

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.37-002:612.015

©Милякова, Шабанов

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ КИСЛОРОДА

М.Н. Милякова, В.В. Шабанов

Кафедра-клиника хирургии Самарского военно-медицинского института, 443099,
г.Самара, ул. Пионерская, 22; тел.: (8462) 39-92-71; факс: (8462) 37-11-22, 34-11-28;
эл. почта: vmedi@sama.ru

Рассматривается предполагаемый механизм регуляции активности супероксиддисмутаза свободными радикалами кислорода, заключающийся в увеличении диссоциации агрегированных форм фермента. Обсуждается возможная патофизиологическая значимость повышения удельной активности фермента при окислительном стрессе.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, свободные радикалы кислорода.

ВВЕДЕНИЕ. Супероксиддисмутаза (СОД) - фермент, присутствующий в клетках всех аэробных организмов и катализирующий реакцию восстановления супероксидного радикала до пероксида водорода и молекулярного кислорода. Cu, Zn-СОД представлена в тканях эукариот несколькими изоэнзимами, из которых наиболее распространенными являются цитозольный гомодимерный фермент (так называемая ВЕСОД) [1] и экстраклеточный гомотетрамерный фермент (ЭКСОД), обладающий высоким сродством к полисахаридам и, возможно, локализованный на наружной мембране клеток [2]. СОД, наряду с NO, является важнейшим регулятором локальных концентраций супероксида, а скорость дисмутации супероксида различными формами СОД весьма существенна для модуляции взаимодействия супероксида с важнейшими физиологическими сигнальными системами. Продукт реакции дисмутации - пероксид водорода - принимает участие в активации MAP-киназ, опосредует релаксацию сосудов, может дополнительно взаимодействовать с сигнальными системами через прямую реакцию с функциональными группами белков, такими как реактивные тиолы [3]. Кроме того, в ходе пероксидазной реакции, катализируемой СОД при избытке пероксида водорода, а также в ходе реакции Фентона, протекающей при участии двухвалентных ионов меди, высвобождаемых из поврежденных молекул фермента, генерируется высокоагрессивный гидроксильный радикал, являющийся также пусковым мессенджером синтеза цитокинов [4, 5].

Механизмы срочной физиологической регуляции активности Cu, Zn-СОД к настоящему времени мало изучены. Принято считать, что активной формой цитозольной Cu, Zn-СОД является димер, всегда проявляющий одинаковую активность, а скорость дисмутации супероксида определяется скоростью его генерации и (или) диффузии [6, 7]. Однако еще в 1974 году Fielden и Roberts

высказали предположение, что димер цитозольной Cu, Zn-СОД проявляет только половину расчетной активности, связывая это с попеременным участием мономеров в каталитическом цикле [8]. В 1994 году Inoue с соавторами показали, что в водных растворах цитозольная Cu, Zn-СОД существует в нескольких формах с различной степенью агрегированности (агрегаты, димеры, мономеры), а также проследили зависимость диссоциации фермента в растворах от его концентрации [9]. В этой же работе было высказано предположение, что функциональной единицей цитозольной СОД является мономер. Целью настоящего исследования было изучение механизмов срочной регуляции активности СОД.

МЕТОДИКА. В экспериментах в качестве тканевого источника СОД использована поджелудочная железа собак, а также печень интактных лабораторных белых крыс. Окислительный стресс *in vivo* создавали путём моделирования острого панкреатита (ОП) у 16-ти собак массой 6–30 кг как описано ранее [10]. В качестве контроля использовали образцы ткани поджелудочной железы, взятые до моделирования ОП. Ткани гомогенизировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,4 и проводили препаративное выделение СОД [1]. Экстраклеточную и цитозольную изоформы фермента разделяли по Marklund на DEAE-сервацель фирмы “Reanal” (Венгрия) [2]. Для определения активности СОД применяли метод, основанный на торможении аутоокисления адреналина, активность СОД выражали в относительных единицах (о.е.) в расчете на 1 мг белка [11]. Аллопуринол в конечной концентрации 1,225 мМ вносили в инкубационную среду перед добавлением СОД. Концентрацию белка определяли биуретовым методом, содержание олигопептидов в пробах, после осаждения белка ТХУ, по методу Лоури. Электрофорез очищенной СОД проводили по методу [12], гели окрашивали Кумасси G-250 бриллиантовым голубым и денситометрировали, содержание отдельных фракций определяли методом взвешивания пиков. Специфическую активность отдельных фракций в геле выявляли методом негативного окрашивания с НСТ [13].

