

Roman Gondko, Ludwik Biały, Maria Adamska

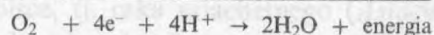
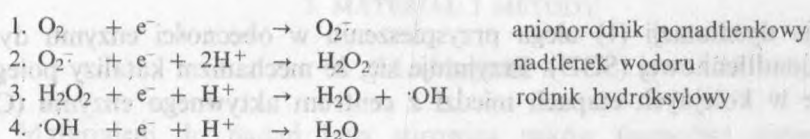
AKTYWNOŚĆ DYSMUTAZOWA HEMOLIMFY I HEMOCYJANINY RAKÓW

Hemolimfa raków: *Orconectes limosus*, *Astacus astacus* i *Astacus leptodactylus* posiadała wysoką aktywność dysmutazową wynoszącą 5,9, 6,2 i 3,5 odpowiednio w przeliczeniu na mg białka całkowitego. Po rozdziale elektroforetycznym białek hemolimfy raków nie stwierdzono obecności enzymu – SOD odpowiadającego wielkością dysmutazie wołowej. Właściwości dysmutazowe na żelu poliakryloamidowym wykazały frakcje hemocyjaninowe 16S i 24S.

Składniki hemocyjaniny 16S i 24S rozdzielone metodą chromatografii kolumnowej charakteryzowały się niższą aktywnością dysmutazową od hemolimfy w przeliczeniu na białko.

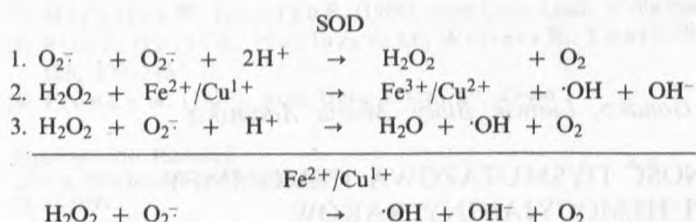
1. WSTĘP

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym dla organizmów aerobowych, jednakże podczas jego 4-etapowej redukcji powstają reaktywne formy wielce szkodliwe dla organizmu: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2).



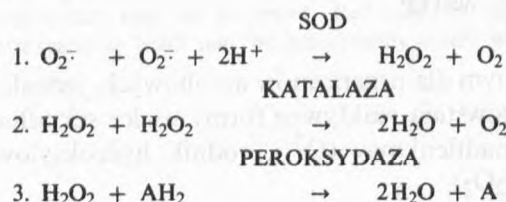
W układach biologicznych rodnik ponadtlenkowy jest końcowym lub pośrednim produktem wielu reakcji enzymatycznych (np. oksydaza ksantynowa: ksantyna). Powstaje on również w procesie radiolizy wody, zachodzącym pod wpływem promieniowania jonizującego. Ponadto anionorod-

nik ponadtlenkowy reaguje w reakcji „dysmutacji” tworząc nadtlenuk wodoru, który jest również niepożądanym produktem w organizmie, ponieważ w obecności metali w reakcji Fentona powstaje szkodliwy rodnik hydroksylowy.

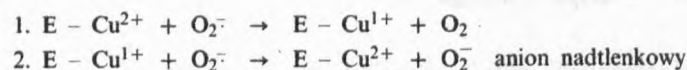


Uważa się, że to głównie rodnik hydroksylowy jest odpowiedzialny za toksyczne działanie produktów redukcji tlenu [2, 8]. Pozostaje poza dyskusją udział anionorodnika ponadtlenkowego w procesie karcenogenezy, mutagenezy i w wielu patologiach [8]. Aktywne formy tlenu ze względu na szkodliwe działanie nie mogą powstawać w komórkach w sposób niekontrolowany. W organizmie muszą więc istnieć czynniki eliminujące anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenuk wodoru. Dla obrony przed produktami redukcji tlenu komórki posiadają zestaw enzymów – metaloprotein: dysmutazę (SOD) i katalazę bądź peroksydazę.

Płyny pozakomórkowe praktycznie nie zawierają tych enzymów.

