

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЛОШАДИ

Лукашевич В.С., Никандров В.Н.

*Институт физиологии Национальной Академии Наук
Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь*

В настоящее время выявлена связь между многими заболеваниями и процессами свободно-радикального окисления [1]. Вышедшие из-под контроля антиоксидантной защиты процессы свободно-радикального окисления могут являться причиной многих заболеваний: воспалительные процессы, гипоксические и реперфузионные повреждения тканей, бронхолегочные заболевания, старение, канцерогенез и др. [2].

Показано, что супероксидный радикал и происходящие от него гидроксильный радикал и синглетный кислород являются теми формами кислорода, избыток которых отрицательно сказывается на многих биологических процессах, протекающих в клетках. Это – перекисное окисление липидов, вызывающее изменение проницаемости мембран; окисление SH-групп белков, приводящее к их деструкции; повреждение ДНК, отражающееся на наследственном аппарате клетки; препятствие действию витаминов, гормонов, лекарств путем образования с ними реактивных комплексов [3]. Супероксиддисмутаза (СОД, $O_2^{\cdot-}$ - $O_2^{\cdot-}$ оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1.), катализирующая реакцию дисмутации супероксидного радикала в перекись водорода, играет, таким образом, важную роль в защитной системе клетки против разрушительного действия активных форм кислорода и совместно с каталазой и глутатионпероксидазой регулирует свободнорадикальные процессы клеточного метаболизма.

Научный и практический интерес к СОД привел к развитию технологий по получению фермента из животного и растительного сырья и микроорганизмов, в том числе и генно-инженерным путем, стимулировал расширение исследований, касающихся изучения свойств СОД из различных источников, выявления новых сфер медицинского применения, создания иммобилизованных форм СОД, стабильных в кровотоке. Результатом этих усилий стало производство за рубежом ряда медицинских препаратов на основе СОД, например, препарата «Пероксинорм» ("Grumenthal", Германия), применяемого в качестве противовоспалительного средства для лечения артритов различной этиологии; российского препарата - «Эрисод», оказывающего терапевтический эффект при кератоконъюнктивитах герпетической этиологии. В Беларуси лекарственные препараты на основе СОД не производятся.

В настоящее время коммерчески доступными являются СОД из эритроцитов человека и быка. Однако эти источники получения фермента предполагают освобождение и/или тестирование препарата на известные вирусные контаминации. Использование эритроцитов лошади в качестве источника получения фермента позволяет минимизировать эти ограничения. Однако метод препаративного получения СОД из эритроцитов лошади не разработан и ее свойства недостаточно изучены.

Целью настоящей работы явилась разработка метода получения отечественной СОД из эритроцитов лошади, пригодной в качестве субстанции для последующего создания лекарственной формы офтальмологического, противовоспалительного и др. назначения. В задачу исследования также входило изучение физико-химических свойств СОД и взаимодействия с некоторыми регуляторными белками.

Получение СОД из эритроцитов лошади.

Основываясь на проведенном анализе литературных данных по методам получения СОД из различных источников, мы выбрали оптимальную, по нашему мнению, последовательность операций, позволившую получить хроматографически гомогенный белок.

Эритроцитарную массу получали на минском мясокомбинате в замороженном состоянии и хранили при -20°C до использования. После оттаивания надосадочную жидкость аккуратно сливали, добавляли кристаллический дигидрофосфат калия из расчета 300 мг на мл и смешивали с равным объемом смеси спирт/хлороформ в соотношении 5:3. Смесь энергично встряхивали 20 мин на холоду и центрифугировали при 3 тыс. об/мин в течение 20 мин (4°C). К надосадочной жидкости, которая должна быть прозрачной с желтовато-голубым оттенком, добавляли 0,6 объема охлажденного до -20°C ацетона, перемешивали 10 мин и центрифугировали 20 мин при 3000 тыс. об/мин (4°C). Полученный осадок отделяли от надосадочной жидкости, растворяли в 0,06 М фосфатном буфере (рН 7,4), подвергали термической обработке (80°C) в течение 5 мин для осаждения балластных белков, охлаждали и центрифугировали 20 мин при 12 тыс. об/мин (4°C) для отделения СОД, находящейся в супернатанте.

