

А. А. ШАЛДЖЯН, С. Г. ШАРОЯН, Р. М. НАЛБАНДЯН,
академик АН АрмССР Г. Х. БУНЯТЯН

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА ИЗ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Супероксиддисмутаза (СОД) — металлсодержащий фермент, широко распространенный в аэробных организмах. Его вероятная функция состоит в защите клеток от повреждения реакционноспособными анион-радикалами кислорода (супероксидными анионами) $\dot{O}_2^-$, которые генерируются в ходе терминальных окислительных процессов (¹, ²). Высокий уровень СОД обнаружен в эритроцитах, печени, почках, надпочечниках и мозге человека (³). Очищенные препараты СОД получены из эритроцитов, а также из растворимой фракции мозга и печени человека (⁴, ⁵). Фермент из растворимой фракции мозга имеет молекулярный вес около 32 000 и содержит на одну молекулу два атома меди и два атома цинка.

Ранее был описан медьсодержащий белок из мозга быка — цереброкупреин (⁶). Свойства этого белка аналогичны свойствам медьсодержащих белков из мозга, печени, эритроцитов человека (⁷), которые обладают СОД-активностью.

Так как нервная ткань характеризуется сильной гетерогенностью свойств и свойства СОД из мозга быка менее изучены, в данной работе сообщается об очистке и некоторых свойствах СОД из коры головного мозга быка.

Белок получали из ацетонового порошка коры головного мозга, экстрагируя его 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,4, из расчета 15 мл буфера на 1 г порошка. Суспензию после гомогенизации в гомогенизаторе Поттера перемешивали в течение 16 час. Прозрачная надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования гомогената в течение 80 мин. при 60 000 g, служила исходным экстрактом для получения СОД. Из этого экстракта белок можно получить двумя методами.

Метод 1. К экстракту добавляли полтора объема охлажденного ацетона, образовавшийся белковый осадок суспендировали в небольшом количестве 0,0025 М фосфатного буфера, рН 7,4. Нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием. После освобождения от ацетона диализом раствор наносили на колонку с целлюлозой ДЕ-32, уравновешенную 0,0025 М фосфатным буфером, рН 7,4. Колонку промывали исходным буфером и белок элюировали 0,2 М буфером. Анионообменную хроматографию далее повторяли дважды, причем на последней стадии положение белка в колонке стало более отчетливым (по его характерной зеленой окраске).

Альтернативный метод очистки основан на использовании смеси хлороформ — этанол и приводит к осаждению и денатурации большинства загрязняющих белков.

Метод 2. Охлажденную смесь хлороформа (0,15 объема) и этанола (0,25 объема) прибавляли к 1 объему раствора, полученного после растворения ацетонового осадка в буфере. Для разделения водной и органической фазы использовали $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, как описано в работе (⁸), и белок из водной фазы осаждали ацетоном. После растворения белка в 0,0025 М фосфатном буфере, рН 7,4, и удаления ацетона диализом СОД очищали хроматографией на целлюлозе ДЕ-32 (элюция 0,01 М буфером) и гель-фильтрацией на сефадексе G-75.

Оба метода приводят к получению белка с аналогичными свойствами и с одинаковым выходом (15–20 мг белка на 1 кг сырого веса коры). СОД из мозга получается в электрофоретически гомогенном состоянии. Аналогичной процедурой не удалось обнаружить заметные количества СОД в белом веществе мозга.

О высокой ферментативной активности полученных препаратов свидетельствуют данные рис. 1, на котором представлена зависимость про-

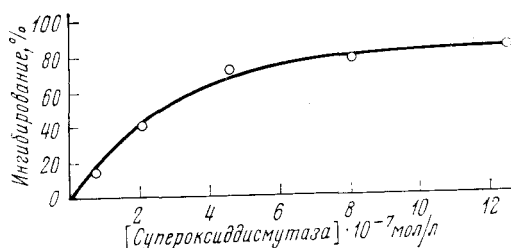


Рис. 1

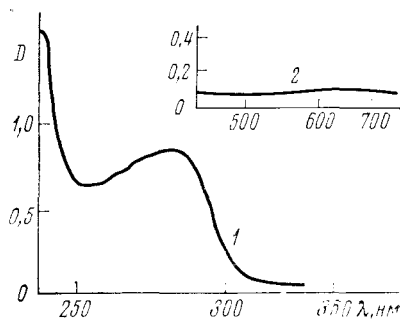


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость процента ингибирования реакции автоокисления 10^{-3} М адреналина при pH 10,2 от концентрации СОД

