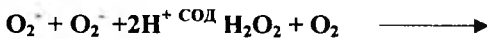


## АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В РІЗНИХ ТКАНИНАХ СРІБЛЯСТОГО КАРАСЯ (*CARASSIUS AURATUS*)

Невід'ємним елементом життєдіяльності більшості живих організмів є кисень, який необхідний для протікання важливих клітинних процесів (утворення АТФ в процесі окисного фосфорилування; метаболізму біологічних амінів, пуринів, стероїдів, амінокислот та ін.). Більшість цих процесів супроводжуються утворенням активних форм кисню (АФК), таких як супероксид-аніон ( $O_2^-$ ), пероксид водню ( $H_2O_2$ ), гідроксил-радикал ( $HO^\cdot$ ) [1, с.92; 2, с.44; 3, с.72]. Дані сполуки пошкоджують практично всі клітинні компоненти, що приводить до модифікації амінокислот в білках, появи точкових мутацій в ДНК, утворення пероксидів ліпідів (ліпід-ООН). Тому в клітині діють потужні антиоксидантні системи, які знешкоджують АФК. Захист від АФК здійснюють як відповідні ферменти, так і низькомолекулярні сполуки. Одним з найважливіших антиоксидантних ферментів є супероксиддисмутаза (СОД), яка перетворює супероксид-аніон на пероксид водню [4, с.52; 5, с.62; 6, с.101]:



Продукт даної реакції, пероксид водню, сам по собі не є особливо токсичним, але в присутності  $O_2^-$  та іонів перехідних металів (Fe,Cu) перетворюється у високотоксичний гідроксильний радикал [7, с.104; 8, с.204]. Сріблястий карась може тривалий час перебувати в стані аноксії і легко з неї виходить при поновленні подачі кисню, що свідчить про добре розвинуту систему захисту від АФК, що і робить цікавим досліджуваний об'єкт. Метою даної роботи було визначити активність СОД в печінці, білих м'язах та нирках сріблястого карася.

### Матеріали і методи

#### *І. Приготування препаратів.*

Досліди проводились на самках сріблястого карася довжиною 23-25 см. Риб акліматизували до лабораторних умов протягом 7-12 днів. Таким способом було знято у них стресові реакції після вилову і транспортування. Рибу швидко забивали і зразу ж брали зразки печінки, білих м'язів і нирок. Зразки промивали в охолодженому фізіологічному розчині (0,9% NaCl), просушували на фільтрувальному папері і зважували. Потім їх гомогенізували в скляному гомогенізаторі Поттера. Співвідношення тканини і середовища гомогенізації складало 1:10 (маса: об'єм).

Середовище гомогенізації містило (вказано кінцеві концентрації): 50 мМ калій-фосфатний буфер (КР), рН 7,0, 0,5 мМ етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) і кілька кристаліків фенілметилсульфонілфториду, який є інгібітором протеаз. Центрифугували протягом 15 хв при 15000g. Для визначення активності СОД використовували отриманий після центрифугування супернатант.

### II. Визначення активності СОД.

Оскільки субстрат ( $O_2$ ) каталізованої СОД реакції є нестабільним, то прийнято визначати активність даного ферменту непрямыми методами. Ми використовували спосіб, який базується на інгібуванні СОД реакції окислення кверцетину [9]. Суміш для визначення активності СОД містила: 30 мМ Tris-буфер (рН 10,0), 0,5 мМ ЕДТА, 0,8 мМ N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), 0,05 мМ кверцетин. В цій суміші ТЕМЕД генерує  $O_2^-$ , який окислює кверцетин. Швидкість окислення кверцетину визначали на спектрофотометрі СФ-46 (Ленінград, СРСР) за зміною оптичної густини при довжині хвилі  $\lambda=406$  нм. Якщо до цієї суміші додати препарат з тканин, в якому знаходиться СОД, то даний фермент буде конкурувати з кверцетином за  $O_2^-$ . В результаті буде окислюватись менша частина кверцетину, тому що певна частина  $O_2^-$  буде дисмутувати до  $H_2O_2$  під дією СОД. Тобто, чим більше препарату ми додаємо в суміш, тим повільніше буде окислюватись кверцетин.

Загальний об'єм проби для визначення активності СОД становив 1,5 мл: 1,32 мл вище вказаної суміші (без кверцетину), 0,15 мл суміші [вода + препарат]. Їзали різні кількості препарату (0,5-50 мкл) і доливали дистильованою водою до 150 мкл. Реакцію починали внесенням 30 мкл кверцетину. Хід реакції реєстрували протягом 5 хвилин. Щоб побудувати криву інгібування окислення кверцетину, знімали швидкість реакції з різними кількостями супернатанту (не менше 6 точок). Розрахунки кривих інгібування проводили за допомогою комп'ютерної програми "KINETICS". Знаходили константу половинного інгібування ( $K_{50}$ ), початкову ( $V_0$ , без додавання супернатанту) і мінімальну ( $V_{min}$ ) швидкості реакції.