Супернатант диализировали против бидистиллированной воды с использованием диализной мембраны Visking ("Serva", Германия) в течение ночи. При этом образовывалась взвесь, которую отделяли центрифугированием (3 тыс. об/мин, 10 мин), и диализ продолжали против 0,03М фосфатного буфера, рН 7,4. Диализат концентрировали с помощью ультрафильтрации на фильтре PM10 ("Amicon", Голландия) до 20-30 мл.

Полученную субстанцию подвергали хроматографии на колонке (2,6x20 см), заполненной DE-целлюлозой Fast flow ("Sigma", США), уравновешенную 0,03 М фосфатным буфером, рН 7,4. Фракцию, не связавшуюся с целлюлозой, концентрировали ультрафильтрацией, как описано выше, до 10 мл.

Концентрат наносили на колонку K16 ("Pharmacia", Швеция) 1,6x80 см, заполненную Тоурpearle HW55 ("Toysoda", Япония) и отмытую 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,5М NaCl, предварительно добавив в пробу 300 мг хлористого натрия и 500 мг сахарозы. Хроматографию проводили при скорости элюции 10 мл/час, собирая фракции по 5мл. Отобранный 2-й пик (см. Рис. 1) концентрировали, как описано выше, и рехроматографировали в тех же условиях (см. Рис. 2).

Суммарно предложенная схема получения СОД из эритроцитов лошади представлена в таблице 1.

