

# Superoxyd-Dismutaseaktivität der polymorphonuklearen Leukozyten der Neugeborenen

Von

GY. BALLA, ANIKÓ MAKAY, L. SZABÓ und L. KARMAZSIN

Kinderklinik der Medizinischen Universität Debrecen und Zentrales Isotopenlaboratorium  
der József Attila Universität Szeged

Eingegangen am 1. Juli 1980

Die Superoxyd-Dismutase (SOD), welche einen äußerst wichtigen Platz im Sauerstoffmetabolismus einnimmt, wirkt auf die Regelung der intrazellulären Killing-Funktion der polymorphonuklearen (PMN) Leukozyten durch Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der aktiven Sauerstoffradikalen. Ihre verringerte Aktivität kann nebst der Einengung der bakteriziden Funktion auch einen Energie-Defizit der Zellen zur Folge haben. Das auf eine Respirationsbehandlung angewiesene Neugeborene, besonders aber Frühgeborene, kann selbst nebst der sorgfältigsten Monitorierung in einen hyperoxischen Zustand geraten, in dem durch aktive Sauerstoffradikale unter Umständen autotoxische Erscheinungen herbeigeführt werden. Die niedrigere Aktivität der protektiv wirkenden SOD vermag diese pathophysiologische Belastung nicht einmal durch Mobilisierung der endogenen Antioxydantien abzuwehren.

Im Laufe früherer Untersuchungen fanden wir in den Leukozyten der Frühgeborenen — im Vergleich zu den entsprechenden Werten der reifen Neugeborenen — eine niedrigere SOD-Aktivität. Diese Erscheinung hängt vermutlich mit der Insuffizienz der Abwehrfunktion der Frühgeborenen und der toxischen Wirkung von  $O_2$  zusammen.

Dem Metabolismus der PMN-Leukozyten liegt die Glykolyse zugrunde, durch die im Laufe der Phagozytose und der Killing-Funktion aufgetretene beträchtliche  $O_2$ -Konsumption wird indessen die Konzentration der aktiven  $O_2$ -Radikalen gesteigert. Die

$O_2$ -Radikale mit großer Reaktivität — Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Singlet-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) — sind die Mediatoren der mikrobiziden Funktion, ihre Bildungsintensität ist dem Killingeffekt proportional [17, 3]. Die Hauptquelle ihrer Bildung ist der Hexose-monophosphat-Shunt, zur Messung ihrer Aktivität eignet sich unter anderem die Erscheinung der Chemilumineszenz, wo die  $O_2$ -Radikale der Intensität des durch die rekombierenden Radikale induzierten Lichtes folgen [1]. Eine Radikalgeneration tritt auch in Fällen auf, in denen noch keine Phagozytose, nur die Bindung der Immunkomplexe zur Zelloberfläche

zu beobachten ist [10]. Die aktiven  $O_2$  Radikalen verfügen aber nicht nur über eine die Phagozytenpartikula schädigende, sondern auch über eine autotoxische Wirkung. Die Aufgaben des zentralen Kerns der regulierenden Enzyme, der SOD sind einerseits die  $O_2$ -Scavanging, d.h. eine protektive Funktion, andererseits die Steigerung der Produktion des bakterizid wirkenden  $^1O_2$ -s in den MPN-Leukozyten; an dieser letzterwähnten Aufgabe beteiligt sich auch die Myeloperoydase. Die Rolle der SOD in dem nicht-mitochondrialen  $O_2$ -Stoffwechsel gilt für geklärt [17, 2]. Die SOD ist ein ubiquitäres Enzym, betreffs ihrer Isoenzyme und Lokalisation fanden nicht nur in tierischen sondern auch in pflanzlichen Zellen bzw. Bakterien ausführliche Untersuchungen statt [7, 16]. Zu den ersten SOD-Forschungen wurden Erythrozyten herangezogen [11, 12]; seitdem wird dem Enzym bei tumorösen und endokrinen Krankheiten eine stets größere Bedeutung beigemessen [15, 19].

Unter den zahlreichen in der postnatalen Adaptationsperiode der Neugeborenen zustandekommenden wesentliche Änderungen hebt sich die Ingangsetzung der Funktion des Respirationssystems hervor. Unter Wirkung der Hyperoxie erhöht sich die SOD-Aktivität der Lunge und auch die der alveolären Makrophagen [14, 18]; der SOD wird auch in diesen Fällen eine protektive Wirkung beigemessen.

