин и МПО в разных концентрациях (а) или 100 нг/мл МПО и гемоглобин в разных концентрациях (б).

мента приведены на рис. 6. Видно, что во всех случаях в присутствии ингибиторов МПО в плазме выявлялась только пероксидазная активность гемоглобина. Эти данные подтверждают тот факт, что выбранные вещества специфично ингибируют МПО без влияния на активность гемоглобина. Иными словами, с помощью данных ингибиторов возможно исключить вклад МПО в пероксидазную активность плазмы и определить вклад гемоглобина.

Таким образом, предлагаемый метод определения активности МПО в плазме предполагает спектрофотометрическое измерение скорости окисления DA при рН 4.5 и концентрации пероксида водорода 100 мкМ в отсутствие и в присутствии ингибитора МПО (100 мкМ салицилгидроксамовой кислоты или 50 мкМ гидразида 4-аминобензойной кислоты). Пероксидазная активность МПО плазмы в этом случае определяется, как общая пероксидазная активность (измерение в присутствии пероксида водорода, но в отсутствие ингибитора) за вычетом пероксидазной активности, измеренной в присут-

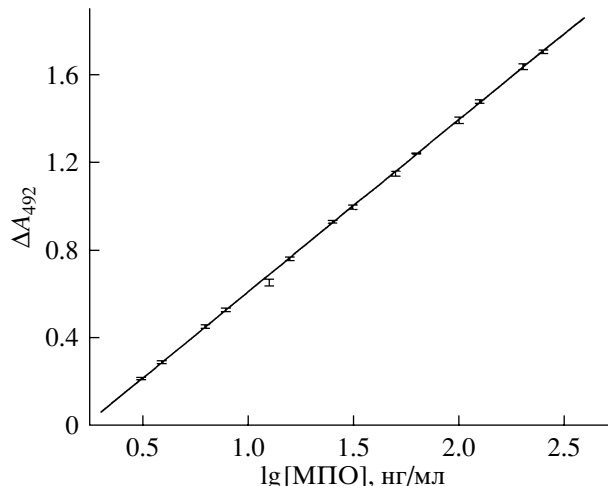


Рис. 7. Типичная калибровочная зависимость A_{492} от концентрации МПО (нг/мл, логарифмические координаты) для расчета содержания МПО в плазме крови при ИФА ($R^2 = 0.9958$; $y = 0.75x - 0.1819$).

ствии пероксида водорода и ингибитора. Следует отметить, что плазма, как правило, катализирует окисление DA и в отсутствие H_2O_2 , то есть обладает оксидантной активностью. Однако при использовании разработанного нами разностного метода вклад оксидантной активности плазмы исключается.

Разработка высокочувствительного ИФА.

Для определения общего содержания МПО в плазме был разработан твердофазный сандвич-ИФА с использованием поликлональных антител от животных различных видов (общая схема анализа приведена в табл. 1). В предварительных экспериментах нами были отработаны оптимальные условия для проведения всех стадий анализа. При сорбции первичных аффинных антител крыс на полистирольных планшетах в натрий-карбонатном буфере, рН 9.4, их оптимальной концентрацией являлась 5 мкг/мл. Вероятно, уменьшение этой концентрации приводило к снижению конечного сигнала из-за недостаточной сорбции МПО, а ее увеличение вызывало избыточную, т.е. неплотную сорбцию антител, что служило причиной десорбции комплексов антител и МПО с планшета. В качестве балластных белков для инкубации были применены альбумин, желатин и белки сухого молока. Для последних линейная зависимость A_{492} от $\lg[\text{МПО}]$ наблюдалась в наиболее широком диапазоне, вероятно, благодаря наименьшему влиянию на взаимодействие МПО с антителами.

