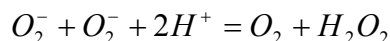


SUPEROKSIIDI DISMUTAASI ISOENSÜÜMSPEKTRID VEISTE JA KOERTE VERERAKKUES

A. Karus, V. Karus

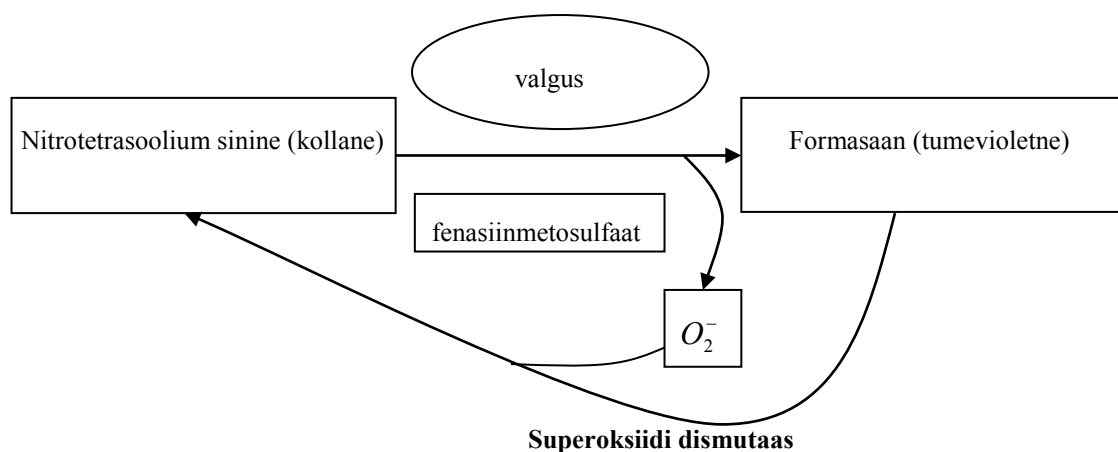
Superoksiidi dismutaas E.C.1.15.1.1. (superoksiid: superoksiidi oksüdoreduktaas) katalüüsib superoksiidradikaali disproportsioneerimisreaktsiooni:



SOD avastati 1969 ja on tuntud ka indofenooli oksüdaasi ja tetrasooliumi oksüdaasi nime all. Analoogiliselt paljude teiste oksüdoreduktaasidega sisaldab ensüümi aktiivtsenter metalliooni (Zn^{2+} ; Cu^{2+}). Superoksiidi dismutaas omab erilist tähtsust antioksidantse süsteemi osana. Tema ülesandeks organismis on kaitsta selle rakke tugevat oksüdeerijat – superoksiidradikaali – lagundades. Teadaolevalt on superoksiidi dismutaasile omane suur liigspetsiifilisus. Ensüümil on kolm isoensüümi. Eristatakse nn. lahustuvat ehk tsütoplasmaatilist SOD_A , mitokondriaalset SOD_B ja vereplasmas sisalduvat ekstratsellulaarset EC-SOD isoensüümi. SOD_A isoensüüm on eeldatavalt (tulenevalt seni määratud alloensüümspektritest) dimeer, omades alleelseid variante. Isoensüüm SOD_B on tetrameerne valk, millel alleelsed variandid puuduvad. Superoksiidi dismutaasi isoensüümspektrite informatiivsust rõhutab asjaolu, et tal puuduvad agregatsioonist või polümerisatsioonist, samuti proteolüüsil või tiolsete rühmade modifitseerumisel tekkida võivad, aga ka koensüümsete komponentide erinevast sisaldusest tingitud ensümaatilisel aktiivsed molekulaarsed vormid. Sellest järeldub, et kõik ensüümi polümorfseid vormid on geneetilise päritoluga ning isoensüümspektrid vastavad otseselt looma genotüübile.

Materjal ja meetodika

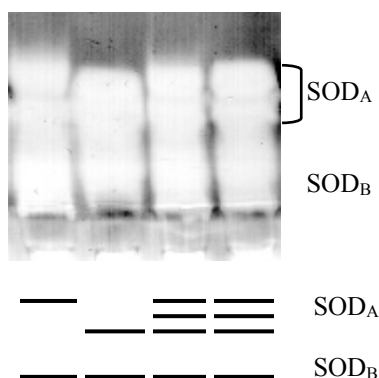
Uurimuses kasutati 386 veise (151 eesti mustakirjut ja 235 eesti punast tõugu) ning 21 koera EDTA või Li-tsitraadiga stabiliseeritud verd. Vererakud eraldati fraktsioneerival tsentrifuugimisel ja lagundati korduva (2x) külmutamisega bidestillieeritud vee viiekordses (v/v) ruumalas. Saadud ekstraktides määrati superoksiidi dismutaasi aktiivsus. Superoksiidi dismutaasi isoensüümspektrid lahutati isoelektrilisel fokuseerimisel horisontaalses polüakrüülamiidgeelis (BioRad Mini-IEF cell) ja vertikaalses 7,5% polüakrüülamiidgeeli plokis (Himifil). Aktiivse ensüümi lokalisatsioon määrati tetrasooliummeetodil:



