

Определение тиолпероксидазной активности в сыворотке крови крыс с использованием трет-бутилгидропероксида и гомоцистеина

© Разыграев^{1,2} Алексей Вячеславович

¹ Лаборатория фармакологических исследований. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. Ул. Профессора Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 197376. Россия. Тел.: (812) 234-57-29.

² Лаборатория фармакологии. Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта. Менделеевская линия, 3. г. Санкт-Петербург, 199034. Россия. Тел.: (812) 328-98-29. E-mail: alexeyrh@mail.ru

Ключевые слова: гомоцистеин; органический гидропероксид; цистеамин; реактив Элмана.

Аннотация

Тиолпероксидазы представляют собой ферменты, катализирующие восстановление неограниченных (H_2O_2) и органических гидропероксидов, и включают в себя глутатионпероксидазы (Grx) и пероксиредоксины. Тиолпероксидазы группы Grx утилизируют глутатион (GSH) в качестве восстановителя. Ранее установлено, что внеклеточная селензависимая глутатионпероксидаза (Grx3), выделенная из плазмы человека, обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к тиолам и может утилизировать такие низкомолекулярные тиолы как цистеин, меркаптоэтанол и дитиотреитол вместо GSH (Takebe et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277: 41254-41258). В предыдущих исследованиях нами получены результаты, свидетельствующие в пользу того, что Grx3 плазмы крови крыс способна утилизировать восстановленную форму гомоцистеина (Hcy-SH) вместо восстановленного GSH в тиолпероксидазной реакции с H_2O_2 (Разыграев и др., *Биомед. химия*, **2016**, 62: 431-438). В настоящей работе, выполненной с использованием Hcy-SH, мы заменили H_2O_2 трет-бутилгидропероксидом (ТВНР) и разработали новый вариант метода определения тиолпероксидазной активности в сыворотке крови с применением реактива Элмана для регистрации убыли тиола. При использовании реакционной смеси, состоящей из 0.073 М Tris-HCl буфера (pH 8.5), 0.25 мМ ЭДТА, 17.1 мМ NaN_3 , 0.45 мМ DL-Hcy-SH, 1.6 мМ ТВНР и разбавленной сыворотки крови крыс (температура инкубации смеси – 37 °С), показано, что скорость реакции Hcy-SH с ТВНР, катализируемой ферментом сыворотки, пропорциональна содержанию биоматериала в реакционной смеси; скорость ферментативной реакции постоянна в течение более чем 40 с инкубации. Мольное отношение между Hcy-SH и ТВНР в катализируемой реакции близко к 2:1, что соответствует стехиометрии Hcy-SH:ТВНР–оксидоредуктазной реакции. В кинетическом исследовании установлено, что концентрация ТВНР, равная 1.6 мМ, является насыщающей для фермента при 0.45 мМ DL-Hcy-SH. Мы полагаем, что Hcy-SH и ТВНР – оптимальное сочетание субстратов для определения тиолпероксидазной активности в сыворотке (или активности Grx3) по причине низкой скорости спонтанного взаимодействия Hcy-SH с ТВНР в используемых условиях инкубации.