Добавление 0.05% Твин-20 на всех стадиях ИФА позволило исключить влияние компонентов плазмы на сорбцию МПО. Используя для измерения последовательные двукратные разведения стандартных растворов МПО (200 и 250 нг/мл), мы получили линейную зависимость A_{492} от $\lg[\text{МПО}]$ в диапазоне 3–250 нг/мл (рис. 7). Следует, однако, отметить,

Таблица 1. Процедура ИФА для определения содержания МПО в плазме

Номер	Этап	Реагент, количество на лунку, условия и длительность
1	IgG крысы	5 мкг/мл антител крысы против МПО в 0.1 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.4, 100 мкл; +4°C; 17 ч
2	Промывка	0.05% Твин-20 (по объему) в PBS, 200 мкл; +20°C; 3 × 30 с
3	Блокировка	VLOTTO-T, 200 мкл; +37°C; 1 ч
4	Стандарты/образцы	Повтор этапа 2; стандарты получены последовательными двукратными разведениями МПО (диапазон концентраций 3–200 нг/мл) в VLOTTO-T, а образцы – разведением исследуемой плазмы (в 4–256 раз) в VLOTTO-T; 100 мкл; +37°C; 1 ч
5	IgG кроликов	Повтор этапа 2; 10 мкг/мл антител кроликов против МПО в VLOTTO-T, 100 мкл; +37°C; 1 ч
6	Меченые антитела	Повтор этапа 2; антитела коз против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 5000, BioRad) в VLOTTO-T, 100 мкл; +37°C; 1 ч
7	Субстрат	Повтор этапа 2; к раствору 10 мг <i>o</i> -фенилендиамина в 1 мл этанола добавить 11 мл 0.1 М натрий-цитратного буфера, pH 4.0 и 5 мМ H ₂ O ₂ ; 100 мкл; +37°C, 4–5 мин
8	Остановка реакции	50 мкл 6 М H ₂ SO ₄ , 30 с
9	Измерение	Планшетный фотометр A ₄₉₂

Таблица 2. Характеристики определения МПО в плазме с помощью спектрофотометрического метода (СФ) и ИФА

Показатель	СФ	ИФА
Диапазон линейности концентраций МПО, нг/мл	25–700	3–250
Предельная чувствительность, нг/мл	25	0.2
Различия показаний в одном опыте, %	3	2
Различия показаний в различных опытах, %	4	6
Время анализа/количество образцов	10–15 мин/6 образцов	5 ч/22 образца

что предельная чувствительность теста была еще выше: значение A₄₉₂ для лунки, содержащей 0.2 нг/мл МПО, статистически достоверно отличалось от контроля (*P* < 0.001). Различие между параллельными пробами в одном опыте никогда не превышало 2%. Отличия между двумя независимыми опытами достигали 6%, что, вероятно, связано с различиями в сорбции антител на первом этапе анализа. Эта особенность теста требует проведения калибровки по стандартным образцам МПО в каждом новом опыте.

Модификации методик ИФА, в которых использование антител от животных различных видов позволяет повысить чувствительность метода, были описаны и ранее [31]. Наш вариант принципиально отличается тем, что мы использовали не моноклональные, а поликлональные антитела, полученные от крыс и кроликов. Наличие нескольких антигенсвязывающих участков у поликлональных антител повышает их avidность, а различие антигенных детерминант для антител крыс и кроликов снижает вероятность конкуренции за связывание с антигеном. Именно это позволило добиться столь высокой предельной чувствительности оригинального ИФА – 0.2 нг МПО/мл (для сравнения, в аналогичном методе с использованием моноклональных ан-

тител предельная чувствительность составила только 15 нг МПО/мл [31]). Широкий линейный диапазон разработанного метода (3–250 нг/мл) позволяет выявить в плазме крови как нормальный, так и патологически повышенный уровень МПО.

Сравнение методов определения МПО. Общие характеристики метода ИФА и спектрофотометрического метода приведены в табл. 2. Оба метода применимы в широком диапазоне концентраций, т.е. позволяют измерить и нормальный, и патологический уровень МПО в плазме. Предельная чувствительность ИФА выше, чем у спектрофотометрического метода, однако, при каждом его проведении требуется калибровка по стандартному препарату МПО. Несомненным преимуществом спектрофотометрического метода является быстрота анализа. Он также не требует сложного лабораторного оборудования, что делает его удобным для использования в клинической практике.