За одиницю активності СОД прийняли кількість супернатанту, яка інгібує реакцію окислення кверцетину наполовину. Тобто,  $K_{50}$ , яка виражена в мілілітрах (або мікролітрах) супернатанту, містить 1 Од активності СОД.

Для розрахунків специфічної активності даного ферменту, яка виражається в одиницях активності на 1 мг білка в супернатанті, ми визначали активність білка за методом Бредфорда [10] – по забарвленню кумасі яскраво-голубого. В цьому випадку активність розраховували за формулою:

$$\text{Активність СОД} = 1 / (K_{50} \times [\text{білок}]),$$

Де  $K_{50}$  – константа половинного інгібування (мл),  
[білок] – концентрація білка в пробі (мг/мл).

## Результати та обговорення

Активність СОД в досліджуваних органах сріблястого карася зменшується в такій послідовності: печінка – білі м'язи – нирки (рис.1). В печінці активність СОД складала 88,3 Од/мг, яка в 3,9 раз вища від її активності в білих м'язах і в 5,4 раз вища від її активності в нирках. Такий розподіл активності СОД в різних тканинах пояснюється різною інтенсивністю протікання метаболічних реакцій в цих органах. Печінка є метаболічно активним органом, в ній відбуваються реакції знешкодження ксенобіотиків, окислення різноманітних речовин, в процесі яких накопичується супероксид-аніон, як побічний продукт цих реакцій. Тому активність СОД є досить високою. Білі м'язи є значно менш метаболічно активними, ніж печінка. В них переважають анаеробні процеси, пов'язані з гліколізом. Внаслідок цього генерація  $O_2^-$  є малою, тому і активність СОД виявилась нижчою, ніж в печінці. Досить суперечливі дані ми отримали щодо низької активності даного ферменту в нирках, оскільки відомо, що в цьому органі процеси, що супроводжуються утворенням АФК, є досить інтенсивними. В ряді досліджень, які були проведені на нирках інших тварин, активність СОД була досить високою [11, с.145]. Можливо, активність цього ферменту в нирках сріблястого карася є специфічною.

На рис.2-4 подано графіки типових кривих кривих інгібування окислення кверцетину в печінці, білих м'язах і нирках сріблястого карася. Криві відрізняються між собою. Так, крива інгібування окислення кверцетину в печінці (рис.2) має стрімкий характер, що свідчить про досить швидке інгібування даної реакції в цьому органі. Подібну форму має крива інгібування окислення кверцетину в білих м'язах (рис.3) і також прагне дійти до нуля. На відміну від двох попередніх графіків, крива інгібування окислення кверцетину в нирках (рис.4) має пологий характер, а реакція окислення кверцетину інгібується не більше, ніж наполовину.

Табл.1. Показники інгібування реакції окислення кверцетину в різних органах сріблястого карася (n=3, а для нирок n=2)

Орган	$K_{50}$ , мкл	[білок], мг/мл	Ступінь інгібування окислення кверцетину, %
Печінка	1,78±0,1	6,54 ±0,54	0
Білі м'язи	12,3±2,7	4,08 ±0,08	0,8
Нирки	3,29	5,00	44,6



Рис.1. Активність СОД в різних органах сріблястого карася (n=3, а для нирок n=2)

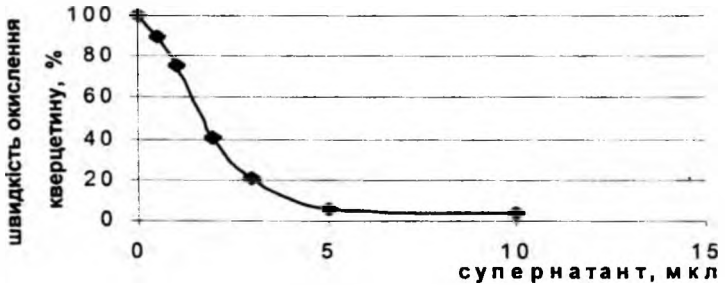


Рис.2. Крива інгібування окислення кверцетину в печінці сріблястого карася

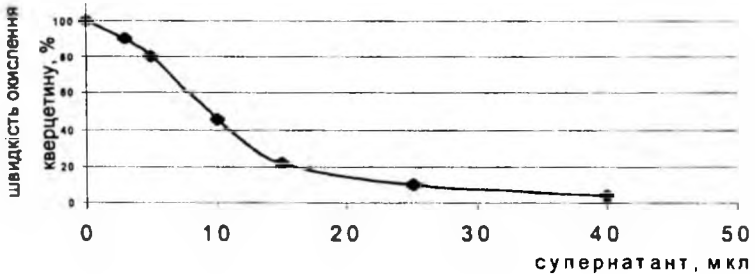


Рис.3. Крива інгібування окислення кверцетину в білих м'язах сріблястого карася.