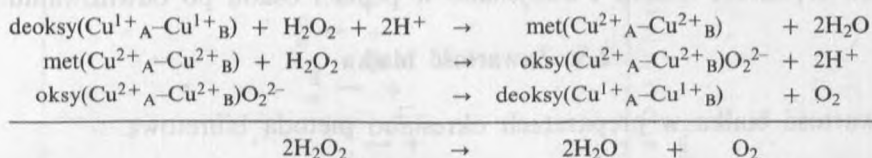


Reakcja dysmutacji (1) ulega przyspieszeniu w obecności enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Przyjmuje się, że mechanizm katalizy polega na udziale w kolejnych etapach miedzi z centrum aktywnego enzymu (Cu – Zn).



Okazało się jednak, że własności dysmutazowe, katalazowe czy peroksydatywne wykazują niektóre białka (np. ceruloplazmina), a także związki niskocząsteczkowe z miedzią ($\text{Cu His}_2 \text{H}^{3+}$) bądź sama miedź [4, 5, 12, 15, 17, 19]. Do białek posiadających własności katalazowe należą hemocyjaniny (Hc)

mięczaków, a własności tej nie wykazują hemocyjaniny stawonogów [4, 18]. Jest to fakt zaskakujący, bowiem podstawową funkcją hemocyjanin jest transport tlenu. Podczas inkubacji deoksyhemocyjaniny Mollusca z H_2O_2 dochodzi do generacji $oxyHc(Cu^{2+}_A-Cu^{2+}_B)O_2$ poprzez ciąg reakcji:



Inkubacja deoksy Hc Arthropoda prowadzi do szybkiego tworzenia met-Hc. Stwierdzono również u hemocyjanin własności peroksydazowe [7, 11, 14] oraz wykazano, że hemocyjaniny skorpionów i raków posiadają właściwości dysmutacji [16, 9]. W reakcji dysmutacji nietrwałość substratu sprawia, że określenie aktywności dysmutazowej jest możliwe tylko pośrednio, poprzez ustalenie tempa zmiatania $O_2^{\cdot -}$ w mieszaninie reakcyjnej. W następstwie usunięcia $O_2^{\cdot -}$ dochodzi do zahamowania głównej reakcji z udziałem $O_2^{\cdot -}$. Anionorodnik ponadtlenkowy można generować w reakcjach biochemicznych (oksydaza ksantynowa) bądź fotochemicznych (flawiny). Szereg związków (adrenochrom, błękit nitrotetrazoliowy – NBT) tylko w formie zredukowanej (np. po redukcji $O_2^{\cdot -}$) charakteryzuje się barwą, której natężenie można mierzyć spektrofotometrycznie. Dysmutaza (SOD), eliminując $O_2^{\cdot -}$ z mieszaniny hamuje tworzenie barwnych kompleksów bądź też znacznie obniża ich ilość. Tym samym na żelu poliakryloamidowym pasmo dysmutazy można łatwo zlokalizować na podstawie braku zabarwienia (jasna frakcja) przy zabarwionym tle.

Za 1 jednostkę aktywności dysmutazowej (1 U) przyjęto ilość enzymu, która w określonych warunkach hamuje daną reakcję w połowie (50%) [1].

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Materiał

Materiałem do badań była surowica raków (samców) występujących w Polsce, tj. raka szlachetnego (*Astacus astacus*), raka błotnego – (*Astacus leptodactylus*) i raka pręgowanego (*Orconectes limosus*) otrzymana po wykrzepieniu i odrzuceniu skrzepu.

2.2. Hemocyjanina i jej składniki

W hemolimfie (surowicy) raków hemocyjanina występuje głównie w postaci dwóch stanów agregacji: 16S (heksamer) i 24S (dodekamer). W niewiel-

kich ilościach obecny jest monomer-5S [14]. Obecne w surowicy lipoproteiny (karotenoproteiny) adsorbowano na złożu hydroksyapatytowym [3]. Osad Hc (mieszanina 16S i 24S + ślady innych białek) otrzymano po ultrawirowaniu eluentu. Składniki 16S i 24S rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej na złożu Sepharose CL-4B i otrzymano w postaci osadu po odwirowaniu.