Мы сопоставили результаты исследования образцов плазмы крови от 38 доноров спектрофотометрическим методом и ИФА. На рис. 8 представлены графики, отражающие взаимосвязь концентрации и пероксидазной активности МПО в плазме. При использовании в качестве ингибитора МПО

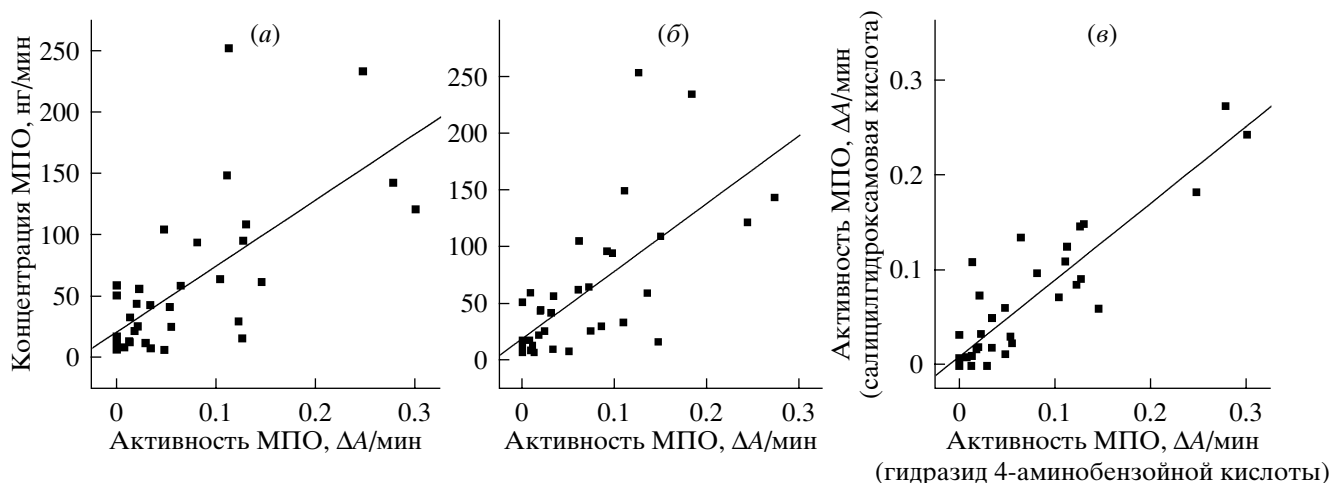


Рис. 8. Взаимосвязь между концентрацией МПО в плазме, измеренной методом ИФА, и пероксидазной активностью МПО, определенной разностным спектрофотометрическим методом с использованием (а) салицилгидроксамовой кислоты (100 мкМ) ($n = 38$; $r = 0.694$, $P < 0.0001$) или (б) гидразида 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ) ($n = 38$; $r = 0.701$, $P < 0.0001$). (в) Взаимосвязь между пероксидазной активностью МПО в плазме, измеренной разностным спектрофотометрическим методом с использованием салицилгидроксамовой кислоты (100 мкМ) и гидразида 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ) ($n = 38$; $r = 0.903$, $P < 0.0001$).

как салицилгидроксамовой кислоты (рис. 8а), так и гидразида 4-аминобензойной кислоты (рис. 8б) выявлена достоверная корреляционная зависимость ($P < 0.0001$) между активностью и концентрацией МПО в плазме с коэффициентами корреляции 0.694 и 0.701 соответственно. Близость этих значений, а также высокий коэффициент линейной корреляции (0.903) между значениями пероксидазной активности МПО в плазме, измеренными с использованием этих ингибиторов (рис. 8в), говорит о том, что оба вещества позволяют одинаково эффективно измерять пероксидазную активность, присущую МПО в плазме.

Одним из способов оценки последствий функциональной активности МПО в настоящее время является регистрация концентраций так называемых биомаркеров МПО – продуктов реакций окислителей, образующихся при участии МПО, с функциональными группами биологически важных молекул. Так, иммуногистохимически и с помощью масс-спектрометрии было показано присутствие МПО и продуктов опосредованных ею реакций (хлорированные и нитрированные остатки тирозина, хлорированные липиды) в атеросклеротической бляшке в отличие от непораженной интимы [32]. Повышенный уровень МПО-специфичных продуктов галогенирования, а именно белков, содержащих 3-хлортирозин, выявлен в бронхоальвеолярном лаваже легочных больных [11] и в ткани мозга страдающих болезнью Альцгеймера [33]. Иммуногистохимически было установлено присутствие белков, модифицированных НОС1, в почках больных гломерулонефритом [34]. Однако перечисленные методические подходы весьма сложны, трудоемки и

требуют специального дорогостоящего лабораторного оснащения.

