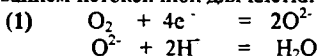


О МЕТОДАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

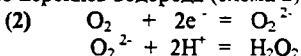
Уральская государственная медицинская академия

Известно, что молекулярный кислород может оказывать токсическое действие на аэробные организмы. Этот эффект связан с избыточным образованием некоторых форм активированного кислорода и первичных продуктов взаимодействия последних с нормальными метаболитами клетки.

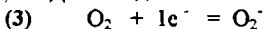
В норме на конечном этапе электронтранспортной цепи цитохромоксидаза одновременно переносит 4 электрона на одну молекулу кислорода. Далее активированный кислород реагирует с протонами с образованием нетоксичной для клетки воды (схема 1):



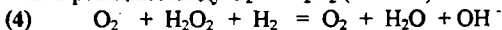
Однако, некоторые флавиносодержащие ферменты, например, глюкозооксидаза, оксидазы аминокислот, ксантинооксидаза могут переносить на кислород сразу 2 электрона с образованием иона пероксида. При взаимодействии с протонами пероксид-ион превращается в токсичную перекись водорода (схема 2):



Возможен также перенос только одного электрона на молекулу кислорода с образованием крайне реакционноспособного супероксид-радикала. Эту реакцию могут катализировать, например, альдегидоксидаза, НАДФ-оксидаза и некоторые другие ферменты (схема 3):

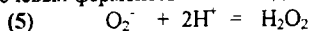


Одним из наиболее токсичных производных супероксид-радикала является гидроксил-радикал, образующийся в ходе неферментативной реакции между O_2^- и H_2O_2 (схема 4):

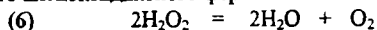


Для предотвращения вредного воздействия таких форм активированного кислорода в клетке функционирует антиоксидантная система. Она состоит из нескольких звеньев и включает "активные" и "пассивные" механизмы. К пассивным компонентам этой системы относятся имеющиеся в клетке антиоксиданты - вещества, способные без участия ферментов взаимодействовать с активированными формами кислорода, гидроксил-радикалом и перекисью кислорода с образованием нетоксичных для клетки конечных продуктов. В эту группу соеди-

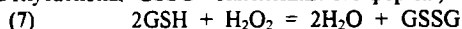
нений входят аскорбиновая и мочевая кислоты, некоторые другие соединения. Активные компоненты антиоксидантной системы клетки представлены ферментативными комплексами. Так, на этапе обезвреживания супероксид-радикала действует супероксиддисмутаза - один из ключевых ферментов антиоксидантной защиты (схема 5):



В конечном счете, первичным продуктом обезвреживания собственно активированных токсичных форм молекулярного кислорода является пероксид водорода (схемы (2) и (5)), также очень токсичное вещество. Нейтрализация этого соединения происходит при участии другого антиоксидантного фермента - каталазы (схема 6):



Наконец, третьим ферментативным компонентом антиоксидантной системы является пероксидаза, катализирующая разложение перекисей (водорода и органических соединений) по схеме 7 (приведена реакция с участием глутатионпероксидазы, GSH-восстановленная форма глутатиона, GSSG - окисленная его форма):



Для пероксидазы характерна специфичность фермента к субстрату - донору водорода. Основным отличием каталазной реакции от пероксидазной является то, что при разложении пероксида водорода каталазой H_2O_2 выступает одновременно и в качестве акцептора электронов (одна молекула, окислитель) и в качестве донора водорода и электронов (другая молекула, восстановитель), тогда как для осуществления реакции с участием пероксидазы необходим дополнительный источник водорода и электронов (в приведенном на схеме (7) примере - восстановленный глутатион).

Поскольку каталазная реакция имеет большое значение в поддержании жизнедеятельности всех аэробных организмов, включая человека, изучение катализирующего ее фермента представляет несомненный интерес для медицинской науки и практики.

В работах Goth показана важная роль определения активности каталазы при диагностике панкреатитов /3/ гемолитической болезни /4/, некоторых заболеваний печени /5/: приводятся данные об обнаруженной корреляции между уровнем фермента в сыворотке крови и остротой и стадией болезни. В работе /11/ получены данные, свидетельствующие о том, что определение активности сывороточной каталазы при диагностике болезни трансплантат-против-хозяина при пересадке аллогенного костного мозга характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью (100 % и 88 % соответственно); указывается также, что мониторинг уровня сывороточной каталазы

позволяет не только диагностировать уже имеющееся заболевание, но и предсказывать его дальнейшее развитие. Имеются сведения о большом значении исследования активности каталазы при сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях.