Рис. 2. Оптический спектр поглощения СОД. 1 — у-ф. область, 2 — видимая область

цента ингибирования реакции автоокисления адреналина от концентрации СОД. Как видно, 50% ингибирование достигается при концентрации фермента $3 \cdot 10^{-7}$ мол/л.

Оптический спектр СОД приведен на рис. 2. Отношение интенсивностей основных полос при 280 и 640 нм составляет примерно 40,0. В от-

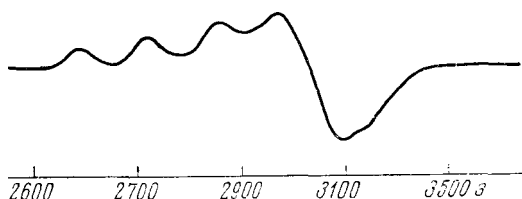


Рис. 3. Спектр э.п.р. СОД из мозга быка

личие от СОД из мозга быка, СОД из мозга человека имеет основной максимум поглощения в видимой области при 675 нм ⁽⁵⁾, а СОД из эритроцитов быка — при 680 нм ⁽⁹⁾. В у-ф. спектрах СОД из различных тканей обнаруживается тонкая структура за счет фенилаланиновых остатков ⁽⁹⁾. Однако максимум поглощения СОД из эритроцитов быка расположен при 260 нм, тогда как у белка из мозга он находится при 280 нм.

Спектр э.п.р. СОД из мозга быка приведен на рис. 3. Константа расщепления в низких полях составляет 140 э. В спектре видна также суперсверхтонкая структура за счет ядер азота с расщеплением между компонентами около 15 э. Сигнал имеет ромбическую форму с экспериментальными g -факторами $g_{\parallel}=2,27$ и $g_{\perp}=2,08$. Наличие суперсверхтонкой структуры в СОД из мозга непосредственно указывает, что атомы меди связаны с атомами азота боковых групп аминокислот белка. Аналогичная суперсверхтонкая структура наблюдается также в СОД из других тканей ⁽¹⁰⁾. Это, вероятно, указывает на то, что активные центры медьсодержащих

СОД имеют сходное строение. Однако отмеченные здесь различия в оптических свойствах СОД из мозга быка с ферментом из эритроцитов и печени могут означать, что в активных центрах медьсодержащих СОД из разных тканей имеются некоторые различия. Таким образом, речь может идти об изоферментах, отличающихся по аминокислотному составу вблизи от активного центра или непосредственно в активном центре.

Институт биохимии
Академии наук АрмССР
Ереван

Поступило
25 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ I. Fridovich, Accounts of Chem. Res., v. 5, 321 (1972). ² J. M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem., v. 244, 6049 (1969). ³ J. W. Hartz, S. Funakochi, H. F. Deutsch, Clin. chim. acta, v. 46, 125 (1973). ⁴ J. W. Hartz, H. F. Deutsch, J. Biol. Chem., v. 244, 4565 (1969). ⁵ R. J. Carrico, H. F. Deutsch, J. Biol. Chem., v. 244, 6087 (1969). ⁶ H. Porter, J. Folch, J. Neurochem., v. 1, 260 (1957). ⁷ H. Porter, In: The Biochemistry of Copper, N. Y., 1966, p. 159. ⁸ M. Tsuchihashi, Biochem. Zs., v. 140, 65 (1923). ⁹ J. Bannister, W. Bannister, E. Wood, Europ. J. Biochem., v. 18, 178 (1971). ¹⁰ М. А. Симосян, Р. М. Налбандян, Биохимия, т. 40, № 4 (1975).