Что касается проведения исследований в плазме крови, то в литературе до настоящего времени были описаны спектрофотометрические методы определения только общей пероксидазной активности [35]. В работе [36] авторы попытались оценить активность МПО в сыворотке крови, используя общепринятый спектрофотометрический метод, применяемый для изолированного фермента в растворе, с ДА в качестве субстрата, но без учета возможного вклада со стороны других агентов, обладающих псевдопероксидазной активностью. Однако, как показали проведенные нами исследования, такой методический подход является ошибочным и не позволяет оценить реальную активность МПО в плазме.

Определение активности МПО в плазме крови представляется перспективным при разработке эффективных способов контроля и регуляции функции фермента как в физиологических условиях, так и при различных заболеваниях, а также при мониторинге МПО во время клинических испытаний фармакологических препаратов. Хотя спектрофотометрический метод определения МПО не требует специального оборудования, получения антител и стандарта МПО, следует отметить целесообразность определения одновременно как активной, так и иммунореактивной МПО. Соотношение этих показателей позволит судить не только о количестве МПО и ее активности, но и об эффективности функционирования механизмов регуляции и ингибирования МПО в плазме, т.е. об одном из звеньев антиоксидантного статуса организма.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использовали DA, гидразид 4-аминобензойной кислоты, салицилгидроксиамин, тирозин, гемоглобин человека, *o*-фенилендиамин, адъювант Фрейнда (Sigma-Aldrich, США), 4-хлор-1-нафтол (Fluka, Швейцария), гваякол (Merck, Германия), хроматографические сорбенты (Pharmacia, Швеция), 3% раствор H₂O₂ (Sagmel, США), антитела коз против IgG кролика, меченные пероксидазой хрена, обезжиренное сухое молоко (BioRad, США), реактивы для электрофореза (МЕДИГЕН, Россия).

Выделение МПО из лейкоцитов проводили с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе, фенол-сефарозе и гель-фильтрации [26]. Соотношение A_{430}/A_{280} (R_z) служило характеристикой чистоты и гомогенности МПО и обычно составляло не менее 0.75. Для полученной нами МПО $R_z = 0.85$.

Образцы плазмы получали центрифугированием крови, стабилизированной 3.8%-ным раствором цитрата натрия, при 600 g в течение 15 мин.

Измерение пероксидазной активности нативной МПО. Стандартный образец для спектрофотометрического определения пероксидазной активности МПО в растворе содержал: 50 mM Na-фосфатный буфер (pH 7.0), 1 mM H₂O₂, субстрат и МПО в необходимой концентрации. В качестве субстратов использовали гваякол (500 мкМ), 4-хлор-1-нафтол (500 мкМ) или DA (380 мкМ). Реакцию запускали добавлением 1 mM H₂O₂ и в кинетическом режиме в течение 6–8 мин определяли A_{450} , A_{600} или A_{460} при использовании гваякола, 4-хлор-1-нафтола или DA соответственно. Измерения проводили при 20°C на спектрофотометре СОЛАР PV 1251с (Минск, Беларусь). Пероксидазную активность МПО по отношению к тирозину (100 мкМ) регистрировали спектрофлуориметрически (длины волн возбуждения и испускания – 325 и 410 нм соответственно) при тех же условиях на спектрофлуориметре СОЛАР LSF1211A (Минск, Беларусь).