В эксперименте по активации СОД свободными радикалами *in vitro* использовали 6 образцов очищенной СОД из ткани поджелудочной железы интактных собак, а также ксантиноксидазу (КСО) и ксантин фирмы “ICN” (США). Препараты СОД, содержащие от 0,9 до 3,0 мг белка СОД, инкубировали с 19 мЕ КСО и 0,4 мМ ксантином в 0,1 М трис-НСl буфере, pH 8,4 (конечный объем 3 мл). Контрольные пробы не содержали КСО. Повторное выделение фермента из инкубационной среды осуществляли немедленно после внесения ксантина и через 30 минут инкубации.

Для кинетического исследования изменений удельной активности СОД, при инкубации в низкой концентрации (2,6 мкг в пробе) в условиях фотохимической генерации супероксида, препараты СОД с концентрацией 1,5–3,0 мг/мл, полученные из печени интактных крыс, предварительно инкубировали с 10 мЕ КСО и 0,4 мМ NADH в 0,1 М трис-НСl буфере, pH 7,4 (конечный объем 2 мл). Повторное выделение фермента из инкубационной среды осуществляли немедленно после внесения NADH и через 30 минут инкубации. Удельную активность СОД определяли через 8, 16, 24 и 32 минуты инкубации, содержание белка СОД в кювете составляло 2,6 мкг.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартных программ приложения Excel, используя непараметрические критерии (парный критерий Вилкоксона, критерий знаков и U-критерий) и критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Препараты очищенной Cu, Zn-СОД из печени крысы и поджелудочной железы собаки содержат 8–9 фракций, все фракции обладают специфической активностью. Верхние 4 фракции с наименьшей электрофоретической подвижностью связываются с DEAE-сервацелом, что позволяет идентифицировать их как фракции экстраклеточной СОД; нижние фракции не связываются с DEAE-сервацелом, и по этому признаку, а также по электрофоретической подвижности, очевидно, представляют собой цитозольную

СОД (рис. 1). Соотношение экстраклеточной и цитозольной СОД в препаратах поджелудочной железы собак приблизительно 1:1, в ткани печени крысы цитозольная изоформа составляет около 60%.

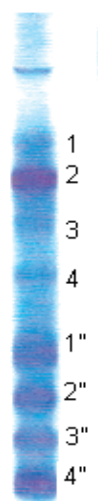


Рисунок 1.

Электрофореграмма СОД из поджелудочной железы собаки.

1, 2, 3, 4 – фракции экстраклеточной СОД.

1'', 2'', 3'', 4'' – фракции цитозольной СОД.

При определении активности СОД из интактных образцов поджелудочной железы собаки было обнаружено, что удельная активность фермента возрастает с уменьшением содержания белка в пробе (рис. 2). Иначе с соавторами показали, что в растворах цитозольной СОД соотношение агрегат-димер-мономер зависят от концентрации СОД [9]. Чем ниже концентрация СОД, тем большая часть фермента диссоциирована, при этом мономеры сохраняют специфическую активность. Авторы предполагают, что именно мономер является функциональной единицей фермента. В таком случае, при концентрациях белка выше 0,1 мкг/мл, при которых весь фермент представлен исключительно мономерами [9], активность, возможно, определяется концентрацией мономера, то есть уровнем диссоциации фермента. При концентрациях фермента от 18 до 0,19 мкг в пробе, использованных в нашем эксперименте, определенная часть фермента находится в недиссоциированной форме. С уменьшением концентрации белка СОД степень диссоциации фермента увеличивается, что сопровождается ростом его удельной активности.

