

УДК 577. 152. 121: 612. 014. 32

АКТИВНОСТЬ И ПОЛУЧЕНИЕ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

Диденко Н.В., Соловьева А.Г.

ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: natalika-nv@mail.ru

Термическая травма относится к числу патологических поражений, сопровождающихся увеличением свободных радикалов в организме, развитием тканевой гипоксии, изменением активности целого ряда антиоксидантных ферментов. Целью работы явилось изучение активности супероксиддисмутазы крыс с ожогом, а также получение частично очищенного препарата фермента из митохондрий печени интактных животных и крыс с термической травмой. В работе были использованы крысы самцы линии Wistar, содержащиеся на стандартном рационе вивария. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: контрольную (интактные животные) и опытную (животные с ожогом). Крысам опытной группы наносили ватно-спиртовой ожог. Митохондрии печени получали путем дифференциального центрифугирования. Частично очищенный препарат СОД выделяли с использованием высаливания и ионообменной хроматографии. Установлено, что активность супероксиддисмутазы в гомогенате и митохондриях печени крыс увеличивается при воздействии ожога (1, 3 и 7 сутки после поражения). Получены частично очищенные препараты митохондриальной супероксиддисмутазы из печени интактных и ожоговых крыс. При использовании ионообменной хроматографии было показано, что более быстрый выход СОД с колонки происходит у ожоговых животных (3 сутки) по сравнению с интактными. Можно предположить, что термическая травма приводит к изменению пространственной структуры фермента.

Ключевые слова: митохондриальная супероксиддисмутаза, термическая травма, токсемия, ионообменная хроматография, крысы

ACTIVITY AND PRODUCTION OF PARTLY PURIFIED PREPARATION OF MITOCHONDRIAL SUPEROXIDE DISMUTASE OF LIVER DURING THE EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

Didenko N.V., Soloveva A.G.

Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedic Russian Ministry of Health, Nizhny Novgorod, e-mail: natalika-nv@mail.ru

Thermal injury is one of the pathological lesions, accompanied by an increase in free radicals in the body, the development of tissues hypoxia, changes in the activity a series of antioxidant enzymes. The aim of the work was to study the activity of superoxide dismutase in rats with burns, as well as obtaining a partially purified enzyme preparation of liver mitochondria in intact animals and rats with thermal injury. In the work we used rats male Wistar, contained on a standard diet of vivarium. Experimental animals were divided into 2 groups: control (intact animals) and experimental (animal a burn). The rats of the experimental group was applied to cotton-alcohol burn. Liver mitochondria are prepared by means of differential centrifugation. Partially purified preparation of SOD was isolated using desalting and ion exchange chromatography. It was placed that activity of superoxide dismutase in the rat liver homogenate and mitochondria increases under the burn (1, 3 and 7 days after the trauma). Partially purified preparations of mitochondrial superoxide dismutase from liver of intact and burn rats was obtained. It was showed the faster output of SOD from the column occurs at animals with burns (3 days) during using ion exchange chromatography. It can be suggest that the thermal injury leads to a change of the spatial structure of the enzyme.

Keywords: mitochondrial superoxide dismutase, thermal trauma, toxemia, ion exchange chromatography, rats

Термическая травма относится к числу патологических поражений, сопровождающихся увеличением свободных радикалов в организме и развитием тканевой гипоксии, а также изменением активности целого ряда антиоксидантных ферментов, в том числе и супероксиддисмутазы (СОД) [9]. В условиях нормального обмена СОД поддерживает стационарную концентрацию супероксидных радикалов на определенном уровне, защищая тем самым клеточные структуры от их повреждающего действия. Однако в условиях патологического состояния организма, когда число свободных радикалов возрастает, нагрузка на данный фермент резко увеличивается, и данный

баланс может быть нарушен. Наиболее выраженное повышение супероксидных анионрадикалов характерно для клеток печени [8]. Поэтому исследование каталитических свойств митохондрий супероксиддисмутазы печени при термической травме является актуальным. Кроме того, изучение свойств очищенного препарата фермента позволит расширить представление о молекулярных механизмах действия термической травмы.

Целью работы явилось изучение активности супероксиддисмутазы крыс с термической травмой, а также получение частично очищенного препарата СОД из митохондрий печени интактных животных и крыс с ожогом.

Материал и методы исследования

В работе были использованы крысы самцы линии Wistar массой 180–230 г, содержащиеся на стандартном рационе вивария. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: контрольную (интактные животные) и опытную (животные с ожогом). Крысам опытной группы наносили ватно-спиртовой ожог пламенем на 10% поверхности спины, экспозицией 45 с [5]. Животных выводили из эксперимента на первые, третьи и седьмые сутки после травмы под эфирным наркозом. Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Частично очищенный препарат СОД получали с использованием высаливания и ионообменной хроматографии [2]. Активность фермента определяли по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [7].

