Віктор Гусак

ОЧИСТКА І ВЛАСТИВОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ПЕЧІНКИ СВИНІ

Вступ

В більшості хімічних реакцій, які проходять в живому організмі, в ролі акцептора електронів виступає кисень. При цьому в залежності від типу і умов реакцій в якості проміжних чи побічних продуктів можуть утворюватися активовані форми кисню (АФК), до яких належить супероксид-аніон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2) і гідроксил-радикал ($HO^\cdot$) [1-5].

Оксидативний стрес – стан, коли генерація вільнорадикальних форм кисню в організмі починає перевищувати потужність антиоксидантних систем. За таких умов пошкоджуються практично всі компоненти клітини. У білках вони приводять до окислення сульфгідрильних груп цистеїну, імідазольних груп гістидину, циклічних кілець тирозину, фенілаланіну, триптофану, що приводить до модифікації самих білків [3-5]. Дія АФК на ДНК призводить до розриву нуклеотидного ланцюга, модифікації вуглеводної частини і азотистих основ нуклеотидів, що є причиною появи точкових мутацій в самому ланцюгу ДНК [4]. У ліпідах АФК призводять до ланцюгової реакції утворення пероксидів ліпідів (ліпід-ООН) і так званих "ліполіпідів" [6,7]. В організмі існують спеціальні механізми захисту від АФК. Першою лінією захисту є супероксиддисмутаза (СОД), яка перетворює супероксид-аніон на пероксид водню [7, 10-13]. Цей пероксид водню може легко дисмутувати до води і молекулярного кисню під дією ще одного антиоксидантного ферменту – каталази. СОД – перша лінія захисту від АФК, тому вивчення її властивостей має важливе значення.

Метою даної роботи було провести часткову очистку СОД та дослідити деякі властивості даного ферменту.

Матеріали і методи

І. *Приготування препаратів.*

Свіжу печінку свині заморожували і зберігали при температурі -18°С. Цю печінку використовували протягом трьох місяців досліджень. Всі речовини, що використовувались для досліджень, були кваліфікації не нижче "ЧДА".

Розморожену тканину промивали в охолодженому фізіологічному розчині, зважували і гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера у співвідношенні 1:10 (тканина/середовище гомогенізації). Середовище гомогенізації містило (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер ($КР_і$), рН 7,0, 0,5 мМ стилендиамінтетраацетат (ЕДТА) і кілька кристаликів фенілметилсульфонілфториду, який є інгібітором протеаз. Центрифугували при 15000g протягом 15 хв при +4°С. Для визначення активності СОД використовували супернатант.

ІІ. *Часткова очистка СОД висолюванням сульфатом амонію.*

Суть методу висолювання полягає в тому, що, додаючи різну кількість сульфату амонію, можна осадити білки з різними молекулярними масами. При

© В.Гусак

розчиненні певної порції солі розчин перемішують ще 1 год за допомогою магнітної мішалки при t°=5°C, а потім центрифугують при 15000 g протягом 15 хв. В залежності від того, які білки необхідно виділити, для подальшої роботи використовують осад чи супернатант. Осад перерозчинюють у невеликому об'ємі води чи буферному розчині і звільняють від надлишку сульфату амонію шляхом діалізу. Супернагант або також обезсолюють, або додають до нього нову порцію солі для досягнення більш високого ступеня насичення; в останньому випадку процедуру висолювання повторюють.

III. *Визначення активності СОД.*

Для визначення активності даного ферменту ми використовували спосіб, який базується на інгібуванні СОД реакції окислення кверцетину [6]. Суміш для визначення активності СОД містила (вказано кінцеві концентрації): 30 мМ Тріс-HCl-буфер (pH 10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ ТЕМЕД, 0,05 мМ кверцетин і 1-30 мкл супернатанту. В цій суміші ТЕМЕД генерує супероксид-аніон, який окислює кверцетин, швидкість реакції окислення реєстрували на ФЕКу при довжині хвилі 400 нм.

Реакцію починали внесенням кверцетину. За контроль було взято пробу без супернатанту. При одночасному додаванні в суміш кверцетину і препарату, що містить СОД, фермент починає конкурувати з кверцетином за O_2^-, тому реакція окислення кверцетину уповільнюється. На основі визначень швидкості реакції при 5-8 різних кількостях препарату будувались криві інгібування окислення кверцетину. За допомогою комп'ютерної програми "KINETICS" розраховували константу половинного інгібування (K_{50}), яка дорівнює кількості мікролітрів препарату, при якій швидкість реакції окислення кверцетину зменшується наполовину від максимального інгібування.