Измерение пероксидазной активности в плазме. Пероксидазную активность МПО и гемоглобина в плазме измеряли в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 7.0). Измерение пероксидазной активности при pH 4.5, а также исследование pH-зависимости активности МПО и гемоглобина в диапазоне pH 4.0–7.0 проводили в буферном растворе 0.2 M Na₂HPO₄/0.1 M лимонной кислоты (далее – фосфат-цитратный буфер). Реакцию запускали добавлением H₂O₂ (100 мкМ), если не указано иначе. Исходную плазму разбавляли в 13.3 раза, т.е. 60 мкл плазмы до объема образца 800 мкл. Для ингибирования активности МПО в плазму добавляли салицилгидроксиамин (100 мкМ) или гидразид 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ).

Активность МПО в плазме вычисляли согласно соотношению:

$A_{\text{МПО}} = (\Delta A/\text{мин} - \Delta A_{\text{инг}}/\text{мин}) \times (V/v)$, где $\Delta A/\text{мин}$ и $\Delta A_{\text{инг}}/\text{мин}$ – скорость окисления DA в отсутствие и в присутствии ингибитора; V – общий объем реакционной смеси; v – объем образца плазмы. Скорость окисления DA определяли как тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой, содержащей минимум шесть экспериментальных точек, по линейной экстраполяции с использованием статистической программы графического редактора Origin 7.0.

Подготовка антигена для иммунизации животных. МПО дополнительно очищали от минорных примесей с помощью препаративного электрофореза в ПААГ (разделяющий гель – 7.5% ПААГ, КОН-CH₃COOH-буфер, pH 4.3; концентрирующий гель – 5% ПААГ, КОН-CH₃COOH-буфер, pH 6.7) [26]. По нашим многолетним наблюдениям, постепенный выход антигена из геля в очаге иммунизации и само присутствие полиакриламида в составе пробы увеличивают титр антител. После электрофореза окрашенную в зеленый цвет МПО-содержащую зону ПААГ вырезали и замораживали порциями из расчета 200 мкг белка на однократную иммунизацию животного. Перед иммунизацией кусочки геля с антигеном измельчали в гомогенизаторе с PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.4) и адъювантом Фрейнда (1 : 10 по объему).

Получение кроличьих IgG против МПО. Суспензию, содержащую антиген, вводили кроликам внутривенно в паравertebralную область интервалами в две недели. Использовали полный адъювант Фрейнда для 1-й и неполный – для 2-й и 3-й иммунизаций. Через 10–12 сут после 3-й иммунизации из ушной вены кроликов забирали кровь (по 50 мл), отделяли сыворотку и из нее “высаливали” IgG, добавляя (NH₄)₂SO₄ до концентрации 1.75 M. Осадок промывали 3 раза 1.75 M (NH₄)₂SO₄, растворяли в PBS и диализовали против 17.5 mM Na-фосфатного буфера, pH 6.3. Полученный раствор пропускали через колонку с DEAE-сефадексом А-50. IgG выходил из колонки в свободном объеме. Вторую фракцию IgG получали при элюции колонки 35 mM Na-фосфатным буфером, pH 7.6. Эти фракции, которые, согласно данным SDS-ПААГ-электрофореза [37], содержали IgG с M 160 кДа, объединяли, диализовали против воды и лиофильно высушивали.

Получение крысиных IgG против МПО. Суспензию, содержащую антиген, вводили годовалым крысам (500–600 г) внутривенно в паравertebralную область с интервалами в 10 сут. Использовали полный адъювант Фрейнда для 1-й и неполный – для следующих трех иммунизаций. Через 10–12 сут после 4-й иммунизации крыс наркотизировали эфиром, забирали кровь (по 25 мл) и отделяли сыворотку. Для получения аффинного сорбента МПО иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе (5 мг на 1 мл смолы) [26]. На колонку с МПО-сефарозой (5 × 2 см), предварительно уравновешенную

PBS, наносили 150 мл сыворотки и отмывали PBS с 1 М NaCl. Затем проводили элюцию 0.2 М глицин-HCl (pH 2.4), собирая по 2.5 мл элюата в пробирки, содержавшие 2.5 мл 0.4 М Трис-HCl, pH 8.0. Фракции, которые, по данным SDS-ПААГ-электрофореза, содержали IgG с M 160 кДа, объединяли, диализовали против 10 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.4 и хранили при -70°C .