Ilmutamiseks inkubeeriti geele lahuses, mis sisaldas tetranitrotetrasoolium sinist, fenasiinmetosulfaati ja taandatud NAD, valgustati kaks-kolm minutit päevalguses ja inkubeeriti pimedas 30 minutit temperatuuril 37 °C. Aktiivne ensüüm on täheldatav heledate laikudena tumevioletsel foonil.

Tulemused ja arutelu

Teadavaolt on superoksiidi dismutaasi eksisteerimist alleelsete molekulaarsete vormidena varem täheldatud hirvedel ja inimestel. Koerte ja lammaste kohta käivad kirjandusandmed on vastuolulised ning seetõttu pakkus suuremat huvi koerte vererakkude SOD. Kooskõlas kirjandusandmetega sisaldus koerte erütrotsüütides ainult üks superoksiidi dismutaasi isoensüüm – SOD_A. Nimetatud dimeerse ensüümvalgu esinemisele allosüümsete vormidena on viidanud juba Harris ja Hopkinson (1976). Analoogselt erütrotsüütides sisalduvate alleelsete vormidega leidis ka meie poolt uuritud koerte leukotsüütides kaks alleelset SOD_A vormi – SOD_{A2} ja SOD_{A1} ning nende hübriidsatsioonil tekkinud dimeer. Lisaks superoksiidi dismutaasi lahustuvale vormile SOD_A leidis koerte leukotsüütides ka mitokondritele iseloomulik SOD_B isoensüüm. Koerte leukotsüütide SOD isoensüümspektrid ja vastavad fenotüübid on toodud joonisel 1. Fenotüüpide jaotus uuritud koeratõugude järgi on toodud tabelis 1. Koeratõugude nimetamisel on aluseks võetud Adlercreutz'i käsiraamat (1996).



Joonis 1. SOD isoensüümspekter koerte leukotsüütides

Figure 1. SOD isoenzyme spectra in dog leukocytes

fenotüübid SOD_{A1}/SOD_{B1}; SOD_{A2}/SOD_{B1}; SOD_{A2-1}/SOD_{B1}; SOD_{A2-1}/SOD_{B1}
phenotypes SOD_{A1}/SOD_{B1}; SOD_{A2}/SOD_{B1}; SOD_{A2-1}/SOD_{B1}; SOD_{A2-1}/SOD_{B1}

Tabel 1. SOD fenotüüpide jagunemine tõugude lõikes

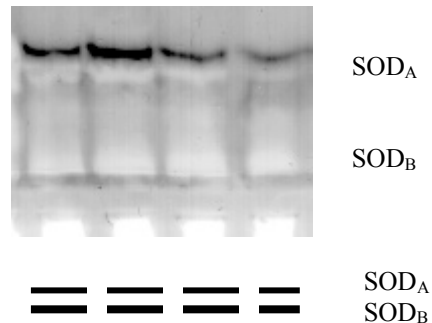
Table 1. SOD phenotypes and studied dog breeds

Koeratõug <i>Dog breed</i>	Tõu rühm FCI Class FCI	Koerte arv <i>Number of dogs n</i>	SOD _A fenotüüp <i>SOD_A phenotype</i>		
			SOD _{A1} /SOD _{B1}	SOD _{A2-1} /SOD _{B1}	SOD _{A2} /SOD _{B1}
Kuldne retriiver, Nova Scoti retriiver / <i>Golden Retriever, Nova Scotia Duck Tolling Retriever</i>	8,1	5	–	5	–
Kokkerspanjel <i>English Cocker Spaniel</i>	8,2	3	2	–	1
Afganistani hurt <i>Afghan hound</i>	10,1	6	–	2	4
Muud / <i>Others</i>	–	7	–	6	1
Kokku / <i>Total</i>		21	2	13	6

Tulenevalt tabelis 1 toodud andmetest oli alleeli SOD_{A2} sagedus 0,595 mõnevõrra suurem SOD_{A1} sagedusest 0,405. Sagedamini esinevaks SOD fenotüübiks osutus SOD_{A2-1}/SOD_{B1}. Fenotüüpi SOD_{A1}/SOD_{B1} täheldati vaid kahel koeral, kusjuures need mõlemad olid kokkerspanjelid (erineva sugupuuga).