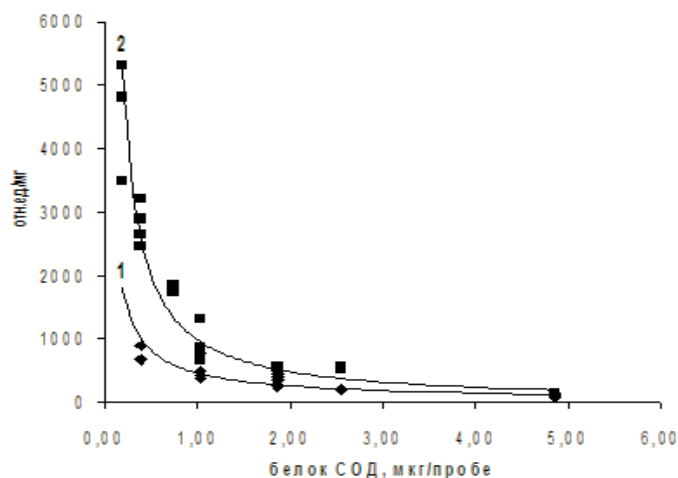


Рисунок 2.

Изменение удельной активности СОД в зависимости от содержания белка СОД в пробе.

1 - СОД из интактной поджелудочной железы собак.

2 - СОД из поджелудочной железы собак через 15 минут после инициации острого панкреатита.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СОД

Однако при одинаковых концентрациях белка СОД в пробе удельная активность СОД из интактной поджелудочной железы достоверно ниже, чем в препаратах из железы животных с ОП (рис. 2). Ранее мы предположили, что величина удельной активности СОД регулируется уровнем генерации супероксидного радикала в ткани [10]. Механизм регуляции удельной активности СОД, скорее всего, связан с повышением диссоциируемости высокомолекулярных форм фермента до функциональных единиц. При электрофорезе препаратов СОД выявлено достоверное снижение процентного содержания высокомолекулярных фракций обеих изоформ СОД (экстраклеточной и цитозольной) и повышение содержания диссоциированных форм в препаратах СОД из поджелудочной железы собак с ОП, по сравнению с препаратами из контрольных образцов тканей (табл. 1).

Таблица 1. Изменение фракционного состава экстраклеточной и цитозольной изоформ СОД поджелудочной железы собак через 15 минут после моделирования острого панкреатита (%).

Экстраклеточный СОД	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Контроль (n=11)	18,0±2,0	48,0±5,6	19,0±1,8	15,0±2,1
Опыт (n=9)	8,4±1,8*	37,2±3,3	30,0±3,4*	24,0±1,3*
Цитозольный СОД	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Контроль (n=11)	21,7±1,7	24,8±3,6	22,6±1,6	30,9±2,7
Опыт (n=9)	6,4±0,7*	14,0±0,8*	22,5±2,6	57,1±3,3*

Примечание: * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Следует, однако, отметить, что при гомогенизации тканей неизбежно происходит разведение тканевого фермента, который затем концентрируется вновь на заключительном этапе препаративного выделения СОД. Различная степень разведения фермента в процессе его препаративного выделения, которую не всегда возможно точно оценить, может быть дополнительным фактором, влияющим на полученные результаты. Поэтому был проведен эксперимент, в котором 6 образцов СОД из интактной поджелудочной железы собак с точно известной и одинаковой для контрольных и опытных проб концентрацией, инкубировали в супероксид-генерирующей системе, состоящей из КСО и ксантина. Инкубация высоких концентраций (450-1500 мкг/мл) СОД в супероксид-генерирующей системе в течение 30 минут приводила к статистически достоверному увеличению удельной активности фермента по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2. Изменение удельной активности СОД, снижение содержания белка СОД и прирост олигопептидов в среде при 30-минутной инкубации в супероксид-генерирующей системе (ксантин + КСО).

Показатели	Контроль (инкубация без КСО)	Опыт (инкубация с КСО)
Прирост активности СОД, о.е./мг белка	-33±14	212±62**
Прирост активности СОД, %	-8,5±3,6	92,8±26,5**
Снижение содержания белка СОД, мг/мл	0,290±0,089	0,807±0,159*
Снижение содержания белка СОД, %	16,340±2,890	45,34±7,18*
Прирост содержания олигопептидов, мг/мл	0,016±0,004	0,136±0,030*

Примечание: * $p < 0,01$ ($n=7$). Содержание белка СОД в кювете спектрофотометра при определении активности - 1,3 мкг.

При этом наблюдалась достоверная сильная отрицательная корреляция между начальной удельной активностью СОД и абсолютным ее приростом, а также процентом активации в супероксид-генерирующей системе ($r = -0,88$ и $-0,90$ $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, в использованном нами диапазоне концентраций фермента, при фиксированном уровне генерации супероксида, уровень активации не зависит от разведения, а определяется только исходной удельной активностью.