Структура. Локализация. Субстраты.

Каталаза (К. Ф. 1. 11. 1. 6) - один из наиболее распространенных в природе ферментов, присутствующий у всех аэробных организмов. На молекулярном уровне фермент представляет собой тетрамер из четырех идентичных субъединиц и имеет молекулярную массу 220-350 Кда. Каждый мономер содержит в качестве простетической группы (активный центр) молекулу гема. Кроме того, в структуре мономеров каталазы некоторых видов содержится по одной прочно связанной молекуле НАДФ, которая, вероятно, необходима для защиты фермента от окислительного действия пероксида водорода.

У человека активность каталазы неодинакова в различных тканях: наиболее высока она в печени, почках и крови, особенно в эритроцитах, ниже в эпителии и практически не обнаруживается в нервной ткани. На клеточном уровне каталаза локализована в пероксисомах митохондрий, за исключением эритроцитов, где она присутствует в цитозоле.

Доказано, что каталаза может проявлять как собственно каталазную активность - функция реализуется ферментом, находящимся исключительно в тетрамерной форме, так и пероксидазную - в этом случае активность могут проявлять мономеры димеры и тетрамеры /9/. При осуществлении пероксидазной реакции в качестве доноров водорода и электронов могут выступать метанол, этанол, муравьиная кислота, фенол и формальдегид /7/.

Таким образом, при изучении каталазы могут применяться различные субстраты в зависимости от типа катализируемой реакции.

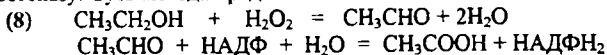
Методы исследования активности каталазы.

Методология определения активности ферментов заключается в наблюдении за убылью субстрата или за нарастанием содержания продукта в реакционной смеси с течением времени в ходе ферментативной реакции. В соответствии с этим принципом применяемые для определения активности каталазы методы можно разбить на две группы. Первая группа методов, использующая определение продуктов реакции подразделяется, в свою очередь, на 2 разные подгруппы - в зависимости от того, исследуется ли собственно каталазная, или пероксидазная активность каталазы.

Определение каталазной активности по наблюдению за нарастанием продуктов реакции реализовано в группе газометрических мето-

дов. основанных на измерении приращения давления в герметичном реакционном сосуде вследствие выделения молекулярного кислорода. В современных установках датчик давления соединен с компьютером, так что становится возможным изучать кинетику процесса.

Определение пероксидазной активности каталазы описано в работе /10/. В качестве субстрата авторы использовали этанол, а в качестве маркерного фермента применяли НАДФ-зависимую ацетальдегиддегидрогеназу. Суть метода представлена на схеме 8:



В этой работе приведены удовлетворительные аналитические характеристики предложенного метода; его важным преимуществом является и применение кинетического наблюдения за ходом реакции.

Второй, значительно более крупной группой по сравнению с первой, является группа методов, основанных на наблюдении за убылью субстрата. По применяемым методам детекции эти методы подразделяются на полярографические, титриметрические и фотометрические. В первых двух и части фотометрических методов определяется суммарная убыль пероксида водорода за все время инкубации. Это - так называемое "определение по конечной точке". По разнице между начальной и конечной концентрациями субстрата судят об активности фермента. В другой группе фотометрических методик реализовано прямое кинетическое наблюдение за ходом реакции.

Титриметрическое определение (в отечественной литературе метод Баха-Зубковой) основано на реакции окисления пероксида водорода перманганатом калия в кислой среде. Данный метод характеризуется не очень высокой надежностью получаемых результатов, и, по видимому, представляет исторический и, в определенной мере, учебный интерес.

Полярография, как метод определения активности каталазы дает относительно надежные результаты. При этом способе измеряется разница электродных потенциалов (в частности, на капельном ртутном электроде) по которой судят о концентрации H_2O_2 .

Фотометрические методы определения активности каталазы "по конечной точке" основаны на использовании комплексообразователей, специфически взаимодействующих с пероксидом водорода и дающих с ним окрашенные продукты. Из предложенных к настоящему времени методов этой группы наибольшее развитие получил метод с молибдатом аммония /1/. В работе /6/ детально изучены основные аналитические характеристики разработанного автором варианта данного подхода.

Совершенно иной подход к изучению активности каталазы реализован в кинетических фотометрических методах. В их основе лежит прямое наблюдение за изменением концентрации пероксида водорода по времени в ходе ферментативной реакции путем измерения поглощения H_2O_2 при 240 нм. В качестве примеров можно привести методы Bocsrs и Sizer, Aebi /2/, оптимизированный метод, описанный в работе /1/.

