

УДК 577.151.63:546.56

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ И АКТИВНОСТИ МЕДЬ-ЗАВИСИМОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Карнаухова И.В., Ширяева О.Ю.

*ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный педагогический университет», Оренбург,
e-mail: karnauhova-irina@mail.ru, schirjaewa@yandex.ru*

Медь в живом организме входит в состав медь-зависимых ферментов, выполняющих различные функции. Она необходима в процессе образования гемоглобина и созревания эритроцитов, в синтезе коллагена. В работе представлены результаты исследования содержания меди и активности медь-зависимого фермента в организме человека. В экспериментальной части исследования проведен анализ присутствия меди в микроэлементном портрете жителей Оренбургской области. Содержание меди в волосах определяли на атомно-абсорбционном спектрометре. Согласно полученным данным, у испытуемых не выявлен гипокупреоз или гиперкупреоз. Активность супероксиддисмутазы определяли в смешанной слюне спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента тормозить реакцию аутоокисления адреналина в щелочной среде. Для этого были подобраны оптимальные условия для исследования активности супероксиддисмутазы слюны и адаптирована методика определения активности данного фермента. Затем определен уровень активности супероксиддисмутазы слюны у представителей обследуемой группы как показателя антиоксидантного статуса и обеспеченности медью. Полученные данные свидетельствуют о нормальной обеспеченности медью организма представителей обследуемой группы людей разного возраста (21–71 года), длительно проживающих на территории Оренбургской области, и достаточной активности медь-зависимой супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: медь, супероксиддисмутазы, медь-зависимые ферменты

A STUDY OF THE COPPER CONTENT AND THE ACTIVITY OF THE COPPER DEPENDENT SUPEROXIDE DISMUTASE IN THE HUMAN BODY

Karnauhova I.V., Shiryaeva O.Yu.

*Orenburg State Pedagogical University, Orenburg, e-mail: karnauhova-irina@mail.ru,
schirjaewa@yandex.ru*

Copper in the living organism is part of copper-dependent enzymes that perform various functions. It is necessary in the process of hemoglobin formation and maturation of red blood cells, in the synthesis of collagen. The paper presents the results of the study of copper content and activity of copper-dependent enzyme in the human body. The experimental part of the study analyzes the presence of copper in the microelement portrait of the Orenburg region residents. The copper content in the hair was determined by an atomic absorption spectrometer. According to the data obtained from subjects not identified gipoteroz or hypercubes. The activity of superoxide dismutase was determined in mixed saliva by a spectrophotometric method based on the enzyme's ability to inhibit the reaction of adrenaline autooxidation in the alkaline environment. For this purpose, the optimal conditions for the study of saliva superoxide dismutase activity were selected and the method for determining the activity of this enzyme was adapted. Then the activity level of superoxide dismutase saliva was determined in the representatives of the examined group as an indicator of antioxidant status and copper supply. The obtained data indicate the normal provision of the body with copper representatives of the surveyed group of people of different ages (21-71 years), long-term residents in the Orenburg region, and sufficient activity of copper-dependent superoxide dismutase.

Keywords: copper, superoxide dismutase, copper-dependent enzymes

Медь является одним из важнейших эссенциальных микроэлементов. В организме взрослого человека содержание меди составляет примерно 100–200 мг, при этом около 50% всей меди находится в мышцах, а 10% в печени. Она служит компонентом ферментов, обладающих окислительно-восстановительной активностью, и участвует во многих окислительно-восстановительных процессах; играет важную роль в метаболизме железа (в образовании гемоглобина и созревании эритроцитов); повышает усвоение белков и углеводов; участвует в синтезе коллагена и обеспечивает формирование соединительной ткани и поддержание ее структуры, росте костей; поддерживает эластичность стенок кровеносных сосу-

дов, альвеол, кожи; обладает выраженным противовоспалительным свойством, в том числе при аутоиммунных заболеваниях [1]. Медь участвует в биохимических процессах как составная часть электронпереносящих белков, осуществляющих реакции окисления органических субстратов молекулярным кислородом (табл. 1).

Этой ролью она обязана особым свойствам как переходного металла. Имея два обычных валентных состояния, она, в зависимости от природы и расположения лигандов, позволяет медьсодержащим белкам охватывать широкий интервал окислительно-восстановительных потенциалов, а также обратимо связывать кислород и окись углерода. Ряд белков содержит четыре и бо-

лее ионов меди, входящих в состав центров обоих типов, их характеризует необычно интенсивная голубая окраска, благодаря которой они получили название голубых или мультимидных оксидаз.