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента [1].

Результаты исследования и их обсуждение

В клетках печени содержится две формы фермента: Mn-СОД (митохондриальная) и Cu/Zn-СОД (цитоплазматическая). Наибольшей антиоксидантной активностью обладает СОД из митохондрий гепатоцитов крыс. Определение активности фермента в этих компартментах клеток печени показало, что общая активность СОД в митохондриальной фракции выше активности супероксиддисмутазы в гомогенате в среднем в 1,46 раза (рис. 1), что соответствует литературным данным [4, 10].

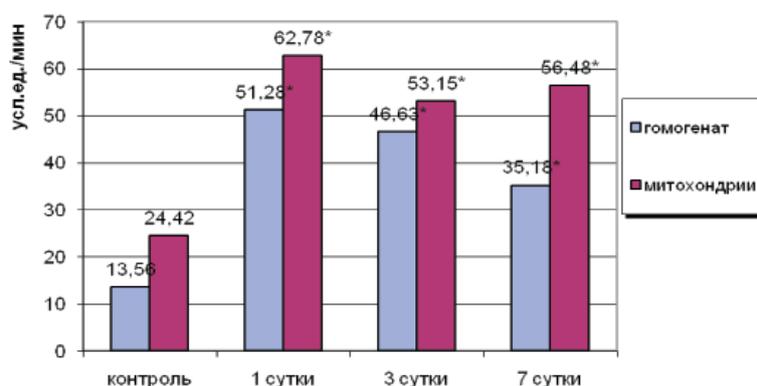


Рис. 1. Общая активность супероксиддисмутазы (усл.ед./мин) у интактных крыс и животных с термической травмой (1,3 и 7 сутки). Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$)

При термической травме во все сроки исследования отмечено существенное повышение активности СОД как в гомогенате, так и в митохондриях.

На 1 сутки после нанесения ожога развивается ожоговый шок, к эндогенным воспалительным медиаторам которого относят свободные радикалы кислорода. С увеличением активных форм кислорода в организме возрастает и активность супероксиддисмутазы. Как видно на рис. 1, общая активность СОД в гомогенате опытной группы (1 сутки) оказалась статистически значимо выше активности фермента интактной группы в 3,78 раза. В митохондриях общая активность супероксиддисмутазы опытных крыс в сравнении с интактными была статистически значимо выше в 2,57 раза.

Полученные результаты показали, что на 3 сутки после нанесения ожога общая активность СОД статистически значимо увеличилась по сравнению с контрольной группой: в гомогенате – в 3,44 раза, в митохондриях – в 2,18 раза. Третьи сутки после термической травмы соответствуют стадии

острой ожоговой токсемии, во время которой происходит дальнейшая активация перекисного окисления липидов, тем самым увеличивая нагрузку на антиоксидантную систему организма.

Согласно литературным данным, на 7 сутки после ожога наблюдается постепенное восстановление метаболизма обожженного животного и возвращение систем к исходному состоянию, что однако занимает очень длительное время [3].

Установлено, что улучшение состояния антиоксидантной системы можно оценить по общей активности супероксиддисмутазы. На 7 сутки после термической травмы активность фермента в гомогенате статистически значимо была ниже по сравнению с первыми и третьими сутками.

Термическая травма характеризуется усилением катаболических процессов, изменением биосинтеза белков и увеличением активности антиоксидантных ферментов. Основными путями изменения активности ферментов в клетке в ответ на различного рода воздействия являются либо увеличе-

ние или уменьшение их количества в клетке, либо конформационные перестройки, возникающие под влиянием внешних и внутренних действующих факторов. Известно, что пространственная структура белков, в частности, их поверхностный заряд, определяют поведение индивидуальных белков при использовании методов разделения [11].

Результаты выделения и частичной очистки митохондриальной супероксиддисмутазы из печени интактных крыс с использованием высаливания и ионообменной хроматографии представлены в таблице. Для получения частично очищен-

ного препарата СОД из опытной группы животных использовали крыс с термической травмой на 3 сутки после поражения. Выбор данного периода ожоговой болезни, острой ожоговой токсемии обусловлен нарастанием в это время активности перекисного окисления липидов, увеличением в печени синтеза церулоплазмينا, одного из главных антиоксидантов организма. На 3 сутки после термической травмы преобладает выраженная интоксикация вследствие влияния на организм токсичных продуктов, поступающих из пораженных тканей [6].