Стандартизация методов определения активности каталазы.

Несмотря на значительное разнообразие имеющихся методов определения каталазы, до сих пор ни один из них не внедрен в широкую практику лабораторий клинической биохимии. Основными причинами сложившегося положения являются отсутствие референтного метода и невозможность выполнения большинства предложенных методов на имеющемся в лабораториях стандартном оборудовании (включая автоанализаторы). Большое количество предложенных методов отражает не столько разнообразие имеющихся в распоряжении исследователей возможностей по конструированию новых аналитических систем (скорее, наоборот, в случае каталазы в сравнении с другими ферментами выбор крайне не велик), сколько отсутствие формализованного подхода к унификации и стандартизации условий определения. Главной проблемой при изучении активности каталазы является то, что каталаза, являясь одним из наиболее эффективных среди известных в настоящее время ферментов, ингибируется своим субстратом - пероксидом водорода при концентрациях значительно меньших величины константа Михаэлиса (K_m). Поэтому в аналитических системах по определению активности каталазы не удалось достичь применения такого избытка субстрата, при котором реакция протекает по кинетике нулевого порядка. Выполнение именно этого условия обеспечивает оптимальные аналитические характеристики анализа ферментативной активности. Вследствие этого каждая группа исследователей создавала свой подход к оптимизации методов, основываясь на отдельных особенностях каталазы при различных аналитических условиях.

В итоге сложилась ситуация, когда даже очень похожие методы дают во многом расходящиеся результаты. Так, в работе Goth /6/ приводятся данные о сравнении референсных значений активности сывороточной каталазы, полученных при применении метода, предложенного автором (50.5 ± 18.1 KU/L) и в работе Lemaireux (1.5 ± 0.6 KU/L /8/): указывается на значительное расхождение границ референсного интервала для этих методов, хотя значения, полученные для удельной эритроцитарной активности близки (1.75 ± 0.30 mg cat/ mg Hb и 2.30 ± 0.616 mg cat / mg Hb соответственно). Эта же работа является

одной из немногих, где делаются попытки выявления причин подобных расхождений, однако приведенные рассуждения носят во многом умозрительный и описательный характер.

Таким образом, становится очевидной необходимость выявления конкретных причин, приводящих к разбросу между результатами, полученными при использовании разных методов, обоснования объективности этих причин и разработки на этой основе формализованных подходов к реализации конкретных условий оптимизации методов. Отправной точкой здесь могут служить следующие соображения.

Ранее уже говорилось, что при разработке аналитических систем различные авторы вынуждены учитывать факт ингибирования каталазы пероксидом водорода при его концентрациях, значительно меньших величины K_m . Поэтому реакцию проводят по кинетике первого порядка в течение 2-5 минут при концентрации пероксида водорода 8-13 mM/L /2,11/. Следствием этого является плохая воспроизводимость методов определения активности каталазы. Так, даже наиболее надежные в аналитическом плане кинетические фотометрические методы дают средние коэффициенты вариации в 11.6% /10/, что практически сводит на нет преимущества кинетического подхода. Однако в работе Goth /6/ показано, что критическим фактором при ингибировании каталазы H_2O_2 является не столько концентрация этого субстрата, сколько длительность проведения реакции: в диапазоне концентраций пероксида водорода 45-65 mM/L в реакционной смеси автору удалось получить полунулевой порядок реакции при времени инкубации 1 минута (линейность 0-100 KU/L , коэффициент вариации < 5.8 %); более того, указывается, что при дальнейшем сокращении времени инкубации можно получить большую линейность при улучшении точности исследования.

Другим важным параметром оптимизации реакционной системы является отношение объемов реакционной смеси и пробы: при значительном снижении отношения общего объема к объему пробы может быть достигнуто значительное снижение вариации результатов без ухудшения других аналитических характеристик методов /6/.

Выбор вида буфера во многом определяет поведение конкретной аналитической системы - этот факт описан для большинства известных ферментов. Применяемый в настоящее время для исследования каталазы K-Na -фосфатный буфер (50 mM/L) удовлетворяет основным предъявляемым к нему требованиям: обеспечивает устойчивое поддержание оптимума pH (7.0) и ионной силы реакционной смеси, не связывает входящие в активный центр каталазы ионы Fe^{2+} , не проявляет тем самым склонности к ингибированию фермента, устойчив к окислительному действию H_2O_2 . Однако этот буфер может в принципе оказы-

вать интерферирующее влияние в колориметрических методах. поскольку обнаружено его взаимодействие с применяемым в колориметрических методах молибдатным хромогенным реактивом /6/.