Одна одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, який наполовину інгібує реакцію окислення кверцетину (тобто активність в 1 одиницю має СОД, що міститься в K_{50} мкл препарату тканини). Специфічна активність показує, скільки одиниць активності приходиться на 1 мг білка, і розраховується за формулою:

$$\mathbf{A = 1 / (K_{50} \bullet [білок])},$$

де А – активність, Од/мг білка; K_{50} – константа половинного інгібування, виражена в мілілітрах, [білок] – концентрація білка в пробі, мг/мл. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [9].

IV. *Електрофорез в поліакриламідному гелі.*

Електрофорез дозволяє розділити білкову суміш не тільки за зарядами, а також і за розмірами і формами частинок. Ми проводили електрофоретичне розділення білків в тонкому шарі поліакриламідного гелю. В роботі ми використали два типи гелю – концентруючий і розділяючий. Розділяючий гель (7%) містив (у загальному об'ємі 20мл) 2,5 мл буферу для гелю (pH 8,9), 2,5 мл акриламіду, 20 мг персульфату амонію та 20 мкл концентрованого ТЕМЕДу. Склад концентруючого гелю (6%): 1,75 мл буферу для гелю (pH 8,9), 1,75 мл

акриламіду, 5 мл персульфату амонію та 10 мкл концентрованого ТЕМЕДу (у загальному об'ємі 10мл). Електрофорез проводили при 160 В і 36 мА. Отриманий гель витримували 20 хв в $2,45\times10^{-3}$ М розчині нітротетразолію синього для утворення O_2^- з O_2. Потім рідину зливали та інкубували 15 хв у суміші, що містила такі компоненти (вказано кінцеві концентрації): 28 мкМ ТЕМЕДу, 0,028 мМ рибофлавіну, 36 мМ КФБ (рН 7,8). Гель поміщали в сухі чашки Петрі і залишали на світлі на 5-10 хв. За цей час гелі зафарбовуються в синій колір, крім зон, які мають СОД-активність (незабарвлені).

V. *Визначення термостабільності СОД.*

Пробу нагрівали на водяній бані при t°=45°С. Через рівні проміжки часу відбирали супернатант для визначення активності СОД, приймаючи контроль (без нагрівання) за 100%. Нагрівання СОД проводили протягом 3 год.

Результати та обговорення

I. *Очистка і активність СОД з печінки свині.*

Висолювання проводили через кожні 10% насичення. Концентрація білка і активність СОД у фракціях представлені у табл. 2. Було показано, що у вихідному супернатанті активність СОД складала 258 Од/мг, а у фракції 90-100% 1240 Од/мг. У фракціях 0-60% супероксиддисмутазна активність була дуже низькою. Тому для подальшого дослідження була вибрана фракція 90-100%. Дану фракцію було поділено ще на три фракції: 90-95%, 95-100%, >100%. Найбільшу активність СОД було отримано у фракції 95-100% (табл. 2), де вона становила в середньому 475 Од/мг білка. Дана активність СОД в цій фракції перевищує її активність в контролі приблизно в 3 рази.

Таблиця 2. Характеристика СОД з печінки свині.

№ досліду	Фракція, %	Конц. білка, мг/мл	Заг. білок, мг	Активність, од/мг білка
1	**2**	**3**	**4**	**5**
1	вихідний супернатант	26,8	222	258
	0-20	25,9	218	74,8
	20-30	17,3	215	30,8
	30-40	16,2	179	36,0
	40-50	11,1	156	30,1
	50-60	11,0	142	129
	60-70	7,8	112	292
	70-80	1,52	28,6	418
	80-90	1,43	27,4	516
	90-100	1,24	22,3	1240

1	2	3	4	5
2	вихідний супернатант	4,93	49,3	101
	90-95	0,45	3,6	256
	95-100	0,42	3,36	516
	>100	0,2	1,14	122
3	вихідний супернатант	20,9	209	97,6
	95-100	0,39	3,9	233
4	вихідний супернатант	15,2	50,6	120
	95-100	1,65	7,9	329

На рис.1 представлена типова крива інгібування швидкості окислення кверцетину СОД з печінки свині. K_{50} в даному випадку дорівнювало 1,68 мкл супернатанту, а активність СОД 611 Од/мг білка.

