

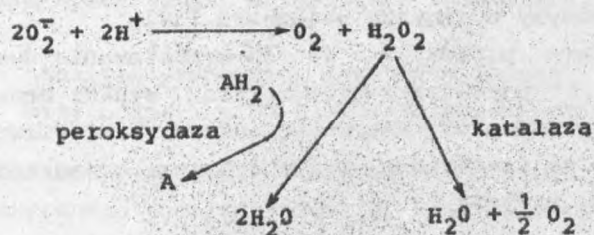
Anna Bartkowiak, Kazimiera Studzian

PORÓWNANIE DYSMUTAZY PONADTLLENKOWEJ
Z WĄTROBY DORSZA I. WIEPRZA

Opisano warunki izolowania nie zbadanej do tej pory dysmutazy z wątroby dorsza (*Gadus morhua* L.). Określono jej skład chemiczny i podano właściwości fizykochemiczne. Zbadano wpływ dietyloditiokarbaminianu (DDC), cyjanku i podwyższonej temperatury na aktywność i właściwości spektralne dysmutazy dorsza. Przeprowadzono analizę porównawczą wyników otrzymanych dla dysmutazy dorsza z rezultatami analogicznych badań własnych nad dysmutazą wątroby wieprza. Stwierdzono, iż zasadnicze różnice dotyczą zmian aktywności pod wpływem temperatury.

WSTĘP

Wszystkie przebadane do tej pory komórki metabolizujące tlen zawierają enzymy, które katalizują reakcję dysmutacji:



Enzymy katalizujące tę reakcję są metaloproteinami i nazwano je dysmutazami ponadtlenkowymi (SOD). Systematyczna nazwa - oksydoreduktaza ponadtlenek : ponadtlenek (EC 1.15.1.1).

Anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- jest produktem końcowym lub pośrednim wielu reakcji enzymatycznych i procesów autooksydacji wielu grup związków organicznych. Powstający w wyniku dysmutacji, nadtlenek wodoru o znacznie słabszej reaktywności niż anionorodnik ponadtlenkowy jest następnie rozkładany na O_2 i H_2O przez katalazy i peroksydazy, chroniąc w ten sposób komórkę przed jego akumulacją.

Dysmutaza ponadtlenkowa jest enzymem rozpowszechnionym szeroko w przyrodzie. Występuje w świecie roślinnym, zwierzęcym oraz w mikroorganizmach. Po raz pierwszy opisali ją McCord i Fridovich [9, 16]. Od tej pory enzym ten był bardzo intensywnie badany pod względem występowania, budowy chemicznej, struktury, różnorodności i swoich ochronnych funkcji [6, 8].

Dysmutazy ponadtlenkowe można podzielić na 3 grupy ze względu na obecność w ich cząsteczkach różnych jonów metali: Cu, Zn-SOD, Mn-SOD i Fe-SOD. Badacze głównie podejmują badania nad dysmutazami miedziowo-cynkowymi, pochodzącymi z różnorodnych tkanek ssaków, gdyż ten typ enzymu odgrywa najistotniejszą rolę w przemianach metabolicznych tlenu.

Ostatnio podjęto również badania nad dysmutazami innych kręgowców między innymi ryb.

Ryby, ze względu na inne niż ssaki warunki życia (środowisko wodne uboższe w tlen w porównaniu z powietrzem, niższa temperatura), są interesującym obiektem przy badaniach enzymów związanych z metabolizmem tlenu. Badano dysmutazę z erytrocytów kilku gatunków ryb: karp, szczupak, lin [15, 22], z wątroby ryby miecz [1] i izoenzymy dysmutazy szczupaka [12].

Niniejsza praca przedstawia sposób wyizolowania dysmutazy z wątroby dorsza i jej charakterystykę oraz wyniki badań wpływu DDC, CN^- i temperatury na aktywność enzymu i właściwości spektralne. Dane te są zestawione z identycznymi oznaczeniami dla dysmutazy wątroby wieprza.

MATERIAŁ I METODY

Preparatyka i oczyszczanie dysmutazy ponadtlenkowej z wątroby dorsza

Do preparatyki używano wątroby dorsza po uprzednim zamrożeniu. Dysmutazę izolowano zmodyfikowaną metodą Frieda i wsp.