Важную физиологическую функцию выполняет фермент *супероксиддисмутаза* – СОД (КФ 1.15.1.1), ускоряя реакцию разложения супероксид-иона, возникающего при свободнорадикальном окислении веществ в клетке. Этот радикал очень активно взаимодействует с разными компонентами клетки, разрушая их. Супероксиддисмутаза превращает анион-радикал в молекулярный кислород и в пероксид водорода, при этом атом меди фермента выступает и окислителем, и восстановителем.

Важную роль медь играет в процессе созревания коллагена на этапе формирования поперечных сшивок между молекулами тропоколлагена [1, 2].

Дефицит меди приводит к недостаточности медь-зависимых ферментов и проявляется в нарушениях деятельности нервной системы, депигментации кожи и гипоплазии соединительной ткани.

Средний пищевой рацион человека должен содержать 5–7 мг/сут меди. Дефицит меди в первую очередь сказывается на активности медь-зависимых ферментов, при этом наблюдаются специфические нарушения в обмене веществ, затрагивающие в том числе антиоксидантный статус. Для купирования дефицита меди можно использовать продукты богатые медью, особенно шоколад, какао, авокадо, морепродукты, печень, а также медьсодержащие препараты

и биологически активные добавки к пище. В рационе каждого человека ежедневно присутствуют хлебобулочные изделия, содержащие медь [3].

Целью настоящего исследования было проведение оценки обеспеченности медью организма оренбуржцев на основании содержания данного микроэлемента в волосах и активности медь-зависимой супероксиддисмутазы слюны.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы проводилась на базе биохимической лаборатории ФГБОУ ВО ОГПУ и межкафедральной комплексной аналитической лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский ГАУ».

Исследование проводили в группе взрослых людей разного возраста (21–71), длительно проживающих на территории Оренбургской области и включавшей девять человек. В качестве объектов исследования использовали образцы волос и смешанную слюну, взятую натощак.

Содержание меди в волосах определяли на атомно-абсорбционном спектрометре «МГА-915». Метод измерения основан на резонансном поглощении света свободными атомами металлов, возникающем при пропускании света через слой атомного пара в графитовой печи атомно-абсорбционного спектрометра «МГА-915». Содержание металлов определяется величиной интегрального аналитического сигнала и рассчитывается по предварительно установленной градуировочной зависимости.

Таблица 1

Медьсодержащие ферменты человека и животных

Ферменты	Мг	Функция	Источник
Церулоплазмин (КФ 1.16.3.1.)	132 000	Окисление железа, биогенных аминов, транспорт меди	Плазма крови животных и человека
Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1.)	32 000	Дисмутация супероксида	Эритроциты ткани животных
Тирозиназа (КФ 1.14.18.1)	46 000	Гидроксилирование тирозина, синтез меланина	Кожа, меланома, ткани животных
Аминоксидаза, гистаминаза (КФ 1.4.3.6)	180 000–195 000	Окисление первичных аминов	Плазма крови, почки
Аминооксидаза (Лизилоксидаза) (КФ 1.16.3.1)	30 000–60 000	Окисление γ -аминогруппы лизина	Плацента человека, аорта, хрящ человека
Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1)	140 000	Терминальное окисление	Митохондрии животных и человека
Дофамин- β -гидроксилаза (КФ 4.1.1.28)	290 000	Гидроксилирование дофамина, синтез адреналина	Плазма крови человека

Таблица 2

Содержание меди в волосах обследуемой группы оренбуржцев

№	Возраст	Пол	Содержание меди, мкг/г
1	46	Ж	20,11
2	25	Ж	12,24
3	22	Ж	18,05
4	25	М	16,17
5	50	Ж	18,41
6	71	Ж	14,52
7	21	Ж	18,32
8	21	Ж	17,07
9	21	Ж	19,37
Референтные значения, мкг/г			10,0–30,0

Активность супероксиддисмутазы определяли в смешанной слюне спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента тормозить реакцию аутоокисления адреналина в щелочной среде. Скорость реакции оценивают спектрофотометрически по величине оптической плотности накапливающегося продукта аутоокисления адреналина, имеющего максимум поглощения при длине волны 347 нм, образующегося в отсутствие и присутствии исследуемых препаратов, и проводят расчёт активности в процентах ингибирования [4]. Расчет активности фермента проводили по формуле

$$\left(1 - \frac{\Delta E \text{ опыта}}{\Delta E \text{ контроля}}\right) * 100\%,$$

где ΔE опыта – экстинкция в опыте, ΔE контроля – экстинкция в контроле.

