

АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ І ГЛУТАТІОН-ПЕРОКСИДАЗИ В РІЗНИХ ОРГАНАХ І КРОВІ КОРІВ

Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів, В. В. Влізло

Інститут біології тварин УААН

Наведені результати досліджень активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази в тканині довгастому мозку, селезінці, слизовій тонкого кишечника та в цільній крові корів. Встановлено, що активність антиоксидантних ферментів у досліджуваних органах проявляє тканинну специфічність і є значно вищою ніж у цільній крові корів. Найвища активність супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази виявлена в тканині довгастого мозку. Встановлено, що у цільній крові корів і у тканинах досліджуваних органів активність супероксиддисмутази позитивно корелює ($r=+0,57$) з активністю глутатіонпероксидази. При електрофорезі в 10 % поліакріламідному гелі та специфічному фарбуванні пластин нітросинім тетразолієм виявлено дві ізоформи СОД в тканині довгастого мозку і селезінці та три у слизовій тонкого кишечника.

Ключові слова: КОРОВИ, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, ІЗОФОРМИ, ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПРІОН

В останні роки в дослідях на лабораторній тваринах встановлено зв'язок між експресією фізіологічного пріона (PrP^c) і клітинною резистентністю до окислювального стресу [1]. Це зумовлено тим, що фізіологічні пріони володіють супероксиддисмутазою активністю, а також беруть участь в транспорті міді [2–4], а мідь, як відомо, необхідна для активації Cu, Zn–СОД [5], ключового антиоксидантного фермента. Виявлена залежність активності мідь–цинк–вмісної супероксиддисмутази (Cu, Zn–СОД) від рівня PrP^c [1]. Метою роботи було дослідження активності антиоксидантних ферментів в довгастому мозку, селезінці, слизовій кишечнику та крові корів і ізоформ супероксиддисмутази.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на коровах чорно–рябої породи, віком 7–8 років. Від корів перед забоем одержували кров, а після забою довгастий мозок, селезінку, слизову кишечнику. Тканини гомогенізували в гомогенізаторі Поттера при температурі 4 °С в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, рН 7,4 (500 мг тканини на 3 мл буфера) при 6000 об.хв протягом 5 хв. Гомогенат центрифугували 15 хв при 8000 об.хв. Супернатант відбирали і визначали вміст білка [6], активність СОД [7] і глутатіонпероксидази (ГПО) [8]. З крові готували гемолізати (розведення 1:10), в яких визначали вміст гемоглобіну [9] і активність СОД і ГПО. Ізоформи супероксиддисмутази виявляли після електрофорезу у 10 % поліакріламідному гелі (ПААГ). Гомогенат тканин розводили 1:1 у 40 % сахарозі. У лунки концентруючого гелю вносили 0,05 мл проби (концентрація білка 50–100 мкг).

Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом Beauchamp і Fridovich [10] в нашій модифікації: після електрофорезу ПААГ занурювали в розчин, що містив 1,23 мМ НСТ в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, рН 7,8, на 15 хв в темноті при кімнатній температурі і тричі промивали дистильованою водою. Потім заливали інкубаційним середовищем, що містило — 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавін в 0,15 М Na/K фосфатному буфері, рН 7,8. Інкубували в темноті протягом 20 хв. Після інкубації пластини промивали і освітлювали ультрафіолетовою лампою 7 хв для генерації супероксиданіонрадикалів рибофлавіном. У результаті фотохімічної реакції відновлення нітросинього тетразолія до нітроформазана супероксидними аніонрадикалами пластини набували темно–фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися

прозорими внаслідок дисмутації супероксиданіонрадикалів супероксиддисмутазою до кисню і перекису водню.

Результати і обговорення

Встановлено, що активність ферментів в досліджуваних тканинах корів значно відрізняється між собою (табл.).