2.3. Zawartość białka

Zawartość białka w preparatach określano metodą biuretową.

2.4. Określenie aktywności dysmutazowej (SOD)

Czynniki posiadające zdolność usuwania $O_2^{\cdot-}$ (np. utworzenie H_2O_2 na drodze dysmutacji) hamują tym samym tworzenie (redukcję) barwnych związków (np. błękitu nitrotetrazoliowego). Stopień inhibicji jest miarą aktywności dysmutazowej. Powszechnie w tym celu stosuje się mieszaninę: NBT + ksantyna + oksydaza ksantynowa, rejestrując absorbancje przy 540 nm co 1 min przez 15 min. [1].

2.5. Identyfikacja aktywności dysmutazowej na żelu poliakrylamidowym

Wykonano elektroforezę regularną na (5%) żelu poliakrylamidowym, stosując równocześnie barwienie na białko (a) i aktywność dysmutazową (b):

(a) białko wybarwiano barwnikiem Coomassie Brilliant Blue G-250,

(b) po rozdziale elektroforetycznym żele w ciemności zanurzano na 20 min w 0,245 mM roztworze NBT. Następnie również w ciemności umieszczano je w 36 mM buforze fosforanowo-potasowym o pH 7,8, zawierającym 28 mM TEMEDu oraz 28 mM ryboflawiny. Żele po wyjęciu naświetlano lampą UV, generując rodniki $O_2^{\cdot-}$. Białko o aktywności dysmutazowej uwidacznia się na żelu w postaci jasnego pasma.

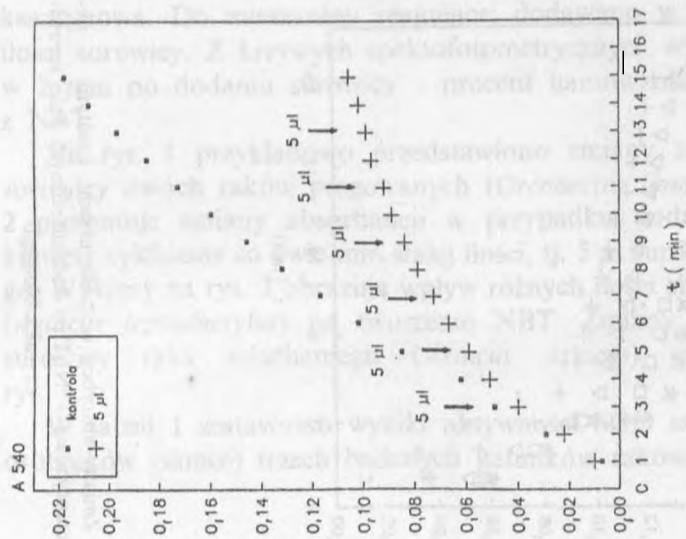
2.6. Densytometria

Otrzymane rozdziały na żelach densytometrowano za pomocą aparatu „DESAGA-050”.