Процедура ИФА. В работе использовали 96-луночные полистирольные планшеты с плоским дном. Реагенты добавляли многоканальными пипетками. Инкубацию проводили в термошейкере для иммуноанализа (BioSan, Латвия) при 37°C и перемешивании со скоростью 290 об/мин. Растворы готовили на основе 3% обезжиренного молока (вес/объем) в PBS с добавлением 0.05% Твин-20 (BLOTTO-T). Последовательность операций суммирована в табл. 1. Сорбцию IgG крыс в лунках планшета обычно проводили при 4°C в течение ночи, но в ряде случаев планшеты с антителами хранились при 4°C до двух недель без снижения точности анализа. После остановки хромогенной реакции измеряли A_{492} содержимого лунок на планшетном фотометре StatFax (США). Зависимость A_{492} от $\text{Ig}[\text{МПО}]$ (нг/мл) аппроксимировали прямой по методу наименьших квадратов (коэффициент детерминированности R^2 составлял не менее 0.99) с использованием программы Microsoft Excel 2002. Содержание МПО в образцах рассчитывали с помощью полученного уравнения $A_{492} = k \lg[\text{МПО}] + b$.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Стьюдента, Пирсона и корреляционного анализа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 08-04-00532) и БРФФИ (грант № Б08-107). Выражаем благодарность проф. В.Н. Кокрякову (ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН) за любезно предоставленную лейкоцитарную массу для выделения МПО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrews P.C., Krinsky N.I. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 4211–4218.
- Schultz J., Kaminker K. // Arch. Biochem. Biophys. 1962. V. 96. P. 465–467.
- Deby-Dupont G., Deby C., Lamy M. // Intensivmed. 1999. V. 36. P. 500–513.
- Klebanoff S.J. // J. Leukoc. Biol. 2005. V. 77. P. 598–625.
- Kettle A.J., Winterbourn C.C. // Redox Report. 1997. V. 3. P. 3–15.
- Lanza F. // J. Mol. Med. 1998. V. 76. P. 676–681.
- Zhang R., Brennan M.-L., Fu X., Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Sprecher D.L., Hazen S.L. // JAMA. 2001. V. 286. P. 2136–2142.
- Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M., Eiserich J.P., Münzel T., Simoons M.L., Hamm C.W. // Circulation. 2003. V. 108. P. 1440–1445.
- Rainis T., Maor I., Lanir A., Shnizer S., Lavy A. // Dig. Dis. Sci. 2007. V. 52. P. 526–530.
- Yap Y.W., Whiteman M., Cheung N.S. // Cell Signal. 2007. V. 19. P. 219–228.
- Kettle A.J., Chan T., Osberg I., Senthilmohan R., Chapman A.L.P., Mocatta T.J., Wagener J.S. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004. V. 170. P. 1317–1323.
- Malle E., Buch T., Grone H.J. // Kidney Int. 2003. V. 64. P. 1956–1967.
- Higashi N., Mita H., Taniguchi M., Turikisawa N., Higashi A., Ozawa Y., Tohma S., Arimura K., Akiyama K. // J. Allergy Clin. Immunol. 2004. V. 114. P. 1353–1358.
- Nurcombe H.L., Bucknall R.C., Edwards S.W. // Ann. Rheum. Dis. 1991. V. 50. P. 237–242.
- Mocatta T.J., Pilbrow A.P., Cameron V.A., Senthilmohan R., Frampton C.M., Richards A.M., Winterbourn C.C. // J. Am. Coll. Cardiol. 2007. V. 49. P. 1993–2000.
- Kettle A.J., Winterbourn C.C. // Methods Enzymol. 1994. V. 233. P. 502–512.
- Pruitt K.M., Kamau D.N., Miller K., Miinsson-Rahemtulla B., Rahemtulla F. // Anal. Biochem. 1990. V. 191. P. 278–286.
- Pattison D.I., Davies M.J. // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 3271–3290.
- Alayash A.I., Patel R.P., Cashon R.E. // Antioxid. Redox. Signal. 2001. V. 3. P. 313–327.
- Schosinsky K.H., Lehmann H.P., Beeler M.F. // Clin. Chem. 1975. V. 21. P. 757–759.
- Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenko O.M., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. // Free Rad. Res. 2008. V. 42. P. 989–998.
- Ohno Y., Gallin J.I. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 8438–8446.
- Zgliczynski J.M., Stelmaszynska T., Ostrowski W., Naskalski J., Sznajd J. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 4. P. 540–547.
- Власова И.И., Арнхольд Ю., Осипов А.Н., Панасенко О.М. // Биохимия. 2006. Т. 71. С. 825–837.
- Marsche G., Furtmüller P.G., Obinger C., Sattler W., Malle E. // Cardiovasc. Res. 2008. V. 79. P. 187–194.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Айрапетов М.И., Берлов М.Н., Волгин Г.Н., Марков А.Г., Яблонский П.К., Колодкин Н.И., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 506–514.
- Xia Y., Zweier J.L. // Anal. Biochem. 1997. V. 245. P. 93–96.
- Fietz S., Bondzio A., Moschos A., Hertsch B., Einspanier R. // Res. Vet. Sci. 2008. V. 84. P. 347–353.
- Kettle A.J., Gedye C.A., Winterbourn C.C. // Biochem. J. 1997. V. 321. P. 503–508.
- Davies B., Edwards S.W. // Biochem. J. 1989. V. 258. P. 801–806.
- Chang P.Y., Wu T.L., Hung C.C., Tsao K.C., Sun C.F., Wu L.L., Wu J.T. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 373. P. 158–163.