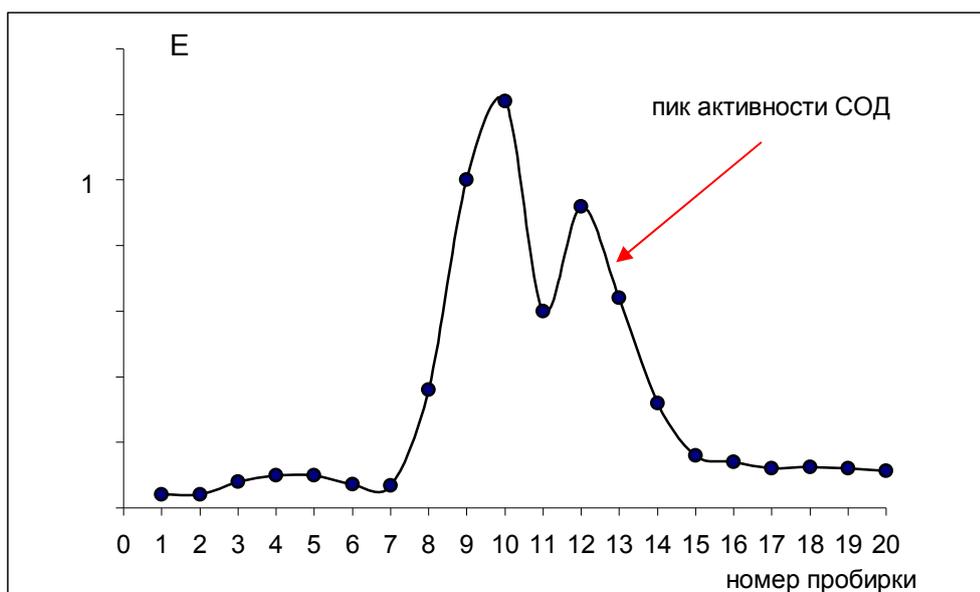


Рисунок 1 - Профиль элюции при хроматографии концентрата DE фракции

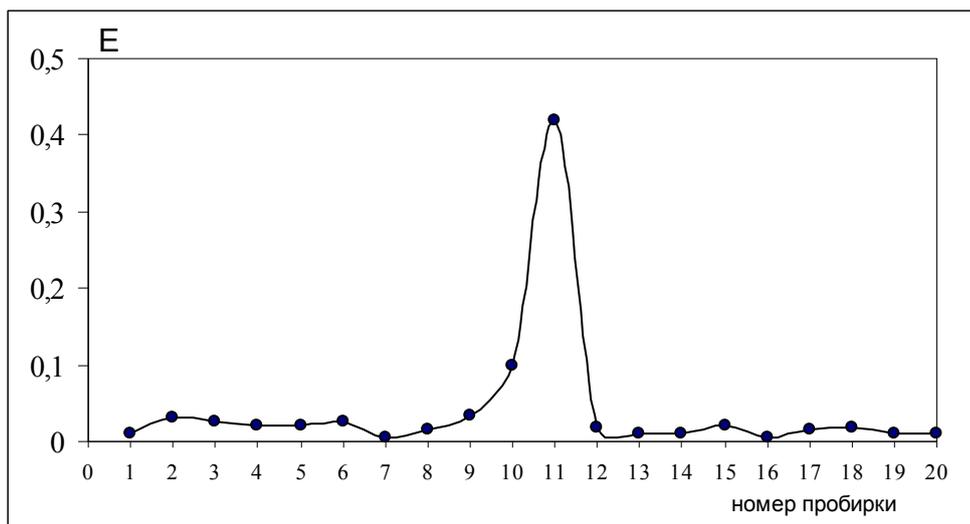


Рисунок 2 - Профиль элюции при рехроматографии СОД.

Таблица 1. Схема получения СОД из эритроцитов лошади.

Стадии очистки	Объем (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Общий белок (мг)	Общая активность (ед.)	Удельная активность (ед/мг)
1. Эритроцитарная масса	600	375	225.000	180.000	0,8
2. Экстрагирование смесью спирт/хлороформ	410	17,5	7.175	82.000	11,4
3. Растворенный ацетоновый осадок	75	79,5	5.962,5	75.000	12,6
4. Термообработка	50	22,5	1.125	40.000	35,6
5. Диализ против фосфатного буфера	90	8,4	756	36.000	42,2
6. Концентрирование на РМ-10	23	23,7	545	23.000	47,6
7. ДЕ-хроматография	50	2,7	135	20.000	148,1
8. Гель-фильтрация на Toyopearl HW 55	10	3,2	32	10.000	312,5
9. Рехроматография на Toyopearl HW55	10	0,3	3	2.000	666,6

Очевидна высокая эффективность экстракции СОД смесью спирт/хлороформ при которой достигается 10-кратное увеличение удельной активности.

Термообработка показала 6-кратную очистку по общему белку, при потере почти половины общей активности и при возрастании удельной - в 3 раза (увеличение времени экспозиции до 10 мин приводила к потере 80% активности). По

всей видимости, термообработка, которая используется при получении СОД из эритроцитов быка и человека, все-таки инактивирует значительную часть активности СОД. Возможно, здесь имеет место видовая специфичность по этому параметру.

К сожалению, стадии концентрирования на фильтре РМ10 перед ДЕ-хроматографией и гель-фильтрацией привели к значительным потерям общей активности. По всей видимости, на этих стадиях целесообразно применять фильтры с меньшим размером пор (например, УМ2), хотя именно фильтр РМ10 показывает наибольшую, по отношению к другим, скорость концентрирования.

При ДЕ-хроматографии была достигнута 4-х кратная очистка, как по белку, так и по увеличению удельной активности.

Две последовательных стадии гель-фильтрации при значительных потерях общей активности по указанным выше причинам позволили повысить удельную активность в 6 раз.

Таким образом, по приведенной выше схеме, используя на заключительных этапах очистку по заряду и молекулярной массе, нам удалось получить хроматографически гомогенный белок.

Физико-химические свойства СОД из эритроцитов лошади.

Определение молекулярной массы.