[10] polegającą na wytrąceniu białek w niskim pH i frakcjonującym wysalaniu siarczanem amonu. Następnie część białek balastowych usuwano poprzez działanie podwyższonej temperatury (50°C) i ekstrakcję chloroformem. Otrzymany preparat po zagęszczeniu przy pomocy aquacitu był poddawany oczyszczaniu własną techniką na drodze chromatografii jonowymiennej na DE-32 celulozie [3] i przez sączenie molekularne na Bio-gelu P-60.

Dysmutazę wieprzową preparowano metodą wcześniej opisaną przez autorów [3].

Preparat przechowywano zamrożony w roztworze buforowym lub w stanie zliofilizowanym w temperaturze -20°C .

Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej określano metodą pośrednią Misry i Fridovicha [18] opartą na inhibicji autooksydacji adrenaliny do adrenochromu w środowisku zasadowym. Mieszanina reakcyjna zawierała 1×10^{-4} M EDTA i 3×10^{-4} M adrenaliny w buforze węglanowym o pH 10,2. Pomiary wykonywano na spektrofotometrze "Specord" przy 480 nm w temperaturze 25°C , wykorzystując zakres transmisji 80-100%, a następnie przeliczano transmisję na absorbancję. Aktywność dysmutazy określano w odpowiednim przedziale czasowym na podstawie zmian absorbancji w próbce zawierającej enzym, odnoszonych do analogicznych czasowo zmian pochłaniania adrenaliny (kontroli), które winny wynosić 0,025 jednostki absorbancji w tym przedziale czasu.

Analiza preparatów dysmutazy dorsza przy pomocy metod elektroforetycznych

W celu zbadania stopnia jednorodności otrzymanych preparatów białka enzymatycznego oraz określenia masy cząsteczkowej podjednostek SOD zastosowano techniki elektroforetyczne.

Podstawową elektroforezę przeprowadzono w 7,5% żelu poliakryloamidowym. Rozdział prowadzono przy natężeniu 3,5 mA na kolumnię żelu w ciągu 2,5 h w buforze weronałowym o pH 8,6. Frakcje białkowe wybarwiano przy użyciu Coomassie Blue.

Aktywność enzymatyczną dysmutazy w żelu poliakryloamidowym lokalizowano w oparciu o metodę Beauchampa i Fridovicha [7].

Fracje białkowe zawierające miedź identyfikowano wg metody Gould i Karolus [11].

Oznaczanie masy cząsteczkowej podjednostek dysmutazy przeprowadzano techniką elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z siarczanem dodecylu sodu zgodnie z metodą Webera i Osborn [23].

Wpływ czynników fizyko-chemicznych na aktywność i właściwości spektralne dysmutazy

Próbki dysmutazy inkubowano w zakresie temperatur 30-90°C w odstępach co 10°C przy pH 7,8 w ciągu 90 min i określano ich aktywność względem kontroli (enzymu nieinkubowanego).

Określano wpływ 0,5 mM, 1 mM i 5 mM KCN; oraz 0,25 mM, 1,5 mM i 3 mM DDC na aktywność dysmutazy.

Badano zmiany widma dysmutazy (w zakresie 350-650 nm) w obecności 1,0 mM dietylotiotiokarbaminianu.

Badano wpływ temperatury (20°C, 30°C, 40°C) i pH (9,2; 7,0; 6,0; 5,4) na szybkość reakcji DDC z dysmutazą. Pomiarów absorbancji dokonywano na spektrofotometrze UV VIS przy 450 nm w zakresie 1-5 min.

Oznaczanie miedzi w dysmutazie dorsza

Miedź w próbkach dysmutazy (po wyczerpującej dializie preatów wobec wody podwójnie destylowanej) oznaczano przy pomocy spektrofotometru absorpcji atomowej AAS-1 firmy Karl-Zeiss na.

Białko oznaczano metodą Lowry'ego.

Analiza składu aminokwasowego dysmutazy z wątroby dorsza

Oznaczenia składu aminokwasowego badanych próbek dysmutazy wykonywano w automatycznym analizatorze aminokwasów firmy Jeol typ JLC-GAH. Probki dysmutazy poddawano hydrolizie za pomocą 6N HCl w ciągu 24 h w temperaturze 110°C w zatopionych ampulkach.