Результаты очистки препарата СОД из митохондрий печени крыс контрольной (интактные крысы) и опытной групп (3 сутки после ожога)

Стадии очистки	Объем, мл	Содержание белка, мг/мл		Удельная активность, усл. ед./мин·мг		Выход, %		Степень очистки	
		Интактные	3 сутки	Интактные	3 сутки	Интактные	3 сутки	Интактные	3 сутки
Гомогенат	20,00	9,63 ± 0,52	9,76 ± 1,50	1,40 ± 0,41	4,78* ± 0,42	100,00	100,00	1,00	1,00
Митохондрии	10,00	15,63 ± 0,58	10,34 ± 2,43	1,56 ± 0,62	5,14* ± 0,63	90,04	56,99	1,11	1,08
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	4,00	8,60 ± 0,18	7,53 ± 0,59	6,54 ± 0,69	8,67* ± 0,30	82,94	28,00	4,67	1,81
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	3,00	7,52 ± 0,32	7,24 ± 0,28	8,95 ± 0,51	11,35* ± 0,66	74,47	26,43	6,39	2,37

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Как видно из таблицы, использование фракционирования сульфатом аммония и анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе позволило получить митохондриальную супероксиддисмутазу со степенью очистки 6,39. Выход фермента составил 74,47%. Показано, что удельная активность частично очищенного препарата митохондриальной супероксиддисмутазы у интактных крыс в 6,4 раза выше, чем до очистки.

При выделении СОД из печени крыс с термической травмой (3 сутки после поражения) получены следующие результаты: степень очистки – 2,37, выход – 26,43%. Удельная активность частично очищенного препарата СОД на 3 сутки после ожога превышала активность фермента до очистки на 2,4 раза (таблица).

Таким образом, наибольшая степень очистки фермента была получена при выделении фермента из печени интактных животных (6,39) по сравнению с животными опытной группы (2,37).

На рис. 2 приведен профиль элюции митохондриальной супероксиддисмутазы интактных животных при использовании ионо-

обменной хроматографии. Анализ собранных фракций показал, что максимальное количество белка содержится с 5 по 9 фракцию. Наибольшее количество белка и пик активности приходятся на пробирку № 7.

Из рис. 3 профиля элюции митохондриальной супероксиддисмутазы животных с термической травмой (3 сутки) при использовании ионообменной хроматографии видно, что максимальное количество белка содержится с 4 по 7 фракцию. Наибольшее количество белка и пик активности приходится на пробирки № 4–5.

Известно, что пространственная структура белков, в частности, их поверхностный заряд, определяют поведение индивидуальных белков при использовании методов разделения.

Таким образом, установлено, что активность супероксиддисмутазы в гомогенате и митохондриях печени крыс увеличивается при воздействии ожога (1, 3 и 7 сутки после поражения). При получении частично очищенного препарата СОД выявлено, что у опытных животных максимальное количество белка и пик активности фермента смещается на более ранние фракции

(4–5) по сравнению с интактными крысами (7 фракция). Это может быть связано с тем, что воздействие термической травмы при-

водит к конформационным изменениям митохондриальной формы супероксиддисмутазы.

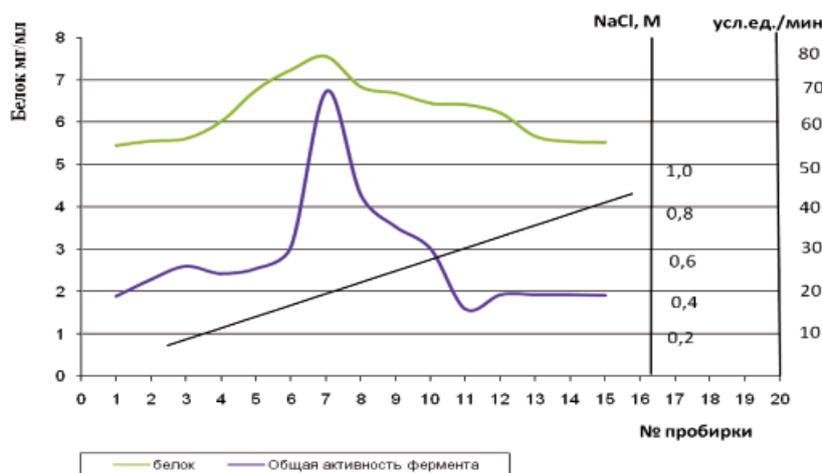


Рис. 2. Профиль элюции белков на ДЭАЭ-целлюлозе и общая активность митохондриальной супероксиддисмутазы (интактные животные)