Для определения ММ использовали метод гель-фильтрации. Хроматографию проводили на колонке К16 (1,6x80см), заполненную Toypearle HW55 ("Toysoda", Япония) и отмытую 0,1 М фосфатным буфером, рН 7.4, содержащим 0,5 М NaCl. В качестве маркеров на колонку наносили бычий сывороточный альбумин (67 кДа), химотрипсиноген (25 кДа) и цитохром С (12,4 кДа) из набора для хроматографического определения молекулярных масс фирмы "Serva" (Германия). В пробы, растворенные в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7.4, перед нанесением вносили хлористый натрий (29.3 мг/мл) и сахарозу (50 мг/мл).

Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что ММ полученной СОД составляет $\cong 30$ кДа, что соответствует молекулярной массе Cu,Zn-супероксиддисмутазы других млекопитающих, но не микроорганизмов [4].

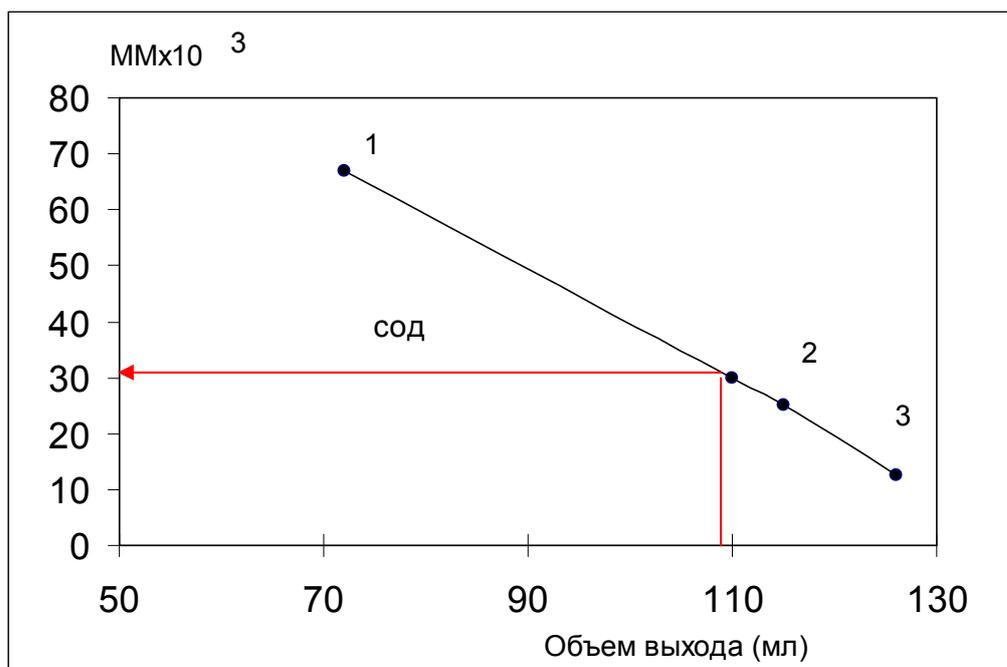


Рисунок 3 - Калибровочная кривая. 1 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа); 2 – химотрипсिनоген (25 кДа); 3 – цитохром С (12.4 кДа)

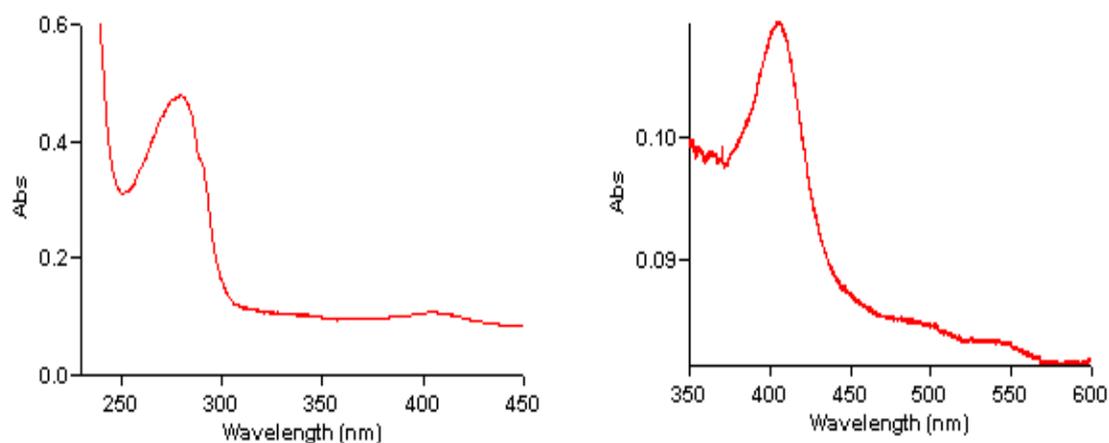


Рисунок 4 - Спектры поглощения СОД из эритроцитов лошади

Определение активности СОД.