Электрофоретическое фракционирование фермента до и после 30-минутной инкубации в супероксид-генерирующей системе выявляет изменения фракционного состава цитозольной СОД в контрольных образцах в сторону увеличения более агрегированных фракций. В образцах, подвергавшихся воздействию супероксида, происходит сдвиг в сторону диссоциации высокомолекулярных форм (агрегатов и димеров) до более низкомолекулярных (димеров и мономеров). Что же касается экстраклеточной СОД, то в данном случае и в экспериментальной, и в контрольной группе происходит уменьшение процентного содержания основной 2 фракции с наименьшей удельной активностью и увеличение 1 фракции, однако эти изменения достоверно выше в экспериментальной группе (табл. 3).

Таблица 3. Изменения фракционного состава цитозольной и экстраклеточной СОД при инкубации в супероксид-генерирующей системе (КСО + ксантин).

Цитозольная СОД (n=15)	агрегаты	димеры	момеры	дериваты
Допыта	$-2,8 \pm 0,9^* **$	$-12,4 \pm 2,9^* **$	$15,2 \pm 2,4^* **$	0
Дконтроля	$2,9 \pm 0,5^*$	$-2,7 \pm 1,2^*$	$0,3 \pm 1,0^*$	$-3,6 \pm 1,3$
Экстраклеточная СОД (n=15)	1 фракция	2 фракция	3 фракция	4 фракция
Допыта	$14,8 \pm 2,7^* **$	$-18,4 \pm 2,9^* **$	$3,3 \pm 1,4$	$0,3 \pm 0,4$
Дконтроля	$5,3 \pm 2,0^*$	$-9,8 \pm 2,1^*$	$4,6 \pm 0,7$	$-0,2 \pm 0,6$

Примечание: * $p < 0,01$ между точками 0 и 30 минут внутри группы, ** - $p < 0,01$ между контролем и опытом.

Полученные данные, на наш взгляд, подтверждают предположение Inoue с соавторами [9] о том, что функциональной единицей цитозольной СОД является мономер (для экстраклеточной СОД, возможно, гомотетрамер, в то время как основное количество тканевого фермента представляет собой агрегаты этой функциональной единицы). В интактной ткани при невысоком уровне генерации супероксида фермент находится в агрегированной форме и обладает низкой удельной активностью. При увеличении субстратного обеспечения (генерации супероксида в ткани) удельная активность фермента растет за счет увеличения диссоциации его агрегированных форм до функциональных активных мономеров.

Однако, диссоциация субъединиц и увеличение удельной активности СОД в супероксид-генерирующей системе сопровождается снижением содержания активного фермента и увеличением процентного содержания олигопептидов в среде инкубации (табл. 3). Фрагментация и инактивация Cu, Zn - СОД пероксидом водорода, а также другими радикалами *in vitro* показана в ряде работ [14-16]. При инкубации цитозольной СОД как с пероксидом водорода, так и в супероксид-генерирующей системе, состоящей из КСО и гипоксантина, в ходе пероксидазной реакции генерируется гидроксильный радикал, приводящий к фрагментации фермента [4]. Наши данные согласуются с результатами этих авторов, поскольку снижение содержания активного фермента после инкубации в супероксид-генерирующей системе, а также рост числа олигопептидов в среде инкубации свидетельствуют о частичной деструкции СОД, сопровождающей рост удельной активности.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СОД

