

Сравнительный анализ активности Cu, Zn-супероксиддисмутазы цельной крови и ее компонентов

С. Б. Арбузова, О. О. Федотова, В. Д. Соловьева, А. В. Чугай

Межобластной медико-генетический центр Министерства здравоохранения Украины
Ул. Артема, 57, Донецк, 340000. Украина

Изучена активность Cu, Zn-СОД у доноров экстрахромосомы 21 и в контрольной группе женщин. Сравнительный анализ активности СОД цельной крови и ее компонентов выявил значимое снижение дисмутазной активности у доноров экстрахромосомы 21. Обнаружены различия вклада долевой активности фермента изученных компонентов в суммарный эффект активности СОД цельной крови.

Введение. В настоящее время не вызывает сомнений, что супероксиддисмутаза (СОД) является одним из наиболее важных регуляторов свободнорадикальных процессов клеточного метаболизма. Совместно с другими звеньями антиоксидантной системы СОД обеспечивает регуляцию свободнорадикального окисления.

Общим и уникальным для всех видов СОД является присутствие в активном центре металла и специфичность по отношению к O_2 , который подвергается дисмутации с высокой скоростью [1].

Из трех известных на сегодня изоформ СОД эукариот — двух внутриклеточных ферментов (цитозоля и митохондрий) и внеклеточного изоэнзима наибольшей активностью обладает внутриклеточная Cu, Zn-СОД. Эта изоформа локализована в основном в цитозоле, и в форменных элементах крови ее активность убывает в последовательности тромбоцит — эритроцит — гранулоцит — лимфоцит [2]. При этом дисмутаза выступает как ингибитор окислительных процессов и предотвращает лизис эритроцитов, участвуя в поддержании стабильности мембраны и формы эритроцита.

Наряду с цитозольным ферментом антиоксидантными свойствами обладает и внеклеточная СОД. Защитное действие плазматической СОД связывают с обезвреживанием не только O_2 , но и

ОН[•]. Так, при введении препаратов СОД с каталазой было показано, что внеклеточная СОД оказывала более выраженное действие в процессе снижения уровня активных форм кислорода, чем внутриклеточная (цит. по [3]).

Ранее нами выявлено снижение активности СОД у женщин — доноров экстрахромосомы 21, имеющих в анамнезе ребенка с синдромом Дауна [4]. Поскольку изменение активности фермента было выявлено в цельной крови, задача настоящего исследования состояла в изучении дисмутазной активности различных компонентов крови и определении их возможного вклада в суммарную активность СОД цельной крови обследованных женщин.

Материалы и методы. В работе использовали кровь 50 женщин — доноров экстрахромосомы 21 (доноры) в возрасте 20—40 лет. Контрольную группу составили условно здоровые женщины соответствующего возраста без отягощенного анамнеза. Кровь брали венепункцией натощак в одни и те же утренние часы.

Активность СОД измеряли в цельной крови и плазме по методике Nishikimi в модификации Чевари [5]. Учитывая тот факт, что гепарин может частично ингибировать действие плазматической СОД [3], определяли активность фермента также в сыворотке крови. Дисмутазную активность в отмытых эритроцитах и мембранах эритроцитов определяли по той же методике: с учетом величины

гематокрита и разведения при пересчете на эритропигментарную массу. Количественные параметры протекающей реакции (блокирование ферментом восстановления тетразолия нитросинего) рассчитывали по оптической плотности реакционной смеси и калибровочной кривой, выражающей зависимость расчетного процента торможения тетразолия нитросинего от активности СОД. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 при $\lambda = 540$ нм. Использовали реактивы фирмы «Sigma» (США).

Обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики с использованием пакета программы «STATGRAPHICS» версии 3.00.

Результаты и обсуждение. Показатели активности СОД цельной крови и ее компонентов в группах доноров и контроля приведены в табл. 1.

Уровень значимости результатов, указанный в таблице, позволил попарно сравнить каждое из приведенных значений. В группе доноров выявлено значимое снижение активности СОД цельной крови (Ц), эритроцитов (Э) и мембран эритроцитов (М) по сравнению с контролем. Как следует из табл. 1, дисмутазная активность в цельной крови доноров отличается от таковой во всех изученных компонентах, в то время как сравнение активности фермента в сыворотке (С), плазме (П), эритроцитах и мембранах эритроцитов не выявило отличий. В контроле обнаружены достоверные различия между величиной активности СОД цельной крови, сыворотки и плазмы; значимые отличия наблюдались и при сравнении активности эритроцитарной и мембранной СОД с показателями дисмутазной активности сыворотки и плазмы.

Отношение средних величин активности ферментов цельной крови к ее компонентам (Ц/П, ..., Ц/М) составило у доноров: для сыворотки — 1,6;

плазмы — 1,7; для эритроцитов — 1,3 и для мембран эритроцитов — 1,4; в контроле эти отношения были следующие: Ц/С, Ц/П — 1,9; Ц/Э — 1,1; Ц/М — 1,2.

Выявлены линейные корреляционные зависимости между активностью СОД (Ц) и активностью ферментов всех компонентов крови в группах доноров и контроля (табл. 2). Как видно, величины коэффициентов регрессии и корреляции для групп доноров и контроля существенно отличаются.