Активность СОД определяли основываясь на общепринятом методе Никишими [5], не требующем труднодоступных химреактивов. Удельную активность выражали в условных единицах за мин на мг белка. Концентрацию белка определял по поглощению при 280 нм. Измерение кинетики поглощения при 560 нм измеряли на сканирующем спектрофотометре CARY 100 (Varian, США). За единицу активности принимали количество фермента, уменьшающего поглощение на 50%.

Активность СОД контролировали на всех основных этапах получения фермента (см. Табл. 1). В результате проведенных процедур удалось добиться более чем 700-кратной очистки белка и получить 3 мг СОД с удельной активностью 666,6 ед/мг.

Спектральная характеристика.

Спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области снимали на сканирующем спектрофотометре CARY 100 (Varian, США) по программе SKAN (рис. 4).

Относительно невысокая способность к поглощению света при длине волны 280 нм свидетельствует о малом количестве ароматических аминокислот, особенно триптофана. Большинство комплексных органических соединений с металлами дают две характерных полосы поглощения. В видимой области спектра наблюдается одна или более довольно разрешенных полос низкой интенсивности. Вторая полоса поглощения, значительно превосходящая первую, наблюдается в УФ-области [6]. Четко выраженный пик с экстремумом при 410 нм и два низкоинтенсивных пика в области 500 и 550 нм, по-видимому, отражают присутствие в молекуле белка комплексных участков, содержащих цинк и медь.

Таким образом, предложен способ получения СОД из эритроцитов лошади, основными этапами которого являются: экстракция смесью спирт/хлороформ, осаждение ацетоном, термообработка, ионообменная хроматография и гель-фильтрация. На последних этапах используются хроматографические носители с высокими разделительными характеристиками.

Достигнута более чем 700-кратная очистка. Получено 3 мг СОД с активностью 666 ед/мг белка.

ММ фермента составляет 30 кДа.

Спектральный анализ выявил две полосы поглощения, характерные для белков, имеющих в своем составе металлокомплексы.

Приведенные выше физико-химические характеристики супероксиддисмутазы из эритроцитов лошади показывают относительную схожесть с таковыми по сравнению с ферментами из эритроцитов быка и человека, что свидетельствует о межвидовой структурной консервативности данной молекулы и может быть использовано для определения подлинности фармацевтических препаратов, имеющих в своем составе СОД животного происхождения.

Работа поддержана грантом БФФИ №БО4-302.

Литература

1. Gutteridge, J. M. C. Free radicals in disease processes: a comparison of cause and consequence / J.M.C. Gutteridge // *Free Radic. Res. Commun.* – 1993. – V. 19. – P. 141-158.
2. Меньщикова Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // *Успехи совр. биологии* – 1993. – V. 113 – P. 442-455
3. Petkau, A. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutase /A. Petkau // *Cancer Treat. Rev.* – 1986. – V.13. – P. 17-44.
4. Казанина Г.А. Супероксиддисмутаза дрожжей: выделение и свойства /Казанина Г.А., Селезнева А.А.// *Прикл. биох. и микробиол.* – 1992. – Т.28. – С.165-169.
5. Nishikimi M. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate α molecular oxygen /M. Nishikimi , N.A. Rao, K.Yagi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1972. – V. 46. – P. 849-854.
6. Басоло Ф. Механизмы неорганических реакций (изучение комплексов металла в растворе) /Ф.Басоло , Р.Пирсон // М., Мир. – 1971. – С.592.