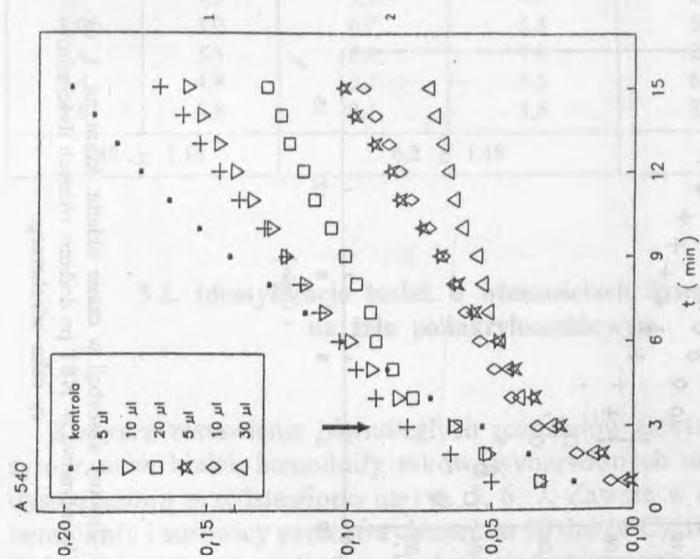
3. WYNIKI

3.1. Aktywność dysmutazowa białek surowicy raków

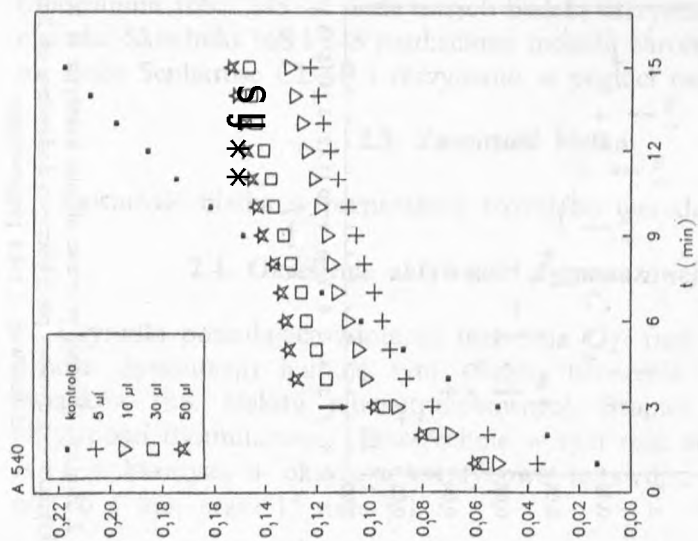
Pomiary wykonano przy 540 nm korzystając ze spektrofotometru SPE-CORD M-40 (Carl-Zeiss Jena) z automatycznym pomiarem absorbancji co



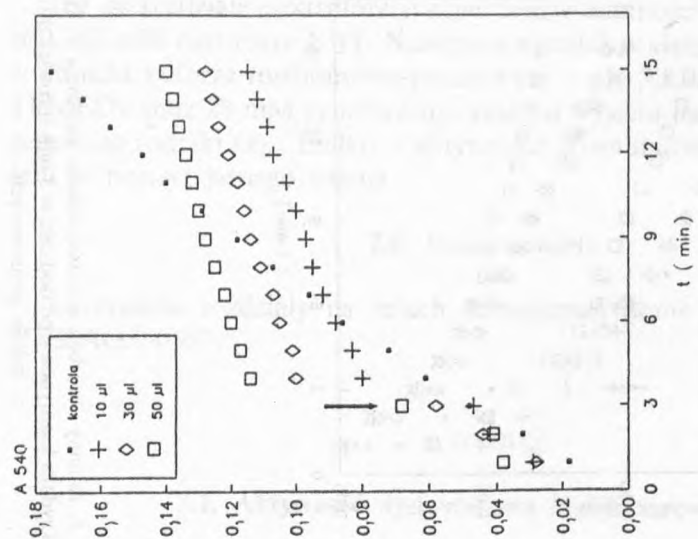
Rys. 2. Zmiany absorpcji w czasie układu: ksantyna + NBT + oksydaza ksantynowa po cyklicznym dodawaniu co 2 min 5 µl surowicy z raka przegowanego



Rys. 1. Zmiany absorpcji w czasie układu: ksantyna + NBT + oksydaza ksantynowa po dodaniu w 3 min surowicy dwóch raków przegowanych



Rys. 4. Zmiany absorbancji w czasie układu: ksantyna + oksydaza ksantynowa + NBT po dodaniu różnych ilości surowicy raka błotnego



Rys. 3. Zmiany absorbancji w czasie układu: ksantyna + oksydaza ksantynowa + NBT po dodaniu różnych ilości surowicy raka szlachetnego

2 min przez 15 min. Kontrolę stanowił układ: ksantyna + NBT + oksydaza ksantynowa. Do mieszaniny reagującej dodawano w 3 minucie określone ilości surowicy. Z krzywych spektrofotometrycznych wyliczono w 5 min, tj. w 2 min po dodaniu surowicy – procent hamowania tworzenia barwnika z NBT.