Для определения удельного веса величин дисмутазной активности компонентов крови в суммарном вкладе активности СОД цельной крови был применен метод математического моделирования на основе множественного регрессионного анализа. Конечная модель в случае доноров (1) и контроля (2) имела следующее выражение:

$$\text{акт. СОД(Ц)} = (1,58 \pm 0,08) \text{ СОД(С)} \quad (1)$$

$$R^2 = 0,976, p < 0,001;$$

$$\text{акт. СОД(Ц)} = (0,81 \pm 0,10) \text{ СОД(Э)} + \quad (2)$$

$$+ (0,33 \pm 0,11) \text{ СОД(М)}$$

$$R^2 = 0,999, p = 0.$$

Как следует из приведенной модели, у доноров основной вклад в суммарный эффект дисмутазной активности цельной крови вносит сывороточная СОД, в то время как в контроле, в основном, превалирует эритроцитарная СОД.

Учитывая, что СОД является ключевым звеном в защите клетки от свободнорадикального поражения, роль которого показана в патогенезе широкого спектра заболеваний [6], результаты сравнительного анализа активности СОД цельной крови и ее компонентов необходимо учитывать при оценке состояния антиоксидантной системы.

Таблица 1
Активность Си, Zn-СОД цельной крови и ее компонентов в группах «доноров» и контроля ($M \pm m$)

Объект исследования	Активность СОД, ед. акт.			
	Доноры, n = 50	p	Контроль, n = 50	p
Цельная кровь	22,6 ± 1,9*	—	29,3 ± 1,7	—
Сыворотка	13,9 ± 1,3	p ₁₋₂ < 0,001	15,2 ± 1,4	p ₁₋₂ < 0,001
Плазма	13,1 ± 1,2	p ₁₋₃ < 0,001	15,2 ± 1,2	p ₁₋₃ < 0,001
Эритроциты	18,1 ± 1,4*	p ₁₋₄ < 0,05	26,1 ± 1,6	p ₁₋₄ > 0,05
Мембраны эритроцитов	16,2 ± 1,2*	p ₁₋₅ < 0,01	24,5 ± 1,7	p ₁₋₅ > 0,05

*Достоверность различий между группами доноров и контроля, p < 0,05.

Таблица 2

Коэффициенты линейной регрессии и корреляции между активностью СОД цельной крови и ее компонентов

Объект исследования	Доноры, n = 50			Контроль, n = 50		
	$ax \pm S_a$	$b \pm S_b$	r_{xy}	$ax \pm S_a$	$b \pm S_b$	r_{xy}
Сыворотка	0,96±0,25	9,19±3,57	0,811	1,17±0,17	11,63±2,66	0,924
Плазма	0,93±0,25	10,43±3,47	0,792	1,29±0,19	9,64±3,04	0,920
Эритроциты	0,78±0,27	8,50±5,03	0,714	1,03±0,08	2,34±2,16	0,976
Мембраны эритроцитов	0,74±0,34	10,61±5,72	0,607	0,94±0,14	6,39±3,61	0,916

Примечание. a , b — коэффициенты уравнения линейной регрессии $y = ax \pm b$, где y — активность СОД цельной крови; a — активность СОД представленных в таблице компонентов крови доноров и контроля; S_a и S_b — стандартные ошибки соответствующих коэффициентов; n — величина выборки; r_{xy} — коэффициент корреляции.

По мнению Дубининой, в очаге генерации активных форм кислорода высокогликозилированную внеклеточную СОД можно рассматривать как своего рода продукт окислительной модификации цитозольного фермента [3]. Дальнейшие исследования СОД в компартментах крови позволят расширить представления о механизмах изменения активности фермента при различных патологических состояниях.

С. Б. Арбузова, О. О. Федотова, В. Д. Соловйова, О. В. Чугай

Порівняльний аналіз активності Cu, Zn-супероксиддисмутази нерозведеної крові та її компонентів

Резюме

У донорів екстрахромосоми 21 та в контрольній групі жінок визначено активність Cu, Zn-СОД. Порівняльний аналіз активності СОД виявив значне зниження дисмутазної активності у донорів екстрахромосоми 21. Знайдено відмінності у частковому вкладі активності ферментів визначених компонентів у сумарний ефект активності СОД нерозведеної крові.

S. B. Arbuzova, O. O. Fedotova, V. D. Solovyova, A. V. Chugay

The comparative analysis of Cu, Zn-superoxide dismutase activity of whole blood and its components

Summary

The activity of Cu, Zn-SOD was studied in donors of extra-chromosome 21 and in the control group. The comparative analysis revealed the significant decrease of SOD activity in whole blood and its components. The different impact of components' SOD activity on the total effect of whole blood enzyme activity was detected.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фридович И. Свободные радикалы в биологии / Пер. с англ.—М., 1979.—Т. 1.—318 с.
2. Гусев В. А., Панченко Л. Ф. Супероксидный радикал и супероксиддисмутаза в свободнорадикальной теории старения // Вопр. мед. химии.—1982.—28, № 4.—С. 8—25.
3. Дубинина Е. Е. Характеристика внеклеточной супероксиддисмутаза // Вопр. мед. химии.—1995.—41, № 6.—С. 8—12.
4. Арбузова С. Б. Клинико-патогенетическое обоснование возникновения и манифестации синдрома трисомии 21: Автореф. дис. ... докт. мед. наук.—К., 1996.—45 с.
5. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутаза в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело.—1985.—№ 11.—С. 678—681.
6. Harman D. Free radical theory of aging // Mutat. Res.—1992.—275.—P. 257—266.

УДК 612.015+612.014.24+615.38-07

Поступила в редакцию 09.02.99