Таблиця

Активність ферментів антиоксидантної системи в пріонреплікуючих органах і в крові корів ($M \pm m$, $n=7-9$)

Тканини	мозок	селезінка	слизова кишкового	цільна кров
СОД, % блокування реакції / 1 мг білка (в тканинах) / 1 мг Нв (в крові) $\times 10^3$	92,7 \pm 8,3	35,1 \pm 3,43**	35,9 \pm 0,86**	2,4 \pm 0,14***
ГПО, мкМоль / хв*1г білка (в тканинах) / 1г Нв (в крові)	682,7 \pm 21,40	559,8 \pm 29,16**	608,5 \pm 27,19**	304,5 \pm 3,37***

Примітки: 1)** — $p < 0,01$; 2)*** — $p < 0,001$, порівняно з активністю ферменту в мозку.

Так, активність СОД у мозку корів є вищою, порівняно з селезінкою ($p < 0,01$) і слизовою оболонкою кишечника ($p < 0,01$) в 2,6 раз, а з цільною кров'ю корів — у 38 раз ($p < 0,001$).

Ці різниці можна пояснити функціональними особливостями досліджених органів, зокрема висока активність СОД в мозку пояснюється тим, що його тканина характеризується значною оксигенацією, а в процесі передачі нервових імпульсів відбувається значна генерація супероксиданіонрадикалів [11]. Крім цього, у мозку виявлена значна кількість пріонів [12], білків, які здатні забезпечувати активність СОД [1–3].

Селезінка видаляє з кровообігу еритроцити і лейкоцити, що втратили функціональну активність. Вона також є пріонреплікуючим органом [12] і виявляє високу супероксиддисмутазну активність (у 14 разів вища ніж у цільній крові). Аналогічно можна сказати і про слизову оболонку кишечника, в епітеліальних клітках якого відбуваються процеси всмоктування, у тому числі і металів змінної валентності, таких як мідь і залізо [13].

Аналіз одержаних результатів свідчить, що супероксиддисмутазна активність в досліджених тканинах корів позитивно корелює ($r = +0,57$) з активністю глутатіонпероксидази. Зокрема, активність ГПО у мозку вища на 21 % ($p < 0,01$), ніж у селезінці, на 12 % ($p < 0,01$), порівняно зі слизовою оболонкою кишечника і у 2 рази порівняно з цільною кров'ю корів. Глутатіонпероксидаза каталізує розщеплення перекису водню [14] який є продуктом реакції дисмутації супероксидного аніонрадикала. Накопичення H_2O_2 може привести до інактивації СОД (інгібування по типу зворотного зв'язку) [15].

Відомо, що супероксиддисмутаза існує в декількох ізоформах: цитозольна Cu, Zn-вмісна, мітохондріальна Mn-вмісна і високомолекулярна позаклітинна. Їх вміст і активність в різних тканинах значно відрізняються [16]. Специфічним фарбуванням пластин гелю, після електрофорезу в 10 % ПААГ виявлено ізоформи СОД в досліджуваних тканинах (рис. 1).



Рис. 1. Ізоформи СОД (електрофорез в 10 % ПААГ; фарбування нітросинім тетразолієм): 1 трек — альбумін сироватки крові бика (білок-маркер); 2–8 треки — гомогенат тканини довгастого мозку; 9–11 треки — гомогенат тканини селезінки; 12 трек — гомогенат тканини слизової кишки; а), б), в) — не зафарбовані смуги — місця локалізації ізоформ супероксиддисмутази.

