

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

СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА ИЗ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА

Известно, что по способности поглощать кислород серое вещество головного мозга более чем в 10 раз превосходит белое вещество (¹). В соответствии с этим фактом обнаружено, что интенсивность окислительно-восстановительных процессов и содержание электронных переносчиков в сером веществе значительно выше, чем в белом (^{2, 3}). Например, недавно показано, что содержание цитохрома с в сером веществе более чем на два порядка превосходит его содержание в белом (⁴). Эти данные свидетельствуют о высоком уровне терминальных окислительно-восстановительных процессов в сером веществе головного мозга по сравнению с белым.

В терминальных окислительных процессах, протекающих по одноэлектронному механизму, наблюдается образование весьма реакционноспособной полувосстановленной формы кислорода, анион-радикала $O_2^{\cdot-}$ (^{5, 6}). Аэробные организмы защищены от повреждающего действия $O_2^{\cdot-}$ радикала ферментом супероксиддисмутазой (СОД), под действием которого анион-радикал превращается в H_2O_2 и O_2 (^{6, 7}).

Медьсодержащая СОД из цельного мозга была описана в ряде работ (^{8, 9}). Результаты, полученные нами недавно (¹⁰), показали, что СОД, выделенная из серого вещества мозга, по своим свойствам аналогична ферменту из цельного мозга. В настоящей работе сообщается о получении высокоочищенной СОД из белого вещества больших полушарий мозга быка и описываются некоторые ее свойства.

Для экстракции СОД использовали порошок, полученный трехкратной обработкой белого вещества охлажденным до -20° ацетоном и последующей двукратной обработкой диэтиловым эфиром. Экстракцию проводили 0,01 М ацетатным буфером, pH 6,0, из расчета 1600 мл буфера на 100 г порошка. Суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера и перемешивали в течение 5 час. на магнитной мешалке при 4° . Надосадочный раствор, полученный при центрифугировании суспензии при 6000 g, вводили в колонку с ДЭ-32-целлюлозой, уравновешенной 0,01 М ацетатным буфером. Анализ СОД-активности, выполненный по методу, основанному на ингибировании ферментом реакции восстановления соли тетразолия анион-радикалами $O_2^{\cdot-}$ (¹¹), показал, что при этих условиях фермент лишь незначительно адсорбируется на колонке и большая часть активности обнаруживается в эффлюенте. К раствору, вышедшему из колонки, добавляли полтора объема охлажденного ацетона, образовавшийся осадок суспендировали в 0,0025 М фосфатном буфере, pH 7,4. Нерастворившуюся

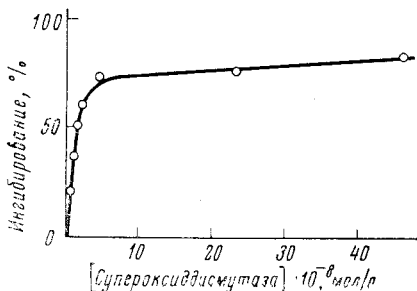


Рис. 1. Зависимость процента ингибирования реакции восстановления хлористого *n*-нитротетразолия от концентрации СОД. Скорость восстановления нитротетразолия прослеживалась при комнатной температуре в пирофосфатном буфере, pH 8,3, по поглощению при 490 nm

часть удаляли центрифугированием и надосадочный раствор после диализа вводили во вторую колонку с ДЭ-52-целлюлозой, уравновешенной этим же буфером. Промывание колонки буферами возрастающей концентрации показало, что СОД элюируется уже 0,005 *М* буфером. Фракции, обладающие активностью, объединяли и подвергали термообработке при 65° в течение 5 мин., удаляя образовавшийся при этом осадок центрифугированием. Прозрачный зеленоватый раствор после разбавления водой вводили в колонку с ДЭ-52-целлюлозой для концентрирования белка. Полученный зеленый элюат очищали далее гель-фильтрацией на сефадексе

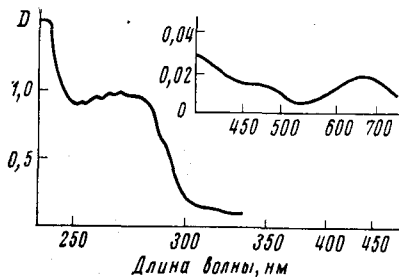


Рис. 2

Рис. 2. Спектр поглощения СОД в у.-ф. и видимой области при комнатной температуре в 1-сантиметровой кювете