Diesem »Doppelgesicht« der SOD ist es zu verdanken, daß in den PMN-Leukozyten die Abwehr gegenüber

dem aeroben Metabolismus, dem intrazellulären Killing und der Autooxydation ausgeglichen verläuft. Vielleicht ist gerade diese vielseitige Funktion dafür verantwortlich, daß betreffs des SOD-Wertes der PMN-Zellen eindeutige Daten nur mit Mühe zu gewinnen sind. In den beiden Mitteilungen ein und desselben Autorenteam, die in einjähriger Zwischenzeit erschienen, finden sich unterschiedliche Ergebnisse [8, 9]. Bei der Messung der Enzymaktivität wird der Myeloperoydase eine große Aufmerksamkeit gewidmet — durch dieses Enzym wird nämlich, insofern es im Extrakt anwesend ist, die Steigerung der Autooxydation des Substrats verursacht [6].

Die Untersuchung des SOD-Gehalts der PMN-Leukozyten bietet auch über den Metabolismus und über die bakterizide Funktion der Zellen in der postnatalen Phase wichtige Informationen. Zur Analyse des zwischen dem Reifegrad der Neugeborenen und dem SOD-Gehalt der PMN-Leukozyten bestehenden Zusammenhanges mußten wir zuerst eine methodologische Aufgabe lösen.

Mehrere Autoren haben bereits nach einem Zentrifugieren mit 25 000 g myeloperoxidasefreies Extrakt gewonnen [6, 9, 19]. Bei verschiedenen Geweben, alveolären Makrophagen hat sich dieses Verfahren auch in unseren Untersuchungen gut bewährt, bei den PMN-Zellen konnte aber die Peroxydase — wie wir beim methodischen Teil darauf noch eingehen werden — nicht aus dem Supernatant entfernt werden.

## METHODIK

*PMN-Leukozytenextrakt*

Die Zellen wurden aus gerinnungsgehemmten, peripheren Venenblut durch 1stündige spontane Sedimentierung in 3%iger Dextranlösung (Pharmacia, Stockholm) bei 37 °C gewonnen. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-Puffer (PBS) wurde eine Konzentration von  $10^7$  /ml eingestellt und die kontaminierenden Erythrozyten mittels hypotonischer Lyse entfernt. Zunächst wurden die PMN-Zellen mit Ultraschall freigesetzt, worauf Zentrifugieren (15 Minuten lang, 30 000 g +14 °C) folgte. Die SOD-Bestimmung wurde aus dem Supernatant durchgeführt.

*SOD-Bestimmung mit Hemmung der Epi-nephrin-Autooxydation [6, 13]*

2,9 ml  $5 \times 10^{-2}$  M  $\text{NaHCO}_3$ -HCl Pufferlösung [pH 10,2, EDTA-(Reanal, Budapest)] -Konzentration  $2 \times 10^{-1}$  mmol] wurden

mit 100  $\mu\text{l}$  in  $10^{-1}$  N HCl-Lösung gelöster 10 mm L-Adrenalin (Merck, Darmstadt)-Lösung versetzt. Die Oxydation veranschaulicht Abbildung 1. Photometrierung mit dem Spektrophotometer Beckmann Acta CV, bei 480 nm. Durch 100  $\mu\text{l}$  Supernatant wurde die Reaktion nicht gehemmt, es kam sogar zur Beschleunigung der Oxydation und demzufolge zu einem steileren Kurvenverlauf. Daraus ging hervor, daß in diesem System die SOD-Bestimmung nicht erfolgreich durchgeführt werden kann; die Ursache der Oxydationsbeschleunigung ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Anwesenheit von Myeloperoxidase, die aus dem Extrakt nicht einmal mit einem Zentrifugieren mit 30 000 g zu entfernen ist.

*SOD-Bestimmung mit Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese [5]*

Das Wesentliche der Bestimmung ist, daß im Gel, an der Stelle der SOD-Lokalisation, die Umwandlung von NBT zu