Superoksiidi dismutaasi isoensüümspekter veiste vererakkudes sarnanes suures osas koerte vererakkude SOD isoensüümspektritega. Veiste erütrotsüütides sisaldus samuti vaid isoensüüm SOD_A. Kuigi uuriti suhteliselt

suurt valimit, ei õnnestunud meie töös uuritud veiste erütrotsüütides leida alleelseid SOD_A vorme. See on kooskõlas Glazko ja Sozinovi seisukohtadega SOD alleelsete vormide puudumisest veistel (Glazko, Sozinov, 1993). Veiste leukotsüütides sisaldusid tsütoplasmaatiline SOD_A ja mitokondriaalne SOD_B. Veiste leukotsüütide SOD isoensüümspekter ja vastav fenotüüp on toodud joonisel 2.



Joonis 2. SOD isoensüümspekter veiste leukotsüütides
Figure 2. SOD isoenzyme spectra in cattle leukocytes
 fenotüüp SOD_A1/SOD_B1
 phenotype SOD_A1/SOD_B1

Beckman oma inimeste leukotsüütide SOD käsitlevas uurimuses lahustuvat isoensüümi ei leidnud (Beckman *et al.*, 1973). Mõlema isoensüümi leidumist lammaste leukotsüütides on varem kirjeldanud ka Glazko ja Sozinov (1993), ent vastavad andmed veiste ja koerte kohta seni puudusid. Alleelsed SOD_A vormid veiste leukotsüütides puudusid.

Kirjandus

- Adlercreutz C.-J. Maailma koerad. – Sinisukk, 1996. – 452 lk.
- Beckman G., Lundgren A., Tarnvik A. Superoxide dismutase isozymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. – *Hum. Hered.*, vol. 23, p. 338, 1973
- Harris H., Hopkinson D. A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. – Amsterdam: NHPC, 1976.
- Holtzhauer M. Biochemische Labormethoden. – Berlin: Springer 1995. – 249 S.
- Karus A., Lepiku T., Karus V. Electrophoretical Methods in Enzyme Polymorphism Study. – 23rd Estonian Chemistry Days, Tallinn, p. 53, 1997.
- Karus V., Karus A., Lepiku T. Elektroforeesi kasutamine vererakkude ensüümide polümorfismi uurimisel. – Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi Toimetised 3, lk. 18...19, 1997.
- Karus A., Karus V. Blood cell enzyme polymorphism study using electrophoresis. – 48th EAAP Annual Meeting in Vienna, Austria, 1997.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidjan J. Practical isozyme genetics. – Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1987.
- Richardson B. J., Baverstock P. R., Adams M. Allozyme electrophoresis: Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Sidney: Acad.Press, 1986.
- Zilmer M., Zilmer K. Oksüdatiivne stress ja antioksidantravi. – Tartu, Tartu Ülikool, 1994. – 168 lk.
- Glazko, Sozinov: Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. – Киев, Урожай, 1993. – 528 с.

Autorid tänavad prof. V. I. Glazko'd konsultatsioonide eest ja Eesti Teadusfondi, kes finantseerib käesolevat uurimistööd.

Superoxide Dismutase Isoenzyme Spectra in the Cattle and Dog Blood Cells

A. Karus, V. Karus

Summary

386 cattle and 21 dog blood samples were analysed. Blood cells were separated by centrifuging and destroyed by repeated (twice) freezing and defrosting in the presence of 5 x volume of bidist. water. Superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1.) isoenzyme spectra were separated using the electrophoresis in the 7.5% PAG and using the horizontal IEF. For determining the isoenzyme spectra the tetrazolium method was used. In cattle red blood cells was found SOD_A in the only variant similar to SOD_{A2} observed in the dog red cells. In dog erythrocytes two allelic variants (and a hybrid form) of the SOD_A were found. This fact is an evidence of the existing of the multiple allelic forms of the superoxide dismutase in dog blood cells. In dog and cattle leukocytes both SOD_A and SOD_B were found. SOD_B did not have allelic forms. SOD_A isoenzyme had two allelic forms in dog leukocytes. Frequency of SOD_{A2} allele 0,595 was higher than SOD_{A1} allele 0.405. Most frequent was SOD phenotype SOD_{A2-1}/SOD_{B1} . Phenotype SOD_{A1}/SOD_{B1} was observed only twice. Both of them were Cocker Spaniels (with different genealogy). SOD isoenzyme spectra in dog and cattle leukocytes with describing the respective phenotypes are shown in figures. Data about dog SOD phenotypes by dog breed are given in the table.