Кинетическое исследование изменения удельной активности СОД при инкубации в низкой концентрации (2,6 мкг в пробе) в условиях фотохимической генерации супероксида (при условиях определения ее активности адреналиновым методом) показывает, что увеличение удельной активности фермента в первые минуты инкубации, вследствие его диссоциации, сменяется ее снижением. Это, очевидно, происходит вследствие накопления в пробе пероксида водорода и последующей инактивации фермента гидроксильным радикалом, генерирующимся при разложении H_2O_2 . Добавление в пробу ингибитора КСО аллопуринола в концентрации 1,225 мМ, достоверно снижает расчетное значение начальной удельной активности фермента более чем в 2 раза (с $386,2 \pm 32,1$ до $174,8 \pm 40,4$ о.е./мг белка соответственно, $p < 0,05$). Данное обстоятельство может свидетельствовать о стимуляции гидроксильным радикалом, генерируемым в ходе разложения H_2O_2 , диссоциации агрегированных форм фермента (рис. 3). При этом аллопуринол достоверно увеличивает ежеминутный прирост активности на восходящем участке кривой и максимальное значение активности в точке перегиба (с $501,8 \pm 12,1$ до $568,3 \pm 11,9$ о.е./мг белка соответственно, $p < 0,05$), что может свидетельствовать в пользу участия гидроксильного радикала в инактивации фермента. 30-минутная инкубация образцов фермента, выделенного из печени крыс, в супероксид-генерирующей системе, состоящей из КСО и NADH (в данном случае супероксид генерируется на флавиновом сайте КСО), напротив, достоверно увеличивала исходную удельную активность (с $289,7 \pm 52,5$ до $396,9 \pm 26,7$ о.е./мг белка соответственно, $p < 0,05$) и приводила к достоверному снижению скорости активации фермента на восходящей части кривой по сравнению с контрольным образцом. Увеличение начальной удельной активности фермента после инкубации в супероксид-генерирующей системе свидетельствует о большом количестве уже диссоциированных функциональных единиц в данном образце фермента, а снижение скорости активации – о том, что прирост удельной активности является результатом двух одновременно протекающих процессов: активации и инактивации фермента гидроксильным радикалом, образующимся в ходе пероксидазной реакции (рис. 4).

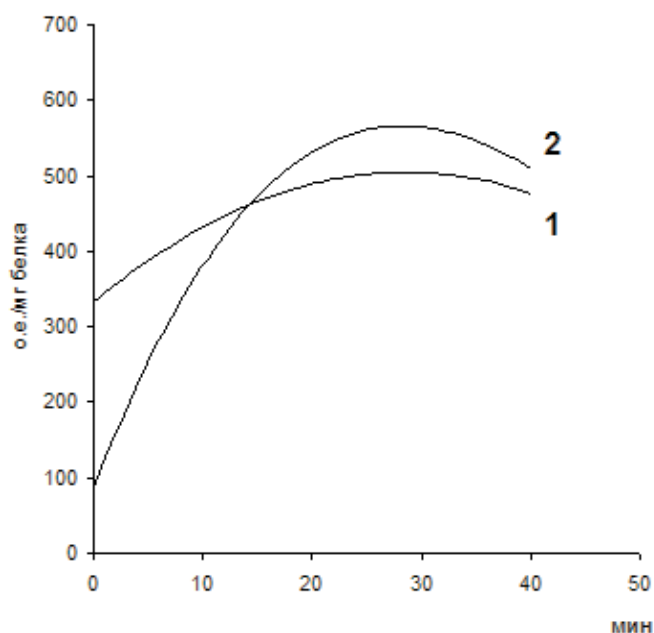


Рисунок 3.

Зависимость удельной активности СОД от времени инкубации в условиях фотохимической генерации супероксида (2,6 мкг белка СОД в пробе): 1- без аллопуринола, 2 – 500 мкг аллопуринола в пробе.

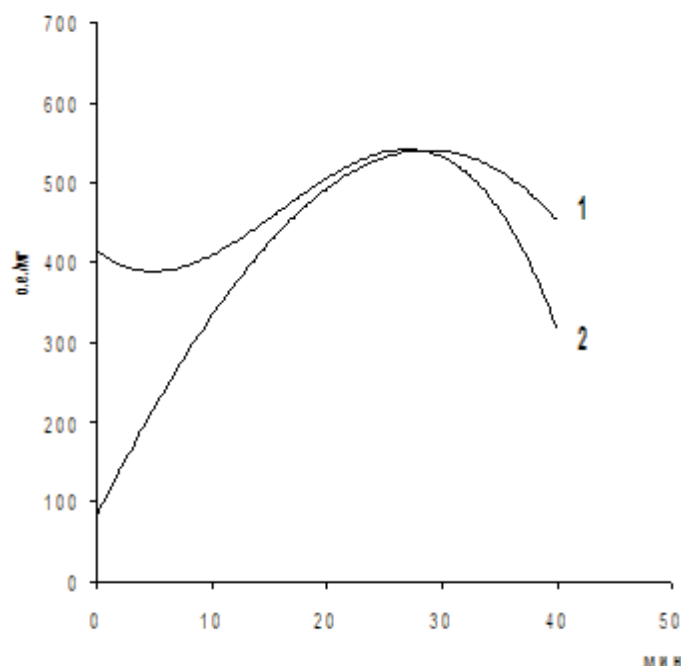


Рисунок 4.