Na rys. 1 przykładowo przedstawiono zmiany absorpcji po dodaniu surowicy dwóch raków pręgowanych (*Orconectes limosus*). Wykres na rys. 2 prezentuje zmiany absorbancji w przypadku dodawania do tej samej kiuwety cyklicznie co dwie min stałej ilości, tj. 5 μ l surowicy raka pręgowanego. Wykresy na rys. 3 obrazują wpływ różnych ilości surowicy raka błotnego (*Astacus leptodactylus*) na tworzenie NBT. Zmiany wywołane dodaniem surowicy raka szlachetnego (*Astacus astacus*) uwidocznione są na rys. 4.

W tabeli 1 zestawiono wyniki aktywności SOD surowicy pojedynczych osobników (samce) trzech badanych gatunków raków.

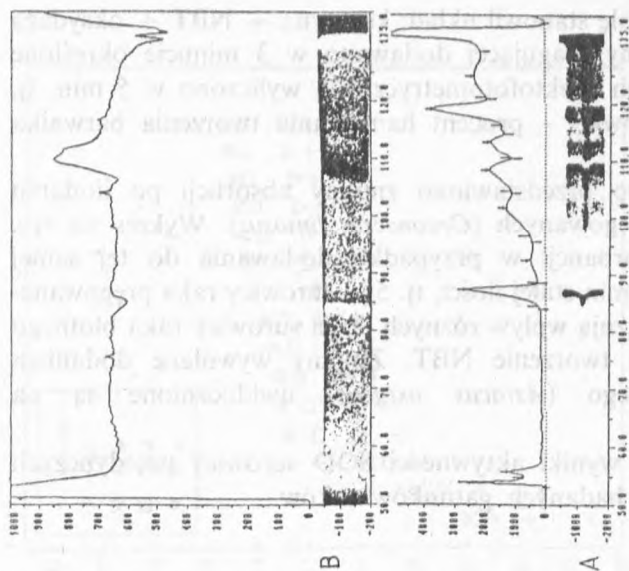
Tabela 1

Porównawcze zestawienie aktywności SOD/mg białka surowicy raków

Rak pręgowany		Rak szlachetny		Rak błotny	
6,7	3,5	5,9	4,5	3,7	2,5
8,0	3,0	6,7	5,8	5,5	5,1
7,4	3,5	8,4	7,4	2,4	2,1
9,4	4,9	5,2	5,5	6,3	2,4
5,6	6,8	7,1	5,5	2,8	2,6
5,88 $\pm$ 2,14		6,2 $\pm$ 1,18		3,55 $\pm$ 1,52	

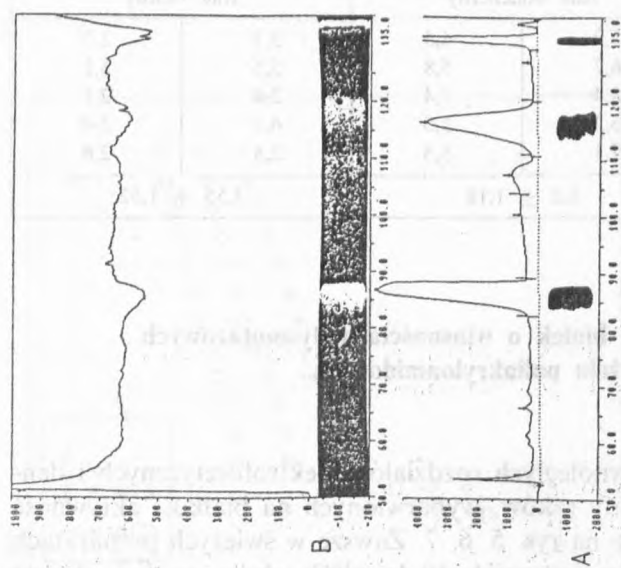
3.2. Identyfikacja białek o własnościach dysmutazowych na żelu poliakryloamidowym

Zbiorcze zestawienie równoległych rozdzielów elektroforetycznych i densytogramów białek hemolimfy raków, wybarwionych na białko i aktywność dysmutazową przedstawiono na rys. 5, 6, 7. Zawsze w świeżych preparatach hemolimfy i surowicy przechowywanej do 10 dni (4°C), obecne są dwie główne frakcje nie wybarwione (jasne). Frakcje nie wybarwione odpowiadają głównym składnikom hemocyjaniny raków: 16S i 24S. Względne aktywności dysmutazowe obu składników Hc ocenione na podstawie pól powierzchni densytogramu są prawie równe.