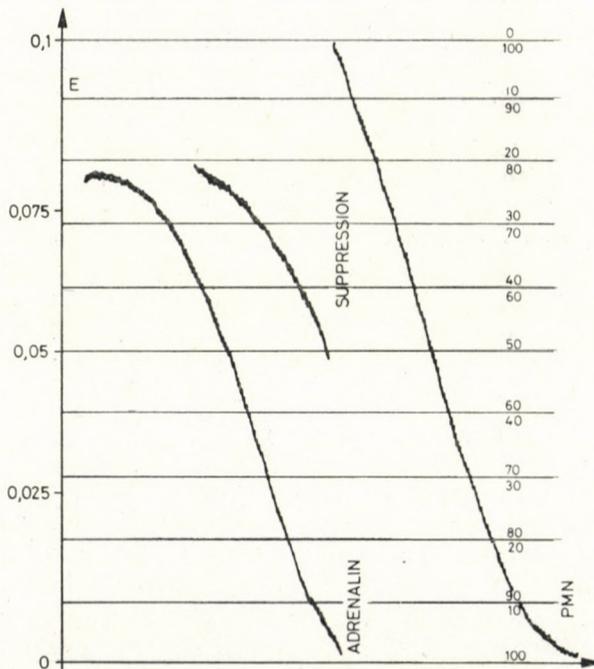


ABB. 1. Spektrophotometrische Registrierung der spontanen Adrenalinautooxydation und des modifizierenden Effektes von PMN-Extrakt bei 480 nm

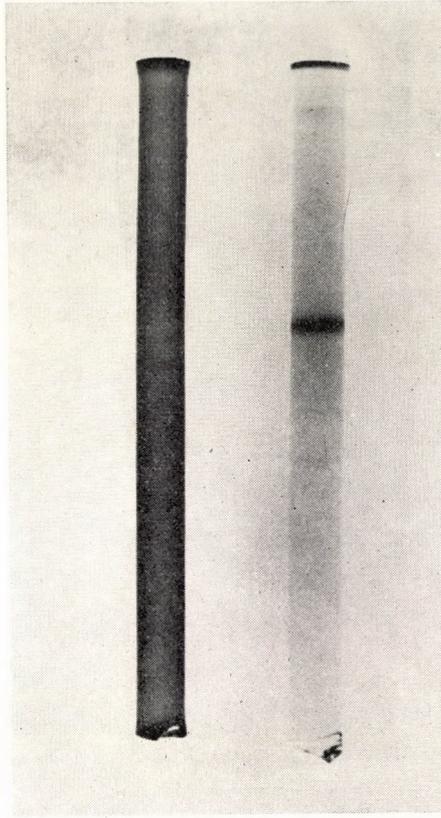


ABB. 2. PMN-Extrakt mit Gelelektrophorese; Nachweis der SOD-Aktivität mit der NBT-Reaktion und Eiweißnachweis mit Amidoschwarz-Färbung

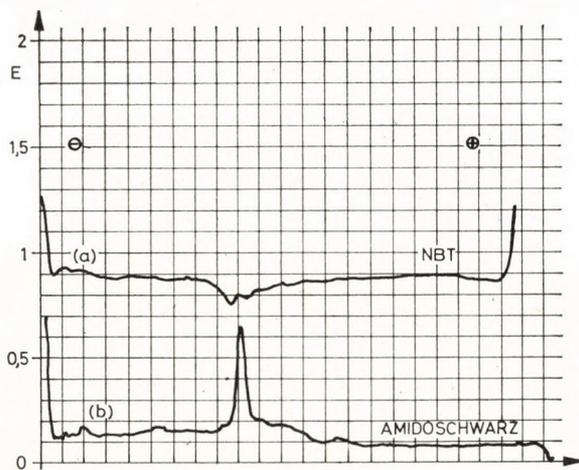


ABB. 3. Densitogramm der Elektrophorese des Polyakrylamid-Gels des in Abbildung 2 dargestellten PMN-Extrakter

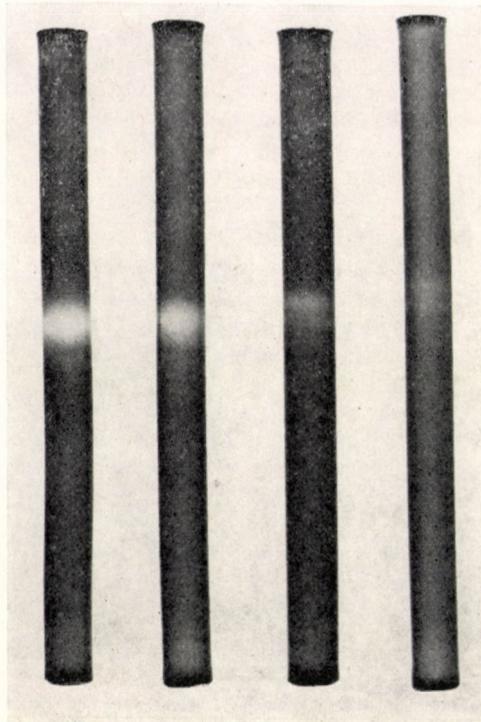


ABB. 4. Gelelektrophorese der aus  $2 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $10^7$  und  $5 \times 10^6$  PMN/ml Zellkonzentrationen hergestellten Extrakte