WYNIKI

Przykład oczyszczania preparatów dysmutazy w toku preparatyki oraz aktywność końcową enzymów z wątroby dorsza i wieprza przedstawiono w tab. 1 i 2. Aktywność dysmutazy oznaczano metodą Misry i Fridovicha [18]. Aktywność właściwa SOD z wątroby dorsza wynosiła 8000 U/mg, a z wątroby wieprzowej 5500 U/mg.

Tabela 1

Przykładowe wyniki przebiegu oczyszczania dysmutazy z wątroby dorsza

An example of dismutase purification progress in the course of its isolation from cod liver

Etapy izolowania	Białko mg/ml	Aktywność U/ml	Aktywność właściwa U/mg
Preparat wysolony NH_4SO_4 i rozpuszczony w 0,1 M buforze fosforanowym	1,956	3 772	1 928
Preparat pozbawiony balastu wytrącanego przez ogrze- wanie w 55°C	1,710	3 400	1 988
Surowy enzym uzyskany metodą Frieda	1,159	3 792	3 272
Enzym oczyszczony na DE-32 celulozie	0,810	6 786	8 378

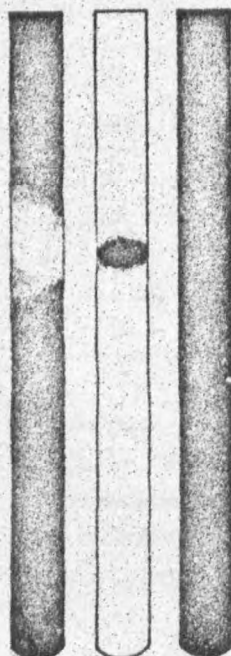
Na podstawie uzyskanych wyników z analiz elektroforetycznych można stwierdzić, że otrzymane preparaty dysmutazy z wątroby wieprzowej [3] i dorsza były elektroforetycznie jednorodne i wykazywały aktywność dysmutazową, która zanikała po inkubacji elu w roztworze cyjanku (rys. 1).

T a b e l a 2

Przykładowe wyniki przebiegu oczyszczania dysmutazy
z wątroby wieprzowej

An example of dismutase purification progress in the course
of its isolation from porcine liver

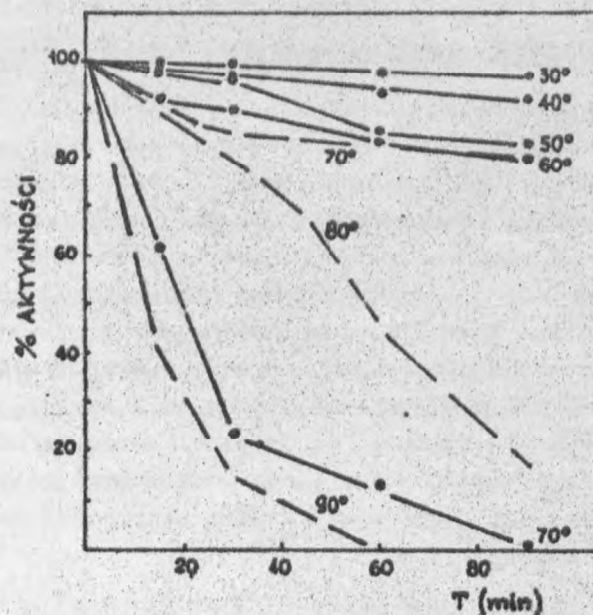
Etapy izolowania	Białko mg/ml	Aktywność U/ml	Aktywność właściwa U/mg
Preparat wysolony NH_4SO_4 i rozpuszczony w 0,1 M buforze fosforanowym	2,750	3 256	1 184
Preparat pozbawiony balastu wytrącanego przez ogrze- wanie w 68°C	2,620	3 662	1 397
Surowy enzym uzyskany metodą Frieda	1,620	3 642	2 248
Enzym oczyszczony na DE-32 celulozie	0,625	3 524	5 622