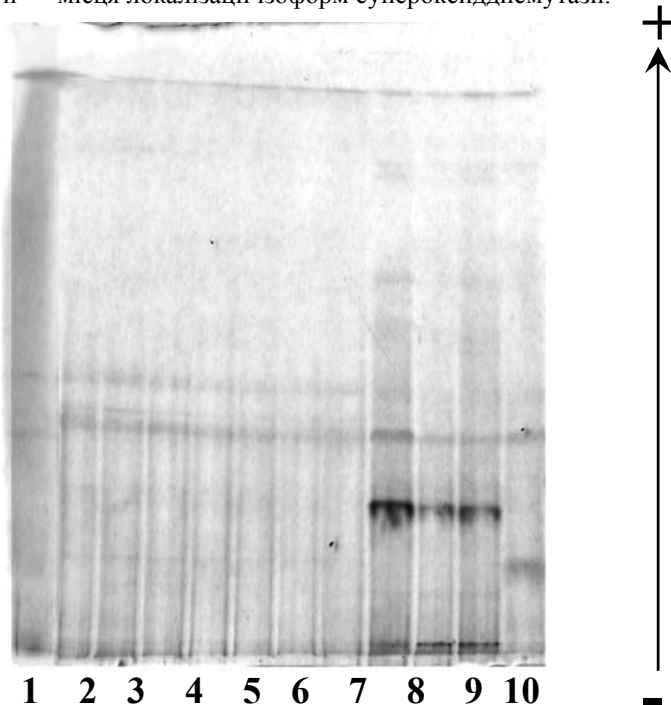


Рис. 2. Білки тканин (електрофорез в 10% ПААГ; фарбування Кумасі R250): 1 трек — альбумін сироватки крові бика; 2–8 треки — гомогенат тканини довгастого мозку; 9–11 треки — гомогенат тканини селезінки; 12 трек — гомогенат тканини слизової кишки.

На наявність білка СОД вказують не зафарбовані плями — місця, де відбулася дисмутація супероксиданіонрадикалів до кисню і перекису водню, і внаслідок чого відновлення нітросинього тетразолію до нітроформаза було відсутнє. На всіх представлених треках білків є одна прозора широка смуга (а), вище якої розташована менш виражена смуга (б), крім того на треку електрофорезу тканини слизової оболонки кишечника виявляється ще одна смуга (в). На першому треку альбуміну сироватки крові бика (білок-маркер) не зафарбовані смуги відсутні. Реакція відновлення нітросинього тетразолію супероксидними аніонрадикалами є дуже специфічною і чутливою, що дозволяє виявити не тільки ізоформи супероксиддисмутази, але й за яскравістю плями судити про їх активності. Тобто визначати внесок кожного ізофермента в сумарну активність СОД. Про чутливість і специфічність цього методу свідчить фарбування гелів на виявлення білкових фракцій (рис. 2). На рисунку видно, що місця локалізації проявлених білкових фракцій не співпадають з місцями локалізації ізоформ СОД.

Висновки

1. Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази проявляє тканинну специфічність. В довгастому мозку, селезінці і слизова кишкового тракту активність антиоксидантних ферментів є значно вищою, порівняно з цільною кров'ю.

2. У крові і досліджуваних органах активність супероксиддисмутази корелює ($r=+0,57$) з активністю глутатіонпероксидази.

3. При електрофорезі в 10 % поліакриламідному гелі та фарбуванні пластин нітросинім тетразолієм виявлено дві ізоформи СОД в тканині довгастого мозку і селезінці та три у слизовій кишечника.

N. V. Kuzmina, D. D. Ostapiv, V. V. Vlizlo

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN DIFFERENT ORGANS AND A BLOOD OF COWS

S u m m a r y

Results of researches of activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in tissues of myelencephalon, a lien, mucous a thin intestine and in an integral blood of cows are presented. It is established, that activity of antioxidative enzymes in investigated organs manifests histic specificity and considerably above, than in an integral blood of cows. The highest activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase is taped in a tissue of myelencephalon. It is established, that in an integral blood of cows and in tissues of investigated organs activity of superoxide dismutase positively correlates ($r = + 0,57$) with activity glutathione peroxidase. At an electrophoresis in 10 % polyacrylamide gel and specific a staining of plates nitro blue tetrazolium two isoformes of superoxide dismutase in a tissue of myelencephalon and a lien and three in mucous a thin intestine are detected.