Результаты исследования и их обсуждение

В волосах происходит концентрирование микроэлементов, в отличие от крови, которая в основном выполняет в организме транспортную функцию. Волосы наиболее полно отражают уровень содержания как токсичных (свинец, кадмий, мышьяк и т.д.), так и жизненно необходимых элементов (цинк, селен, железо и т.д.). Исследование микроэлементов в волосах дает возможность выявить наличие патологических процессов на предклинической стадии, что позволяет внести соответствующую корректировку в профилактику заболевания. Содержание меди в волосах населения Оренбургской области колеблется в пределах 11,08–55,54 мкг/г в зависимости от района проживания [5, 6].

Референтные значения данного показателя у взрослых здоровых людей по современным данным колеблются от 9–10 до 40–50 мкг/г. Как видно из табл. 2, со-

держание меди в волосах представителей обследуемой группы колеблется от 12 до 20 мкг/г, что согласуется с референтными значениями [7].

Таким образом, результаты атомно-абсорбционной фотометрии образцов волос не обнаружили у испытуемых отклонений в содержании меди в организме – гипо- или гиперкупреоза.

На следующем этапе работы представлялось актуальным проанализировать взаимосвязь между содержанием меди в элементном портрете и активностью медь-зависимой супероксиддисмутазы слюны представителей обследуемой группы.

Супероксиддисмутаза – широко распространенный в природе антиоксидантный фермент, проявляющий активность в диапазоне рН от 7,6 до 10,5 с оптимумом рН = 7,8.

В стандартной методике измерение активности СОД по реакции торможения аутоокисления адреналина проводится при рН 10–10,6 [4]. Этот метод используется для определения СОД эритроцитов. В слюне содержится внеклеточная форма СОД, отличающаяся от СОД эритроцитов. Применение этой стандартной методики в нашем эксперименте выявило ряд проблем: неразбавленная слюна полностью ингибировала аутоокисление адреналина, при разбавлении слюны аутоокисление протекало, но активность фермента была очень низкой. Мы предположили, что такая низкая активность фермента при данном значении рН среды (10,6) связана с тем, что это крайняя верхняя граница диапазона рН действия супероксиддисмутазы. В связи с этим представлялось актуальным исследовать оптимальные условия для определения активности СОД слюны.

Целью первого этапа исследования являлся подбор оптимальных условий для определения активности супероксиддисмутазы слюны как показателя антиоксидантно-

го статуса организма. В качестве объекта исследования была отобрана смешанная слюна практически здоровых людей, взятая натощак. Слюну разводили в четыре раза и фильтровали через обеззоленный фильтр. В дальнейшие эксперименты брали фильтрат.

В кварцевую кювету (объем 4 мл, длина оптического пути 10 мм) помещали 3 мл буферного раствора с заданным значением pH (7,9; 8,5; 9,9), вносили 150 мкл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида, аликвоту (10, 20, 30, 40, 45, 50 мкл) фильтрата слюны. Измерения проводили при длине волны 347 нм (спектрофотометр Apel (Япония), регистрировали показания прибора через 30, 60, 90, 120, 150, 180 секунд инкубирования. Контролем служила проба с раствором адреналина без слюны.

Для создания pH готовили 0,1 М буферные растворы: pH = 9,9 – фосфатно-аммонийный буфер, 8,5 – карбонатный буфер, 7,9 – фосфатно-аммонийный буфер. При всех используемых значениях pH было отмечено выраженное торможение аутоокисления адреналина под действием СОД, причем тормозящее действие фермента наиболее сильно сказывалось в первые 30 секунд инкубирования. На рисунке приведена типичная кинетика изменения оптической плотности исследуемых проб при pH = 7,9. В контрольных опытах (без слюны) отмечалось плавное возрастание оптической плот-

ности вследствие образования адренохрома в процессе аутоокисления адреналина. В то же время в опытах с добавлением проб слюны рост оптической плотности замедлялся вследствие торможения аутоокисления адреналина под действием супероксиддисмутазы. Особенно ярко это проявлялось в течение первой минуты инкубирования.

В табл. 3 отражены результаты определения активности СОД в различных средах, отличающихся значением pH по ингибированию аутоокисления адреналина в адренохром. Результаты выражены в процентах ингибирования аутоокисления по отношению к контрольным пробам, о котором судили по степени возрастания оптической плотности исследуемых растворов при 347 нм (ультрафиолетовая лампа СФ).