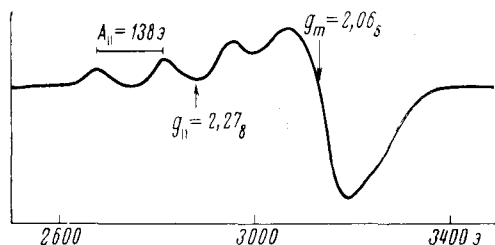


Рис. 3

Рис. 3. Спектр э.п.р. СОД. Запись производилась при частоте 9,12 ГГц, температуре 77° К, СВЧ-мощности 10 мвт, амплитуде модуляции 6 э. На рисунке указаны значения g -факторов и $A_{||}$

G-50 (тонкий), и белок окончательно концентрировали на небольшой колонке с ДЭ-52-целлюлозой.

Описанный метод позволяет получить 15–20 мг СОД из 1 кг сырого веса белого вещества мозга. На рис. 1 приведена зависимость процента ингибирования реакции восстановления тетразолия анион-радикалами кислорода от концентрации СОД из белого вещества. Как видно, 50-процентное ингибирование этой реакции достигается при концентрации белка $1,5 \cdot 10^{-8}$ *М*. Эти данные свидетельствуют о высокой активности полученного препарата.

Подобно СОД из других животных тканей, фермент из белого вещества мозга имеет молекулярный вес около 30 000 и содержит два атома меди на молекулу. Оптические спектры и спектры э.п.р. СОД из белого вещества оказались аналогичными спектрам СОД из серого вещества ⁽¹⁰⁾ (рис. 2, 3). Наличие в спектре э.п.р. суперсверхтонкой структуры за счет атомов азота свидетельствует о связи меди в белке с азотсодержащими боковыми группами аминокислот. Аналогично медьсодержащей СОД из эритроцитов ⁽¹²⁾ медь фермента из белого вещества обнаруживает способность к «самовосстановлению» при высокой температуре. Таким образом, фермент из белого вещества мозга является типичной тканевой медьсодержащей СОД ⁽⁵⁾.

Заслуживает внимания тот факт, что содержание СОД на 1 кг сырого веса белого и серого вещества одинаково. СОД из белого и серого вещества не отличаются и по своей активности. Наличие высокой СОД-активности в белом веществе мозга, для которого характерен более низкий уровень окислительно-восстановительных процессов, чем для серого вещества, поднимает вопрос о физиологической роли СОД в белом веществе. Для выяснения этой роли требуются дальнейшие исследования. В связи с этим необходимо прежде всего выяснить локализацию СОД в белом веществе, особенно в аксонах и глиальных клетках.

Институт биохимии
Академии наук АрмССР
Ереван

Поступило
5 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ H. Hyden, P. W. Lange, Acta physiol. scand., v. 64, 6 (1965).
- ² H. H. Hess, A. Pope, J. Neurochem., v. 5, 207 (1960).
- ³ R. L. Friede, Topographic Brain Chemistry, N. Y., 1966.
- ⁴ С. Г. Шароян, А. А. Шалджян и др., В сб.: Вопр. биохимии мозга, т. 10, Ереван, 1975.
- ⁵ I. Fridovich, In: Molecular Mechanism of Oxygen Activation, N. Y., 1974, p. 453.
- ⁶ J. M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem., v. 244, 6049 (1969).
- ⁷ I. Fridovich, Accounts of Chem. Res., v. 5, 321 (1972).
- ⁸ H. Porter, J. Folch, J. Neurochem., v. 1, 260 (1957).
- ⁹ R. J. Carrico, H. F. Deutsch, J. Biol. Chem., v. 244, 6087 (1969).
- ¹⁰ А. А. Шалджян, С. Г. Шароян и др., ДАН, т. 222, № 5, 1239 (1975).
- ¹¹ M. Nishikimi, N. A. Rao, K. Jagi, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 46, 849 (1972).
- ¹² М. А. Симонян, Р. М. Налбандян, Биохимия, т. 40, 726 (1975).