Поскольку каталаза имеет низкий коэффициент температурной активации, температура инкубации не играет решающего значения при оптимизации условий определения активности фермента.

Другим важным фактором, препятствующим широкому применению каталазы в клинических условиях является невозможность выполнения большинства предложенных методов на стандартном оборудовании лабораторий клинической биохимии, а также значительная трудоемкость этих методов. Пожалуй, только методики, основанные на колориметрировании комплексов H_2O_2 и определение пероксидазной активности каталазы могут быть без больших трудностей налажены как в ручном, так и (последний метод) в автоматизированном вариантах. Попытки автоматизации молибдатного метода в нашей лаборатории показали, что по крайней мере на одном из самых гибких автоанализаторов "Cobas Mira" этот метод не может быть реализован, что связано, по всей вероятности, с жесткими объемно-концентрационными требованиями самого метода к компонентам реакционной смеси. При применении данной аналитической системы не удалось получить линейной калибровочной кривой. Однако имеется возможность применения других колориметрических подходов, например, использование в качестве детектора перекиси водорода метаванадата натрия. В нашей лаборатории уже получены некоторые результаты по этой методике - построены линейные калибровочные кривые для разных концентраций пероксида водорода и комплексообразователя, ведутся работы по подбору рабочих концентраций реагентов. Главная проблема этого метода - проведение комплексообразования в сильно кислых условиях. В целом, проблема автоматизации методов определения активности каталазы требует дальнейшей и всесторонней разработки.

В заключение хотелось бы отметить, что, несмотря на значительные аналитические трудности в изучении активности каталазы (отсутствие референтного метода, четких условий оптимизации и стандартизации определения, его автоматизации), которые обусловлены отчасти спецификой самого фермента и особенностями его взаимодействия с субстратом, отчасти спецификой субстрата и продуктов реакции (сложности в поиске подходящих маркерных реакций, позволяющих провести корректное наблюдение за ходом реакции), имеющиеся данные о функции фермента в организме и о его роли в развитии, оценке, мониторинговании и прогнозе различных заболеваний настоятельно требуют решения технических вопросов с целью внедрения

определения активности каталазы в широкую лабораторно-клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корольков М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лаб. Дело 1988, стр. 16-19.
2. Aebi H. Catalase in methods of enzymatic analysis. Ed. H.U. Bergmeyer 3rd ed., Weinheim : Verlag Chemie, 1983, pp. 273-286.
3. Goth L., Meszaros I., Nemeth H. Serum catalase activity in acute pancreatitis. Clin. Chem., 28 (1982), pp. 1999,2000.
4. Goth L., Nemeth H., Meszaros I. Serum catalase activity for detection of hemolytic diseases. Clin. Chem., 28 (1983), pp. 741,742.
5. Goth L., Meszaros I., Nemeth H. Serum catalase enzyme activity in liver diseases. Acta Biol Hung., 38 (1987), pp. 287-290.
6. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica chimica acta, 196 (1991), pp. 143-152.
7. Havir E.A., McHale N.A. Enhanced peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley and maize. Plant. Physiol., 91 (1989), pp. 812-815.
8. Lamaureux G., Bourdeau S., Dubosi G., Charbonneau R., Gagnon M., Grad B.R.A rapid method for determining catalase in human blood. Clin. Chim. Acta, 167 (1987), pp. 105-111.
9. Srivastava S.K., Ansari N.H. The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalatic mouse liver. Biochem. Biophys. Acta 633 (1980), pp. 317-322.
10. Yasmineh W.G., Chung M.-Y., and Caspers J.I. Determination of serum catalase activity on a centrifugal analyzer by an NADP/NADPH coupled enzyme system. Clin. Biochem., 25 (1992), pp. 21-27.
11. Yasmineh W. G., Kaur T. P., Blasar B. R. and Theologides A. Serum catalase as marker of graft-vs-host disease in allogenic bone marrow transplant recipients pilot study. Clin. Chem., 41 (1995), pp. 1574-1580.

**Ю.В.Первушин, Т.П. Бондарь, В.Н.Иванова,
В.С.Марочкин, А.Н.Обедин**

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНДОТОКСИКОЗА: КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД И КОМПЬЮТЕРНОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ

Ставропольская медицинская академия

Подавляющее большинство заболеваний и патологических состояний, независимо от природы этиологического фактора, протекает