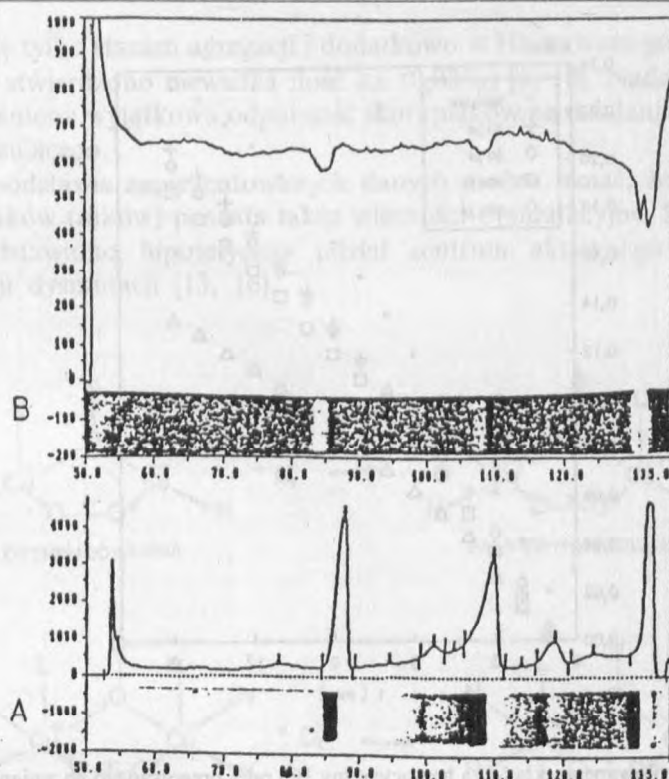
Rys. 6. Rozdziły elektroforetyczne białek surowicy raka błotnego (*Astacus leptodactylus*) i ich densytogramy

A – wybarwiony na obecność białka, B – wybarwiony na aktywność dysmutazową



Rys. 5. Rozdziły elektroforetyczne białek surowicy raka pręgwanego (*Orconectes limosus*) i ich densytogramy

A – wybarwiony na obecność białka, B – wybarwiony na aktywność dysmutazową



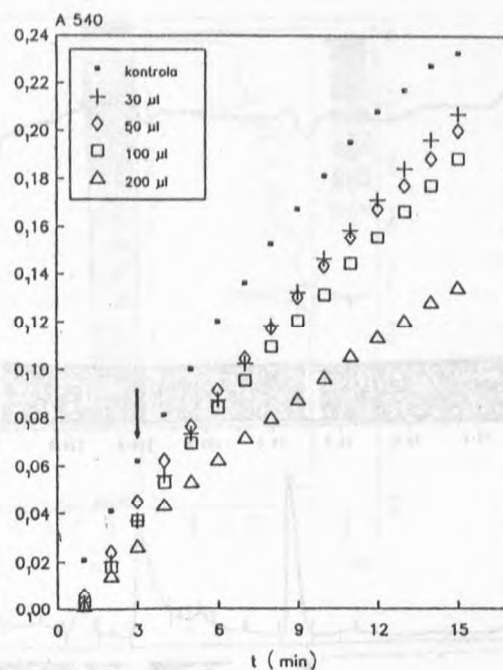
Rys. 7. Rozdziały elektroforetyczne białek surowicy raka szlachetnego (*Astacus astacus*) i ich densytogramy

A – wybarwiony na obecność białka, B – wybarwiony na aktywność dysmutazową

3.3. Aktywności SOD składników Hc

Dla otrzymania składników Hc łączono hemolimfę z 10–20 osobników. Metodą chromatografii kolumnowej otrzymano preparaty składników: 16S, 24S, których czystość i jednorodność sprawdzano elektroforetycznie. Dla otrzymanych składników określono spektrofotometrycznie aktywność dysmutazową. Zmiany pochłaniania w mieszaninie reakcyjnej pod wpływem składnika 16S raka pręgowanego przedstawiono na rys. 8.