32. Daugherty A., Dunn J.L., Rateri D.L., Heinecke J.W. // J. Clin. Invest. 1994. V. 94. P. 437–444.
33. Green P.S., Mendez A.J., Jacob J.S., Crowley J.R., Growdon W., Hyman B.T., Heinecke J.W. // J. Neurochem. 2004. V. 90. P. 724–733.
34. Gröne H.J., Gröne E.F., Malle E. // Lab. Invest. 2002. V. 82. P. 5–14.
35. Waugh W.H. // J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2003. V. 25. P. 831–834.
36. Baskol G., Demir H., Baskol M., Kilic E., Ates F., Karakucuk C., Ustdal M. // Cell Biochem. Funct. 2006. V. 24. P. 307–311.
37. Laemmli U.K. // Nature (London). 1970. V. 227. P. 680–686.

New Approaches to the Measurement of the Concentration and Peroxidase Activity of Myeloperoxidase in Human Blood Plasma

I. V. Gorudko^{a,#}, O. S. Tcherkalina^b, A. V. Sokolov^b, M. O. Pulina^b, E. T. Zakharova^b, V. B. Vasilyev^b, S. N. Cherenkevich^a, and O. M. Panasenko^c

[#]Phone: +375 (17) 209 5437; fax: +375 (17) 209 5445; e-mail: irinagorudko@rambler.ru

^a Department of Biophysics, Belarusian State University, pr. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus

^b Institute for Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia

^c Research Institute of Physico-Chemical Medicine, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119992 Russia

A novel method for spectrometrical measurement of myeloperoxidase (MPO) activity in plasma with *o*-dianisidine (DA) as a substrate is proposed. We have determined the optimal conditions, including the pH and hydrogen peroxide concentration, under which MPO is the main contributor to DA oxidation in plasma. Specific MPO inhibitors, salicylhydroxamic acid or (4-aminobenzoyl)hydrazide, are added to measure the activity of other heme-containing peroxidases (mainly hemoglobin and its derivatives) and subtract their contribution from the total plasma peroxidase activity. Plasma MPO concentrations are quantified by a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) developed by us and based on the use of antibodies raised in rats and rabbits. The sensitivity of this ELISA is high: 0.2–250 ng/ml. A direct and significant ($P < 0.0001$) correlation was observed between the MPO activities measured spectrometrically and by ELISA in blood samples from 38 healthy donors. The proposed approaches to MPO measurement in plasma can be used to evaluate the enzyme activity and concentration, as well as the efficacy of mechanisms by which MPO is regulated under physiological conditions and against the background of various inflammatory diseases.

Key words: myeloperoxidase, plasma peroxidase activity, blood plasma, *o*-dianisidine, hemoglobin, enzyme-linked immunosorbent assay