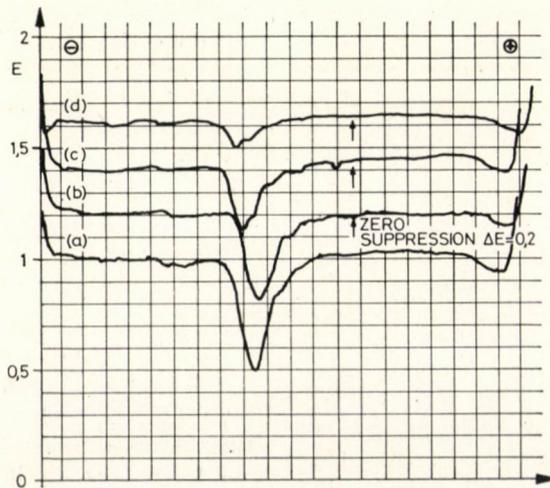


ABB. 5. Densitogramme der in Abbildung 4 dargestellten Gelelektrophoresen

Formazan im Laufe der Ultraviolettbestrahlung gehemmt wird. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 7,5%igen Gel (Reanal, Budapest). Die Proben wurden in 30%iger Saccharoselösung aufgetragen, die elektro-phorierte Extraktmenge betrug 100  $\mu$ l. Zur Bestimmung der Enzymlokalisierung und -aktivität wurden die Gele mit verschiedenen Farbstofflösungen gefärbt: 20 Minuten lang mit  $2,45 \times 10^{-3}$  M Nitroblue-tetrazolium (Reanal, Budapest), sodann 15 Minuten lang mit  $28 \times 10^{-5}$  M-Riboflavin und mit  $2,8 \times 10^{-2}$  M Tetramethyldiamin (Reanal, Budapest). Zur Herstellung der Lösungen wurde  $3,6 \times 10^{-2}$  M PBS (pH 7,8) verwendet. Die  $O_2$ -Radikal-Induktion bzw. Farbenentwicklung erfolgte mit Ultraviolettbeleuchtung. An der Stelle der Aktivität erschien anstatt einer dunkelblauen Verfärbung ein helles Gebiet. Zum Nachweis von Protein diente in 7%iger Essigsäurelösung gelöstes 0,1%iges Amidoschwarz (Abb. 2). Es folgten Messung der Gele mit einem Kipp-Zonen Densitometer und Registrierung der Gel-extinktion (Abb. 3). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die SOD auch quantitativ nachgewiesen werden: Betrachtet man nämlich den 50%igen Abfall der Extinktion für eine SOD-Enzym-Einheit, so eignet sich zur Bestimmung der Aktivität folgende Formel

$$\frac{E_0 - E_m}{E_0} \times 2 = EA$$

wo  $E_0$  die Extinktion jenes Gelbereichs bedeutet, wo keine Enzymaktivität vorliegt, während  $E_m$  jenen maximalen Extinktionsabfall anzeigt, wo die Reaktion durch das Enzym gehemmt wird. Unter Berücksichtigung der Verdünnungen beträgt die SOD-Aktivität der in der Abbildung angeführten PMN-Leukozyten  $3,2 \text{ U}/10^7$  Zellen. Bei der Amidoschwarz-Färbung fällt die Enzymlokalisierung mit dem negativen Fleck der NBT-Färbung zusammen.

Abbildung 4 veranschaulicht die mit unterschiedlich konzentrierten PMN-Leukozytensuspensionen gefärbten Gele, in der Reihenfolge der Konzentrationsverringere-

rung. Die Werte der Zellkonzentration gestalteten sich wie folgt: erstes Gel:  $2 \times 10^7/\text{ml}$ , zweites Gel:  $1,5 \times 10^7/\text{ml}$ , drittes Gel:  $10^7/\text{ml}$  und viertes Gel:  $5 \times 10^6/\text{ml}$ . In Abbildung 5 ist die Reaktionshemmung dargestellt; wie man sieht, ist die Extinktionsverringierung auf dem Gel-Densitogramm der Konzentrationsabnahme parallel. Im Interesse der deutlichen Überblickbarkeit wurde die 0,2 Extinktion O-Suppression in positiver Richtung angewendet. Die ausgerechneten SOD-Werte machten je Gel 10, 7,6, 5,2 und 2,6 aus, d.h., daß sich die Aktivität der Konzentration verhältnismäßig vermindert hat. Der Durchschnitt der auf  $10^7/\text{ml}$  Zellen bezogenen Werte betrug 5,1 U, was nur um 0,1 U von der Aktivität der dritten Probe abweicht. Die Methode eignet sich somit zur quantitativen Bestimmung der SOD. Am vorteilhaftesten hat sich die Anwendung der PMN-Leukozytensuspension in einer Konzentration von  $10^7/\text{ml}$  erwiesen.