W tabeli 2 zebrano otrzymane wartości dla trzech preparatów raka pręgowanego i błotnego. Składniki hemocyjaniny raka szlachetnego nie wykazały aktywności SOD.



Rys. 8. Wpływ wyizolowanego składnika hemocyjaniny 16S raka pręgowanego na zmiany w czasie absorpcji układu: ksantyna + oksydaza ksantynowa + NBT

Tabela 2

Aktywność SOD/mg białka

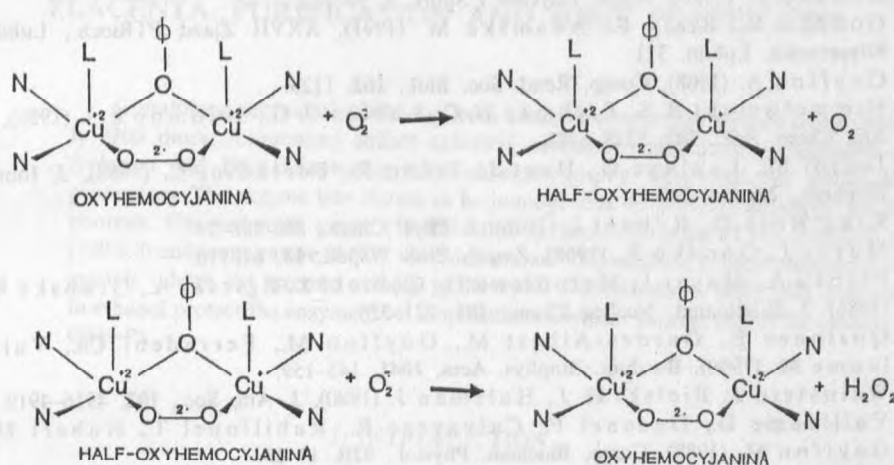
Rak pręgowany		Rak błotny	
16S	24S	16S	24S
0,32	0,14	0,09	0,05
0,71	0,32	0,12	0,09
0,53	0,21	0,21	0,12
0,52 ± 0,19	0,22 ± 0,09	0,16 ± 0,09	0,09 ± 0,0

4. DYSKUSJA

Tak przeciwstawne własności hemocyjanin, tzn.: z jednej strony rozkład H_2O_2 (Hc-Mollusca), z drugiej tworzenie H_2O_2 (Hc-Arthropoda), przy prawie identycznym centrum aktywnym są jak na razie niezrozumiałe. Białka te

różnią się tylko stanem agregacji i dodatkowo w Hc stawonogów obok miedzi (0,17%) stwierdzono niewielką ilość Zn (0,03%) [6, 10]. Nadal też pozostaje nie wyjaśniona wyjątkowa odporność skorupiaków na działanie promieniowania jonizującego.

Na podstawie zaprezentowanych danych można uznać, że hemocyjanina skorupiaków (raków) posiada także własności dysmutacyjne. Poniżej, na rys. 9, przedstawiono hipotetyczny udział centrum aktywnego hemocyjaniny w reakcji dysmutacji [13, 16].