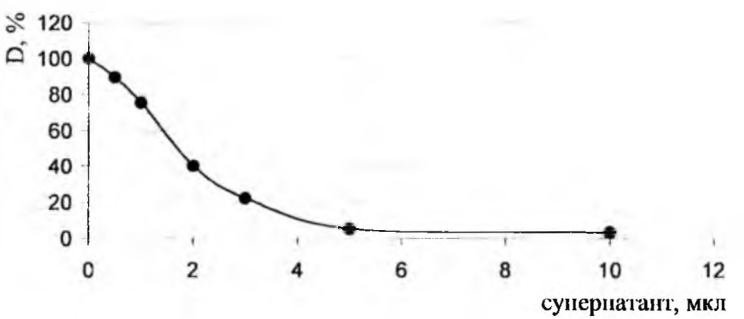
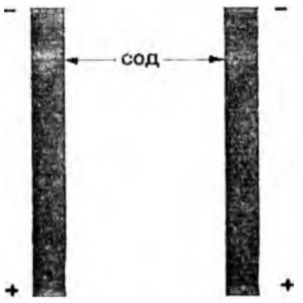


Рис. 1. Графік типового інгібування швидкості окислення кверцетину СОД з печінки свині (фракція 95-100%).

II. *Електрофорез.*

Наступним етапом роботи було дослідження препаратів СОД на наявність ізоформ ферменту. Використовували метод електрофорезу в поліакриламідному гелі на пластинці. Було зроблено шість повторів. На рис.2 показано форез у двох пробах: в контролі (А) і у фракції 95-100% (Б), Rf 0,22. На всіх гелях отримали одну смугу СОД-активності, що може свідчити про те, що тут наявна одна ізоформа СОД або дуже близько розташовані смуги.



А **Б**

Рис. 2. Фарбування гелів на СОД-активність: А – в контролі; Б – у фракції 95-100%.

III. *Вплив температури на активність СОД.*

Препарат фракції 95-100% нагрівали протягом 3 год при t°–45°С. Для розрахунків специфічної активності СОД у кожній часовій точці разом з визначенням активності ферменту визначали концентрацію білка, оскільки при нагріванні відбувається його денатурація, і концентрація його зменшується в порівнянні з вихідним препаратом.

На рис.3 показано сумарну криву із двох повторів зміни активності СОД при нагріванні протягом 3 год. Протягом перших 10 хв нагрівання активність ферменту падає на 20%, але починаючи з 25 хв нагрівання, активність даного ферменту відновлюється і зростає. Максимальне збільшення активності СОД (приблизно на 50%) спостерігали через 60-90 хв нагрівання. Після того активність СОД почала поступово зменшуватись, і через 3 год активність СОД становила 79% від контролю.

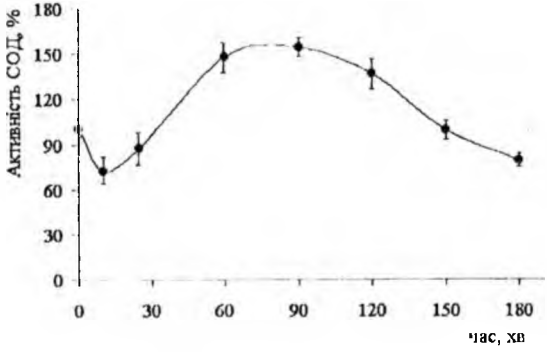


Рис. 3. Вплив нагрівання (45°С) на активність СОД з печінки свині (n = 2).

IV. *Обговорення отриманих результатів.*

У результаті досліджень було отримано напівочищений препарат СОД. Найбільшу її активність було отримано у фракції 95-100%, де вона в середньому склала 475 Од/мг білка. Брюс Фрімен та колеги [15] знайшли найбільшу активність Mn-СОД (3200 Од/мг білка) з *E. coli* у фракції 65-80%, а Р. Йозтюрк-Юрек і Л. Таран [14] найбільшу активність Cu,Zn-СОД з печінки курей (470 Од/мл) у фракції 45-50%.

Ми отримали одну смугу СОД-активності на поліакриламідних гелях. Можна припустити, що саме в цій фракції знаходиться одна ізоформа СОД, хоча можливо, що ізоформи СОД дуже близько розташовані одна відносно іншої і можуть зливатись.

СОД є досить термостабільним ферментом. Цікаво, що при нагріванні препарату при 45°С протягом 1 год збільшувалась її активність на 50% (мал.3) при тому, що відбувалась денатурація білка. Р.Йозтюрк-Юрек і Л.Таран вивчали вплив різної температури (45-75°С) на активність Cu,Zn-СОД з печінки курей. Препарати піддавались нагріванню протягом 1 год. За даними цих авторів, при t°=75°С активність ферменту становила 66% від її активності при t°=45°С [14].

Автор висловлює подяку науковому керівнику – кандидату біологічних наук, доценту Багнюковій Т.В.