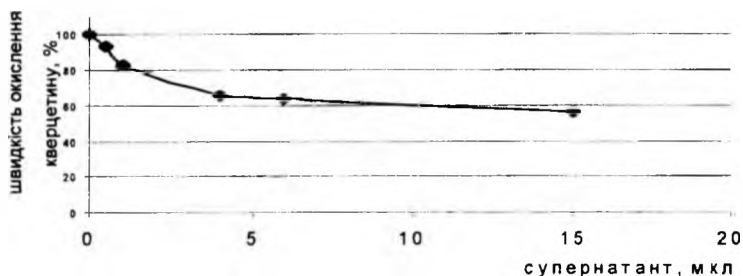


Рис.4. Крива інгібування окислення кверцетину в нирках сріблястого карася.

Розраховані показники інгібування подано в табл.1. Константи половинного інгібування змінюються в різних тканинах відповідно активності СОД.  $K_{50}$  найменша в печінці і найвища в білих м'язах. Досить сильно відрізнялась ступінь інгібування окислення кверцетину в різних тканинах: в печінці і м'язах ця реакція інгібувалась додаванням препарату практично повністю, а в нирках ступінь інгібування (нижня межа, за якою швидкість окислення кверцетину вже не зменшувалась при додаванні препарату тканин) складала в середньому 44,6 %.

Отримані дані наводять на думку, що властивості СОД в різних тканинах суттєво відрізняються, тому це питання вимагає додаткових досліджень.

1. Fridovich I. An overview of oxyradicals in Medical Biology// *Advances in Molecular and Cellular Biology*. – 1998. – Vol.25. – P.1-14.
2. Гольдштейн Н. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды// *Биохимия*. – 2002. – Т.67. – №2 – С.194-205
3. Фридович И. Свободные радикалы в биологии. – М.: Мир, 1979 – С.372.
4. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // *Биохимия*. – 2001. – Т.66. – №5 – С.592-609.
5. Калуев А. В. Выполняют ли регуляторную роль в клетке взаимодействия АФК с ДНК? // *Український біохімічний журнал*. – 1999. – Т.71. – №2. – С.104-108
6. Якименко І. Л., Сидорук Є. П. Регуляторна дія низькоінтенсивного лазерного опромінювання на стан антиоксидантної системи організму // *Український біохімічний журнал*. – 2001. – Т.73. – №1 – С.16-24.
7. Турпаев К. Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов// *Биохимия*. – 2002. – Т.67. – №3. – С.339-353.
8. Гродзинський Д. М. *Радиобіологія: Підручник* – К.: Либідь, 2000. – С.448
9. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой чувствительный способ определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина// *Вопросы Медицинской Химии*. – 1990. – №2. – С.88-91.

10. Bradford M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol.72. – P.248-254.
11. Halliwell B., Gutteridge, I. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine* // Clarendon Press, UK. – 1989.

Viktor Husac

#### THE ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN SOME TISSUES OF *CARASSIUS AURATUS*

The activity of SOD in different tissues of *Carassius auratus* has been measured. It decreased in the next order: liver – white muscle – kidney. It is supposed that the properties of SOD are tissue-specific.

Ярослав Степанюк

### ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ОСНОВНОЇ НЮХОВОЇ ЦИБУЛИНИ ТА ПІРІФОРМНОЇ КОРИ КОМАХОЇДНИХ, РУКОКРИЛИХ, ГРИЗУНІВ ТА ПРИМАТІВ

Підкіркові центри нюхового аналізатора впродовж багатьох десятиліть цікавлять вчених різних галузей, а найбільше – нейрогістологів. Класичні роботи у цій області проведені такими відомими гістологами, як Гошков [5, с.404], Сепп [8, 104], Cajal [13, с.94], Edinger [11, с.102], Herrick [15, с.44] та багатьма іншими. Такий інтерес, очевидно, можна пояснити тим, що нюховий аналізатор є найдревнішим аналізатором, який вже на перших етапах еволюційного розвитку хребетних забезпечив домінуючий дистантний зв'язок із зовнішнім середовищем. Крім того, поява нюхового аналізатора стимулювала розвиток кінцевого та проміжного мозку [11, с.94; 8, с.56].

Відомо, що шлях нюхового аналізатора починається аксонами рецепторних клітин, далі йде ряд переключень (нюхова цибулина, первинна нюхова кора, таламус, нова кора). Ми поставили за мету дослідити морфологію та цитоархітектоніку основної нюхової цибулини (*bulbus olfactorius*) та передньої ділянки препіріформної кори (*regio praepiriformis*) у порівняльному аспекті, а також, вияснити залежність диференціації даних органів та клітинних елементів від способу життя та поведінки.

Вибір структур пояснюється високим ступенем кореляції між розмірами нюхової цибулини та піріформної кори [2, с.99]. Також доведені потужні зв'язки мітральних клітин з піріформною корою [16]. Для досягнення даної мети ми поставили наступні завдання: визначити ширину цитоархітектонічних шарів, лінійні розміри, об'єм нейронів та їх ядер, щільність нейронів, та зробити індексацію даних вимірів з подальшим порівнянням.