## MATERIAL

Die SOD-Bestimmung erfolgte aus den PMN-Leukozyten von 50 an unserer Klinik auf die Welt gekommenen 1–3tägigen Neugeborenen (23 Knaben und 27 Mädchen). Die der Gestationszeit entsprechende Verteilung unseres Materials zeigt Abbildung 6.

## STATISTIK

Im Laufe der Auswertung unserer Ergebnisse mit der Regressionsberechnung wurden die Parameter der sich anpassenden Geraden sowie das Signifikanzniveau des Regressionskoeffizienten bestimmt.

## ERGEBNISSE

Unsere Ergebnisse sind in Abbildung 6 zusammengefaßt. Parallel mit der Verlängerung der Gestationszeit steigt der SOD-Gehalt der PMN-Leu-

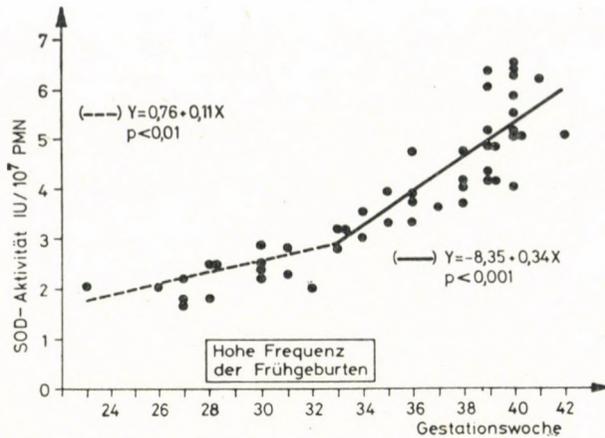


ABB. 6. SOD-Aktivität der PMN-Leukozyten reifer und unreifer Neugeborenen in der Funktion des Reifegrades

kozyten in allen Intervallen an. Was aber das Tempo des Anstiegs anbelangt, lassen sich zwei Phasen unterscheiden: Bis zur 23–33. Woche ist der Anstieg zwar signifikant ( $p < 0,05$ ), jedoch von geringerem Ausmaß, als nach der 33. Woche. Die SOD-Aktivität dieser Periode macht im Durchschnitt  $2,39 \pm 0,45$  U/10<sup>7</sup> PMN aus. Von der 32.–33. Gestationswoche an ist die Gerade wesentlich steiler, d.h. daß sich das Anstiegstempo beschleunigt hat. Die Tangente der Geraden ist stark signifikant ( $p < 0,01$ ) und das Dreifache des in der ersten Periode gefundenen Wertes. Der Durchschnittswert der SOD beträgt  $4,41 \pm 1,07$  U/10<sup>7</sup> PMN. Aus Abbildung 6 ist zu entnehmen, daß sich der SOD-Wert der PMN-Leukozyten bis zur 33. Gestationswoche mäßig und von diesem Zeitpunkt an in bedeutenderem Maße erhöht. Der Anstieg erwies sich in sämtlichen untersuchten Reifeperioden als signifikant.

#### BESPRECHUNG

Die Bestimmung der SOD-Aktivität der PMN-Leukozyten bietet vielseitige, wesentliche Daten zur eingehenderen Klärung der perinatalen Adaptationsprobleme der Frühgeborenen, aus dem Bereich des Metabolismus, der Immunfunktionen und der O<sub>2</sub>-Therapie. Angesichts dessen, daß sich die in der Literatur publizierten Verfahren als ungeeignet erwiesen, erfolgte die Bestimmung der SOD-Aktivität der PMN-Leukozyten in den oben beschriebenen Versuchen mit der von uns eingeführten Methode. Unsere Ergebnisse stimmten betreffs des Verhaltens der bei Frühgeborenen beobachteten und auch von uns untersuchten sonstigen PMN-Leukozyten mit den Literaturdaten überein [4]. Da die SOD nicht nur in der Killingfunktion, sondern auch in der Dismutierung der toxischen O<sub>2</sub>-Radikale eine zentrale Rolle spielt, ist es ver-