1. Гольдштейн Н. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды // Биохимия. – 2002. – Т.67. – №2. – С. 592-609.
2. Фридович И. Свободные радикалы в биологии. – М.: Мир. – 1979. – С. 372.
3. Лущак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия. – 2001. – Т.66. – №5. – С. 592-609.
4. Калуев А.В. Выполняют ли регуляторную роль в клетке взаимодействия АФК с ДНК? // Укр.Біох. Журн. – 1999. – Т.71. – №2. – С. 104-108.
5. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. – 2002. – Т.67. – №3. – С. 339-353.
6. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой чувствительный способ определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. Мед. Химии. – 1990. – №2. – С. 88-91.
7. Avery S.V., Malkapuram S., Mateus C., Babb K.S. Cu/Zn-superoxide dismutase is required for oxytetracycline resistande of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol – 2000. – V.182. – P.76-80.
8. Bagnyukova T.V., Storey K.B., Lushchak V.I. Induction of oxidative stress in Rana ridibunda during recovery from winter hibernation // J. Therm. Biol – 2002. – V.28. – P.21-28.
9. Bradford M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V.72. – P.248-254.
10. Corson L.B., Folmer J., Strain J.J., Culotta V.C., Cleveland D.M. Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* lacking Cu,Zn-superoxide dismutase // J. Biol. Chem. – 1999. – V.274. – P.27590-27596.
11. Culotta V.C., Joh H.D., Lin S.J., Slekar K.H., Strain J. A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering // J. Biol. Chem. – 1995. – V.270. – P.29991-29997.
12. Davies K.J.A. Oxidative stress: the paradox of life // Biochem. Soc. Symp. – 1995. – V.61 P.1-31.

13. Lushchak V.I., Lushchak L.P., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // Am J. Physiol. – 2001. – P.100-107
14. Raziye Öztürk-Urek, Leman Tarhan. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver // Comp. Biochem. Physiol. – 2001. – V.12. – P.205-212.
15. Daniel Hernandez-Saavedra, Laura Castro, Bruce A. Freeman, Rafael Radi, Joe M. McCord. Reaction of Peroxynitrite with Mn-Superoxide Dismutase // The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V.276. №15. – P.11631-11638.

Purification of the enzyme was running by the method with $(NH_4)_2SO_4$, separation by electrophoresis.

The greatest activity of SOD was in the faction 95-100%. This enzyme has one isoform in this faction. SOD from pig liver is thermostable. Activity of this enzyme increased for 50% during sample heating at 45°C for 1 h.

Тарас Максимчук, Любов Максимчук

ВПЛИВ ДЕФІЦИТУ МІКРОНУТРІЄНТІВ НА ПСИХОМОТОРНИЙ І ПІЗНАВАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ДІТЕЙ

Вступ

Кожний народ повноцінно живе і успішно розвивається тільки у разі повного забезпечення умов для росту і всебічного розвитку свого майбутнього – підростаючого покоління. У процесі росту та розвитку на організм дитини постійно впливають якісні та кількісні зміни навколишнього середовища. Внаслідок функціональної незрілості ЦНС та деяких інших органів і систем, високої напруженості обмінних процесів організм дитини швидко реагує на нестачу або надмірну кількість у харчуванні тих чи інших нутрієнтів, на негативні чинники зовнішнього середовища зміною найважливіших функцій: порушенням фізичного і відставанням розумового розвитку, послабленням природного і набутого імунітету, розвитком хронічних захворювань [9].

Надзвичайно поширеними у світі є дефіцити мікронутрієнтів, зокрема деяких мікроелементів та вітамінів. Відомо, що вони зумовлюють розвиток відповідних гіпомікроелементозних та гіповітамінозних станів [9]. У цій статті аналізується вплив дефіциту мікронутрієнтів на психомоторний і пізнавальний (когнітивний) розвиток дітей. Для оцінки нервово-психічного розвитку дітей використовують тестові завдання, а також методи, що ґрунтуються на показниках розвитку [3; 9]. Рівень психічного розвитку кількісно оцінюють як "IQ – коефіцієнт інтелекту" або "QD – коефіцієнт розвитку". За ступенем тяжкості відставання у розумовому розвитку класифікують на легке (IQ від 50-55 до 70), помірне (IQ від 35-40 до 50-55), тяжке (IQ від 20-25 до35-40), дуже глибоке (IQ менше, ніж 20-25). Іноді виокремлюють п'яту підгрупу – пограничний рівень інтелекту (IQ в межах від 71 до 84).

© Т.Максимчук, Л.Максимчук