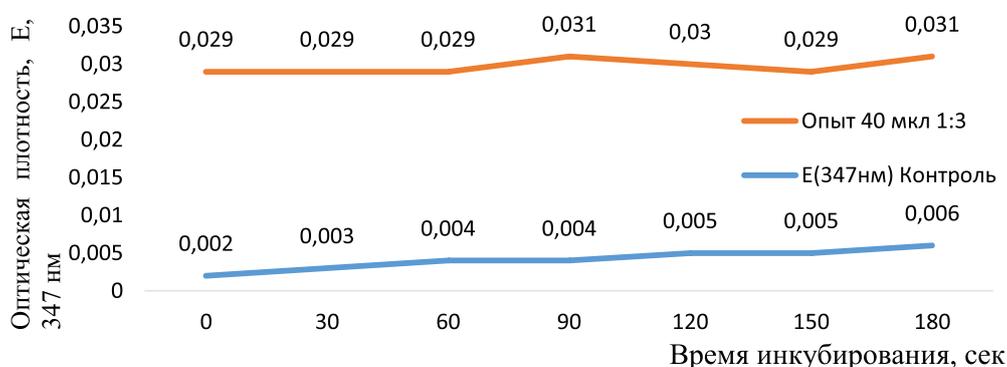
Как видно из табл. 3, наилучший эффект СОД слюны проявляла при pH = 7,9. Подобная зависимость была отмечена при использовании других аликвот фильтрата слюны.

Таким образом, в ходе проведенного эксперимента нами были подобраны оптимальные условия для исследования активности СОД слюны: 0,1 М фосфатно-аммонийный буфер (pH = 7,9), разведение слюны (1:3), соотношение реагентов (3 мл буферного раствора, 150 мкл 0,1%-ного раствора адреналина гидрохлорида, 40 мкл фильтрата слюны), то есть разработана методика, адаптированная к особенностям СОД слюны.

Таблица 3

Активность СОД при различных значениях pH (% ингибирования)

Время инкубирования, секунды	Активность СОД (%)		
	pH 7,9	pH 8,5	pH 9,9
30	100	100	100
60	100	50	50
120	70	70	70
180	50	50	50



Типичная кинетика изменения оптической плотности исследуемых проб (pH = 7,9, в опыт взято 40 мкл разбавленной слюны)

Таблица 4

Активность СОД слюны в обследуемой группе

Обследуемый			Активность СОД (%)	
№	Пол	Возраст	60 сек	180 сек
1	Ж	46	100	50
2	Ж	22	100	50
3	М	25	100	70
4	Ж	25	100	50
5	Ж	21	100	70
6	Ж	21	100	70

На втором этапе исследования, применяя данную методику, мы определяли уровень активности СОД слюны у представителей обследуемой группы. Результаты отражены в табл. 4.

Проведенное исследование свидетельствует об адекватной обеспеченности медью организма представителей обследуемой группы оренбуржцев и достаточной активности медь-зависимой супероксиддисмутазы – важнейшего компонента антиоксидантной защиты организма.

Таким образом, в экспериментальной части нашей работы проведен анализ присутствия меди в микроэлементном портрете оренбуржцев, адаптирована методика определения активности супероксиддисмутазы для слюны, определена активность супероксиддисмутазы слюны в обследуемой группе как показателя антиоксидантного статуса и обеспеченности медью.

Список литературы

1. Оберлис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / Д. Оберлис, Б. Харланд, А.В. Скальный. – СПб.: Наука, 2008. – 544 с.
2. Кожин А.А. Микроэлементозы в патологии человека экологической этиологии. Обзор литературы / А.А. Кожин, Б.М. Владимирский // Экология человека. – 2013. – № 09. – С. 56–64.
3. Карнаухова И.В. Обеспеченность железом и медью хлебобулочных изделий / И.В. Карнаухова, О.Ю. Ширяева, В.В. Гречкина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 3 (53). – С. 176–177.
4. Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Патент РФ № 2144674, 20.01.2000.
5. Семенова И.Н. Содержание меди и цинка в волосах населения башкирского Зауралья / И.Н. Семенова, С.А. Чернышов // Молодежный научный форум: естественные и медицинские науки: электр. сб. ст. по материалам XX студ. междунар. заочной науч.-практ. конф. – М.: «МЦНО», 2015. – № 1(19). URL: [https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/1\(19\).pdf](https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/1(19).pdf) (дата обращения: 15.03.2018).
6. Скальный А.В. Аккумуляция тяжелых металлов и микроэлементов в волосах населения Оренбургской области / А.В. Скальный, Е.В. Сальникова, Е.А. Кудрявцева, А.С. Кустова // Микроэлементы в медицине. – 2012. – Т. 13, № 4. – С. 42–45.
7. Агаджанян Н.А. Референтные значения содержания химических элементов в волосах взрослых жителей Республики Татарстан / Н.А. Агаджанян и др. // Экология человека. – 2016. – № 4. – С. 38–44.