Rys. 1

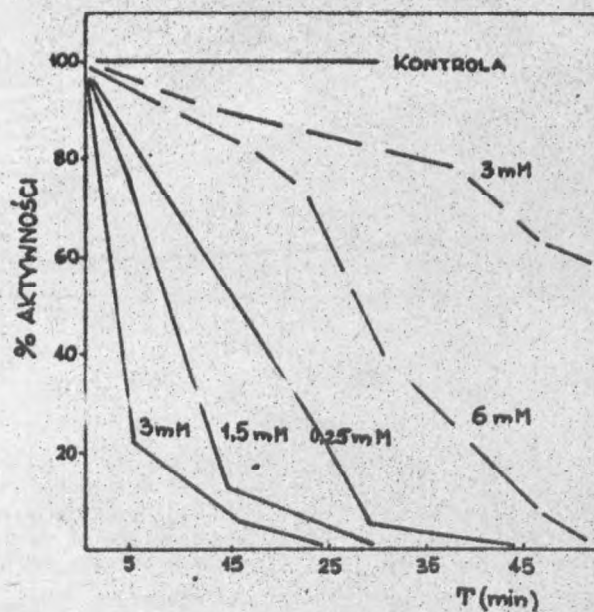
Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (schemat): A - preparat dysmutazy z wątroby dorsza ze zlokalizowaną strefą aktywności dysmutazowej metodą Beauchampa i Fridovicha, B - żel po wybarwieniu na białko przy pomocy Coomassie Blue, C - żel wybarwiony metodą Beauchampa i Fridovicha po inkubacji z 5 mM KCN

The original picture of polyacrylamide gel electrophoresis: A - dismutase from cod liver, the gel stained for dismutase activity by Beauchamp and Fridovich method, B - the gel stained for protein, C - the gel stained by Beauchamp and Fridovich method after incubation with 5 mM KCN



Inaktywacja cieplna dysmutazy ponadtlenkowej z wątroby dorsza — i wieprzowej ---- w 0,05 M buforze fosforanowym pH 7,8

Changes of superoxide dismutase activity from cod —, porcine liver ---- induced by increase of temperature at pH 7.8



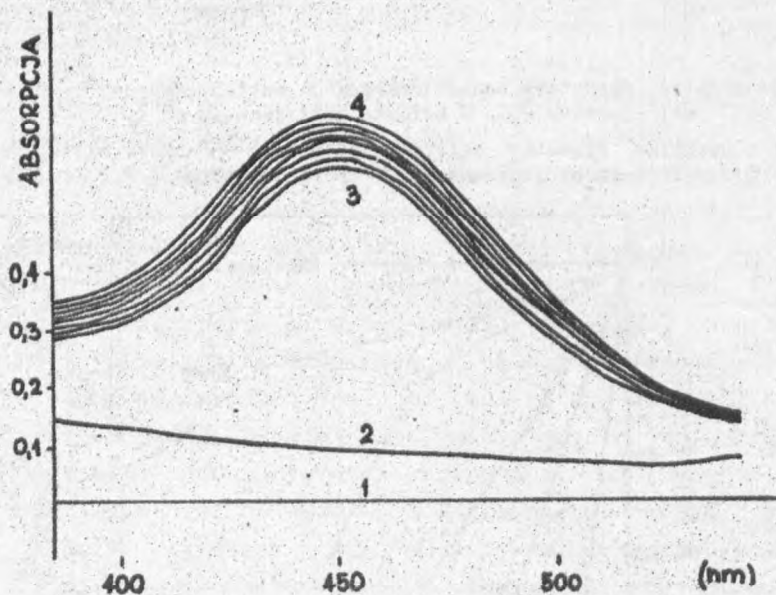
Inhibicja dysmutazy dorsza — i wieprza ---- przez różne stężenia DDC. Aktywność enzymu określano po inkubacji z DDC w temperaturze 37°C i buforze fosforanowym o pH 7,4

Inhibitory effects of different DDC concentrations on cod — and porcine SOD ----. Activity of enzyme was estimated after incubation with DDC at 37°C in phosphate buffer at pH 7.4

Na elektroferogramach wykazano miedzioproteinowy charakter frakcji białkowej dysmutazy (dane nie zamieszczone).