Rys. 9. Hipotetyczny model oddziaływania centrum aktywnego hemocyjaniny z rodnikami ponadtlennymi [16]

W pierwszym etapie, jednoelektronowa redukcja przez anion ponadtlenny atomu Cu^{+2} w oksyhemocyjaninie prowadzi do utworzenia tzw. semioksyhemocyjaniny i cząsteczki tlenu. Natomiast w drugim etapie, utlenienie przez anion ponadtlenny semioksyhemocyjaniny do oksyhemocyjaniny z utworzeniem H_2O_2 . Radioochronne działanie polegające na zmiataniu krótkotrwałych pierwotnych produktów radiolizy wody (rodników) wymaga współdziałania dwóch enzymów: dysmutazy (SOD), która ochrania katalazę przed inaktywacją O_2^- oraz katalazy zapobiegającej inaktywacji dysmutazy przez H_2O_2 . Fakt, że hemocyjanina przejawia aż trzy (!) antyoksydacyjne aktywności szczególnie preferuje to białko w systemie obronnym. Hemocyjanina, podobnie jak enzymy metabolizmu tlenowego, tworzy pierwszą linię obrony komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Rozkłada zarówno O_2^- , jak i H_2O_2 zanim te pośrednie produkty w reakcji utworzą szkodliwy rodnik $\text{OH}\cdot$.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Beauchamp Ch., Fridovich J. (1971), *Analys. Biochem.*, **44**, 276–287.
- [2] Bekar D., Czapski G., Rabani J., Dorfman L. M., Schwartz H. A. (1970), *J. Phys. Chem.*, **77**, 3209.
- [3] Biały L., Gondko R., *Acta Univ. Lodz., Folia biochim. biophys.* [w druku].
- [4] Bielski B. H. J., Cabelli D. E., Arudi R. L. (1985), *J. Phys. Chem.*, **14**, 1041–1100.
- [5] Cabelli D. E., Bielski H. J., Holeman J. (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3665–3669.
- [6] Ellerton D. H., Ellerton N. F., Robinson H. A. (1983), *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **41**, 143–248.
- [7] Felsenfeld G., Printz M. P. (1959), *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6259–6264.
- [8] Gondko R. (1990), *Wych. Fizyczne i Sport*, **3**, 99–112.
- [9] Gondko R., Biały L., Adamska M. (1991), *XXVII Zjazd PTBioch.*, Lublin, Streszczenia. Lublin, 311.
- [10] Goyffon A. (1968), *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **162**, 1123.
- [11] Himmelwright R. S., Eickman N. C., Lubien C. G., Solomon E. I. (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5378–5388.
- [12] Joujni M., Lapluye G., Huet J., Juhen R., Ferradini C. (1988), *J. Inorg. Biochem.*, **26**, 269–280.
- [13] Klug-Roth D., Rabani J. (1976), *J. Phys. Chem.*, **80**, 588–591.
- [14] Mazur J., Gondko R. (1988), *Zagad. Biof. Współ.*, **13**, 81–110.
- [15] Płonka A., Mayer J., Metodiewa D., Gębicki J., Zgirski A., Grabska M. (1986), *J. Radioanal. Nuclear Chem.*, **101**, 221–225.
- [16] Queinsec E., Gardes-Albert M., Goyffon M., Ferradeni Ch., Vuillaume M. (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1041**, 143–159.
- [17] Weinstein J., Bielski H. J., Holeman J. (1980), *J. Am. Soc.*, **102**, 4916–4919.
- [18] Vuillaume D., Ducanel F., Calvayrac R., Rabillouel T., Hubert M., Goyffon M. (1988), *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 17–23.
- [19] Zgirski A. (1986), *Ceruloplazmina człowieka, świni i krowy. Stabilność i alternatywna droga działania*, *Acta Univ. Lodz.* [praca habilitacyjna].

Wpłynęło do Redakcji
„Folia biochimica et biophysica”
01.10.1991

Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego

Roman Gondko, Ludwik Biały, Maria Adamska

DISMUTASE PROPERTIES OF CRAYFISH HEMOLYMPH AND HAEMOCYANIN

The hemolymphs of the crayfish species: *Orconectes limosus*, *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* have been found to exhibit relatively high superoxide dismutase activities of and, 5.9; 6.2; 3.5 respectively.

The enzymes corresponding in its physical properties to bovine SOD have not been detected in the proteinograms of crayfish hemolymphs. The electrophoretic separations of crayfish haemocyanins revealed dismutase-positive species corresponding to haemocyanin fractions of 16S and 24S. The chromatographically purified components corresponding to 5S and 16S fractions of crayfish haemocyanins had low dismutase activities.