Зависимость удельной активности СОД от времени инкубации в условиях фотохимической генерации супероксида до и после инкубации фермента в супероксид-генерирующей системе (КСО+NADH) (2,6 мкг белка СОД в пробе): 1 – до инкубации, 2 – после инкубации.

Приведенные результаты позволяют предположить, что активность Cu, Zn-СОД может регулироваться уровнем супероксида в тканях. Чем меньше исходная удельная активность фермента, тем выше уровень активации. Реальная тканевая активность СОД *in vivo*, скорее всего, намного ниже, чем можно предположить, исходя из определения активности этого фермента общепринятым методом [17]. При этом повышение удельной активности СОД, в случае недостаточной активности пероксидаз, инактивирующих пероксид водорода, может сопровождаться усилением генерации гидроксильного радикала в ходе металл-зависимого разложения H_2O_2 , и, как следствие – деструкцией каталитически активных молекул фермента. В определенных условиях, при резком повышении уровня генерации супероксидного радикала в тканях (например, при ишемии – реперфузии), СОД в ходе субстратной активации может становиться весьма значимым источником высокоагрессивного вторичного гидроксильного радикала. Процессы активации и последующей инактивации (деструкции) СОД могут являться регуляторными механизмами, определяющими текущую концентрацию не только супероксида, но и вторичных радикалов (пероксида и гидроксила), а, следовательно, и уровень их взаимодействия с последующими сигнальными системами.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCord J.M., Fridovich I. (1969) J.Biol. Chem, **244**, 6049-6055.
2. Marklund S.L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 7634-7638.
3. Wolin M., Gupte S., Oeckler R.A. (2002) J. Vasc. Res., **39**, 191-207.
4. Kang J.H., Kim S.M. (1997) Mol. Cells, **7**, 553-558.
5. Ookawara T., Kawamura N., Kitagawa Y., Taniguchi N. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 18505-18510.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СОД

6. *Malinowski D.B., Fridovich I.* (1979) *Biochemistry*, **18**, 5055–5059.
7. *Malinowski D.B., Fridovich I.* (1979) *Biochemistry*, **18**, 237-244.
8. *Fielden E.M., Roberts P.B.* (1974) *J. Biochem.*, **139**, 49-60.
9. *Inouye K., Osaki A., Tomotura B.* (1994) *J. Biochem.*, **115**, 507-517.
10. *Шабанов В.В., Сарбаева Н.Н., Милякова М.Н.* (2002) *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **134**, 33-35.
11. *Misra H.P., Fridovich I.* (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170-3175.
12. *Ornstein L., Davis B.J.* (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-403.
13. *Beauchamp C., Fridovich I.* (1971) *Ann. Biochem.*, **44**, 276-287.
14. *Kwon O.J., Lee S.M., Floyd R.A., Park J.W.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1387**, 249-256.
15. *Choi S.Y., Kwon H.Y., Kwon O.B., Kang J.H.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 651-657.
16. *Kwon H.Y., Choi S.Y., Won M.H. et al.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 69-76.
17. *Crapo J.D., McCord J.M., Fridovich I.* (1978) *Methods Enzymol.*, **53**, 382-393.

Поступила: 20. 06. 2005

POSSIBLE MECHANISM OF SUPEROXIDE DISMUTASE REGULATION BY OXYGEN FREE RADICALS

M.N. Miljakova, V.V. Shabanov

Samara Military Medical Institute, Pionerskaja ul., 22, Samara, 443099 Russia;
fax: (8462) 37-11-22, 34-11-28; E-mail: vmedi@sama.ru

Possible mechanism of regulation of Cu,Zn-superoxide dismutase activity by oxygen free radicals is considered. It consists in the increase of dissociation of aggregated forms of this enzyme. The increase of specific activity may have pathophysiological importance under conditions of oxidative stress.

Key words: superoxide dismutase, oxygen free radicals.