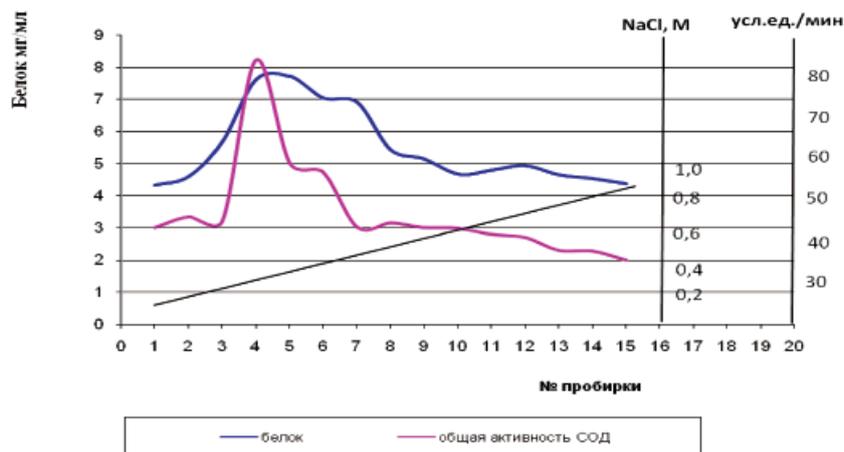


Рис. 3. Профиль элюции белков на ДЭАЭ-целлюлозе и общая активность митохондриальной супероксиддисмутазы (животные с термической травмой, 3 сутки)

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
2. Климова М.А., Епринцев А.Т. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств: учебно-методическое пособие для вузов (практикум). – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2008. – 36 с.
3. Литвицкий П.Ф. Патофизиология: т.1. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2003. – 752 с.
4. Меньщикова Е.Б., Шабалина И.Г. Генерация активированных кислородных метаболитов митохондриями преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 2. – С. 207–210.

5. Ожоговая аутоинтоксикация. Пути иммунологического преодоления / под ред. Н.А Федорова, Б.Е Мовшева, Р.В. Недошивиной, И.К. Коряжиной. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
6. Реммель Н.Н., Кратасюк В.А., Мазняк О.М. Биолуминесцентный контроль интенсивности патологических окислительных процессов в клетках перфузированной печени крыс после гипертермического воздействия // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т.135, № 1. – С. 52–54.
7. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т 45, № 3. – С. 109–116.
8. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы цитотоксического дей-

ствия гипоксии. Патогенез гипоксического некролиза // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 7. – С. 32–40.

9. Чурилова И.В., Зиновьев Е.В., Парамонов Б.А. Препарат эритроцитарной супероксиддисмутазы «Эрисод»: влияние на уровень обожженных в состоянии ожогового шока // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 11. – С. 528–531.

10. Cisnetti F., Lefevre A., Gillot R. A new pantadentate ligand forms both a di- and mononuclear Mn II complex: electrochemical, spectroscopic and superoxidismutase activity studies // European journal of inorganic chemistry. – 2007. – Vol. 2007, № 28. – P. 4472–4480.

11. Elchur S., Oberley T. D., Eisenstein R. S. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 367–380.

References

1. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika [Medical-biological statistic]. Moscow, Praktika, 1999. 459p.

2. Klimova M.A., Eprintsev A.T. Ochistka fermentov i metody issledovaniya ikh kataliticheskikh svoystv: uchebno-metodicheskoe posobie dlya vuzov (praktikum). [Cleaning enzymes and research methods their catalytic properties: teaching manual for higher educational institutions (practicum)]. Voronezh, Voronezh State University, 2008. 36 p.

3. Litvitskiy P.F. Patofiziologiya: tom 1. [Pathophysiology: vol.1]. Moscow, GEOTAR-media, 2003. 752 p.

4. Menschikova E.B., Shabalina I.G., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2002, Vol. 133, no 2, pp. 207–210.

5. Ozhogovaya autointoksikatsiya. Puti immunologicheskogo preodoleniya. (pod red. N.A. Fedorova, B.E. Movsheva, R.V. Nedoshivinnoy, I.K. Koryakinoy) [Burn autointoxication. Ways of overcoming immunological.]. Moscow, Medicine, 1985. 256 p.

6. Rimmel N.N., Kratasyuk V.A., Maznyak O.M., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2003, Vol. 135, no 1, pp. 52–54.

7. Sirota T.V., Topics in Medicinal Chemistry, 1999, Vol. 45, no 3, pp 109–116.

8. Chesnokova N.P., Ponukalina E.V., Bizenkova M.N., Modern high technologies, 2006, no 7, pp 32–40.

9. Churilova I.V., Zinovev E.V., Paramonov B.A., Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2002, Vol. 134, no. 11, pp 528–531.

10. Cisnetti F., Lefevre A., Gillot R., European journal of inorganic chemistry, 2007, Vol. 2007, no. 28, pp. 4472–4480.

11. Elchur S., Oberley T. D., Eisenstein R. S., Oncogene, 2005, Vol. 24, pp. 367–380.

Рецензенты:

Корягин А.С., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;

Крылов В.Н., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии человека и животных, ГОУ ВПО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 17.05.2013.