H. B. Кузьмина, Д. Д. Остапів, В. В. Влизло

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ И КРОВИ КОРОВ

А н н о т а ц и я

Представлены результаты исследований активности супероксиддисмутази и глутатионпероксидази в тканях продолговатого мозга, селезенке, слизистой тонкого кишечника и в цельной крови коров. Установлено, что активность антиоксидантных ферментов в исследуемых органах проявляет тканевую специфичность и значительно выше, чем в цельной крови коров. Наивысшая активность супероксиддисмутази и глутатионпероксидази выявлена в ткани продолговатого мозга. Установлено, что в цельной крови коров и в тканях исследованных органов активность супероксиддисмутази положительно коррелирует ($r=+0,57$) с активностью глутатионпероксидази. При электрофорезе в 10 % полиакриламидном геле и окрашивание пластин нитросиним тетразолием обнаружены две изоформы супероксиддисмутази в ткани продолговатого мозга и селезенке и три в слизистой тонкого кишечника.

1. *Brown D.* Prion protein expression and superoxide dismutase activity [Text] / Brown D., Besinger A. // Biochem. J. — 1998. — Vol. 334. — P. 423–429.

2. *Anthony P.* Copper Binding to the Octarepeats of the Prion Protein [Text] / Anthony P., Viles G., Viles J. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 6795–6802.

3. *Solassol J.* A Novel Copper—Hydrogen Peroxide Formulation for Prion [Text] / Solassol J., Pastore M., Crozet C. et al. // The Journal of Infectious Diseases. — 2006. — Vol. 194. — P. 865—869.

4. *Rachidi W.* Prion Infection Impairs Copper Binding of Cultured Cells [text] / Rachidi W., Mange A., Senator A. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 14595–14598.

5. *Jensen L.* Activation of CuZn Superoxide Dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS [Text] / Jensen L., Culotta V. // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 41373–41379.

6. *Lowry O.H.* Protein measurement with Folin phenol reagent [Text] / Lowry O. N., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — №1. — P. 265–275.
7. *Чевари С. Н.* Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте [Текст] / Чвари С. Н., Андял Т. А., Штрэнгер Я. И. // Лаб. дело. — 1991. — №10. — С. 9–13.
8. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах [Текст] // Лаб. дело. — 1986. — №12. — С. 724–727.
9. *Drabkin D. L.* Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin [Text] / Drabkin, D. L., Austin J. H. // J. Biol. Chem. — 1935. — Vol. 112. — P. 51–88.
10. *Beauchamp C.* Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [Text] / Beauchamp C., Fridovich I. // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 44. — P. 276–287.
11. *Weisiger R.* Superoxide Dismutase. Organelle specificity [Text] / Weisiger R., Fridovich I. // The J. of Biol. Chem. — 1973. — Vol. 248, № 10. — P. 3582–3592.
12. *Lasmzas C. I.* Putative functions of PrPc [Text] // British Medical Bulletin. — 2003. — Vol. 66. — P. 61–70.
13. *Pena M. M.* Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper. Uptake and Distribution [Text] / Pena M. M., Lee J. I., Thiele D. J. // J. Nutr. — 1999. — Vol. 129. — P. 1251–1260.
14. *Chut F.* Expression, Characterization, and Tissue Distribution of a New Cellular Selenium-dependent Glutathione Peroxidase, GSHPx-GI [Text] / Chut F., Doroshov J., Esworthy R. // Biochem. and Molec. Biol. — 1993. — Vol. 268, №. 4. — P. 2571–2576.
15. *Rotilio G.* Interplay of Cu, Zn superoxide dismutase and nitric oxide synthase in neurodegenerative processes [Text] / Rotilio G., Aquilano K., Ciriolo M. // Life. — 2008. — Vol. 55. — P. 629–634.
16. *Laran T.* Activation of Cu, Zn superoxide dismutases from caenorhabditis elegans does not require the copper chaperone CCS [Text] / Laran T., Culotta J., Culotta V. // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 41373–41379.