ständig, daß bei den Neugeborenen mit niedrigem Gestationsalter durch eine exogene O<sub>2</sub>-Belastung der unreifen und deshalb relativ insuffizienten Enzymaktivität zufolge, schwere pathologische Veränderungen herbeigeführt werden können (retrolentale Fibroplasie, bronchopulmonale Dysplasie). Unsere Methode, die sich zur quantitativen, exakten Messung der SOD-Aktivität der PMN-Leukozyten eignet, bietet eine wesentliche Hilfe zur Erschließung des aspezifischen Abwehrmechanismus der Frühgeborenen und nicht zuletzt auch zur Monitorierung der Antioxydanstherapie.

## LITERATUR

1. ALLEN, R. C., STJERNHOLM, R. L., STEELE, R. H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **47**, 679 (1972).
2. ALLEN, R. C., YEVICH, S. J., ORTH, R. W., STEELE, R. H.: The superoxide anion and singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **60**, 909 (1974).
3. BABIOR, B. M., KIPNES, R. S., CURNUTTE, J. T.: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. clin. Invest.* **52**, 741 (1973).
4. BELLANTI, J. A., CANTZ, B. E., YANG, M. C., von THADDEN, H., SCHLEGEL, R. J.: Biochemical changes in human polymorphonuclear leukocytes during maturation. In: *The Phagocytic Cell in Host Resistance* (J. A. Bellanti, D. H. Dayton, eds.). Raven Press, New York 1975. pp. 321–329.
5. BEUCHAMPI, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276 (1971).
6. DECCHTELET, L. R., MCCALL, C. F., MCPHAIL, L. C., JOHNSTON, R. B.: Superoxide dismutase activity in leukocytes. *J. clin. Invest.* **53**, 1197 (1974).
7. JACKSON, C., DENCH, J., MOORE, A. I., HALLIWELL, B., FOYER, C. H., HALL, D. O.: Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Europ. J. Biochem.* **91**, 339 (1978).
8. KOBAYASHI, Y., ISHIGAME, K., ISHIGAME, Y., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of human granulocytes and lymphocytes. *Lancet* **1**, 865 (1977).
9. KOBAYASHI, Y., OKAHATA, S., SAKANO, T., TANABE, K., USUI, T.: Superoxide dismutase activity of T lymphocytes and non-T lymphocytes. *FEBS Lett.* **98**, 391 (1979).
10. KYOTAKI, C., SHIMIZU, A., WATANABE, S., YAMAMURA, Y.: Superoxide production from human polymorphonuclear leukocytes stimulated with immunoglobulins of different classes and fragments of IgG bound to polystyrene dishes. *Immunology* **35**, 613 (1978).
11. MAZEAUD, F., MARAL, J., MICHELSON, A. M.: Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the carp: erythrocyte manganese SOD. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **86** 1161 (1979).
12. McCORD, J. M., FRIDOVICH, I.: Superoxide dismutase, enzymatic function for erythrocyte (hemocupreine). *J. biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
13. MISRA, H. P., FRIDOVICH, I.: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. biol. Chem.* **247**, 3170 (1972).
14. NERUKRAR, L. S., ZELIGS, B. J., BELLANTI, J. A.: Changes in superoxide dismutase, catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities of rabbit alveolar macrophages induced by postnatal maturation and/or in vitro hyperoxia. *Photochem. Photobiol.* **28**, 781 (1978).
15. OBERLEY, L. W., BUETTNER, G. R.: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* **39**, 1141 (1979).
16. OSE, D. E., FRIDOVICH, I.: Manganese-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*: reversible resolution and metal replacements. *Arch. Biochem.* **194**, 360 (1979).
17. THOMAS, H., MAUGH, I. I.: Singlet oxygen: A unique microbicidal agent in cells. *Science* **182**, 44 (1973).
18. YAM, J., ROBERTS, F. R. J.: Oxygen toxicity: comparison of lung biochemi-

cal responses in neonatal and adult rats. *Pediat. Res.* **12**, 115 (1978).  
19. Van BALGOOY, J. N. A., ROBERTS, E.:  
Superoxide dismutase in normal and

malignant tissues in different species.  
*Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 263  
(1979).

Dr. Gy. BALLA

Pf. 32

H-4012 Debrecen, Ungarn