W wyniku analizy elektroforetycznej z SDS stwierdzono frakcje białkowe o masie cząsteczkowej 14 700 - dla preparatu z dorsza i 16 000 - z wieprza, występujące po działaniu na enzym SDS, β -merkaptotanołem i podwyższonej temperatury, identyfikowane jako podjednostki dysmutaz ponadtlenkowych.

Wyniki inaktywacji cieplnej dysmutazy z wątroby wieprzowej i dorsza w różnych odstępach czasu przedstawia rys. 2. Dysmutaza dorsza jest bardziej wrażliwa na działanie podwyższonej temperatury i już w temperaturze 70°C ulega całkowitej inaktywacji po 90 min, natomiast SOD wieprzowa traciła aktywność dopiero przy 90°C po 60 min inkubacji.



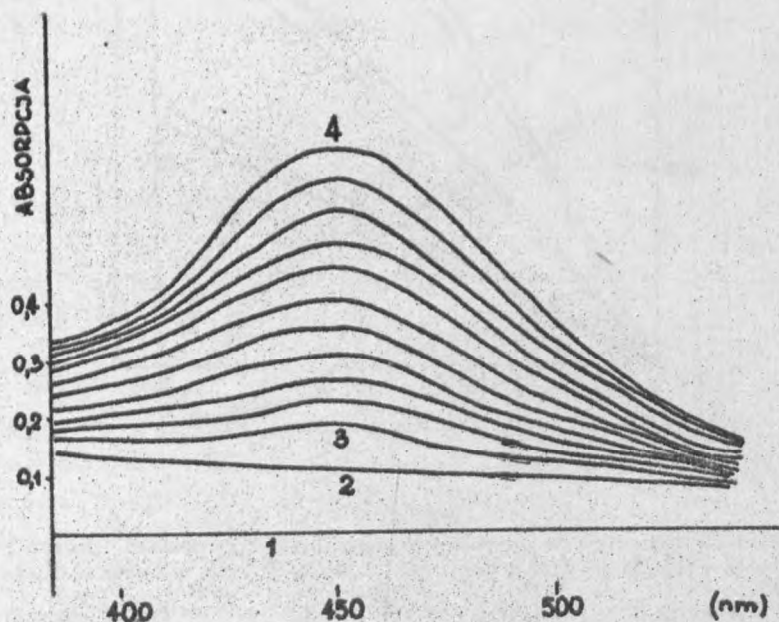
rys. 4

Wpływ DDC na widmo absorpcji dysmutazy z wątroby dorsza. Enzym (0,1 mM w buforze fosforanowym, pH 7,4, temperatura pokojowa) był poddany działaniu 1,0 mM DDC i widmo zapisywano w odstępach czasu: 1 - linia podstawowa; 2 - enzym; 3 - enzym + DDC, 1 min po zmieszaniu; 4 - widmo po 30 min i dłuższym okresie czasu. Krzywe pomiędzy 3 i 4 linią były rysowane w okresie krótszym niż 30 min

Effect DDC upon the absorption spectrum of cod dismutase. Enzyme (0.1 mM in phosphate buffer, pH 7.4, room temperature) was treated with 1.0 mM DDC and spectra were recorded at intervals: 1 - base line; 2 - enzyme alone; 3 - enzyme + DDC, 1 min after mixing; 4 - spectral scans after 30 min and longer intervals. Curves between 3 and 4 lines were drawn for intervals shorter than 30 min

Rysunek 3 wykazuje, że inhibujący efekt różnych stężeń DDC na enzym z wątroby wieprzowej i dorsza był zależny od czasu inkubacji. Preinkubacja dysmutazy dorsza z 0,025 mM DDC przez 30 min powodowała całkowitą inhibicję enzymu. Dodatkowo obserwowano niewielki efekt DDC na enzym w czasie zerowym, mimo że sam dietyloditiokarbaminian (w stężeniach 0,25–3 mM) nie ma wpływu na oksydację adrenaliny. Natomiast SOD wieprzowa jest bardziej oporna na działanie tego czynnika chelatującego.

Oddziaływanie 1,0 mM DDC w temperaturze pokojowej przy pH 7,4 na 0,1 mM SOD z dorsza i wieprza wywołuje zmiany optycznego widma SOD w zakresie widzialnym, przedstawione na rys. 4 i 5.

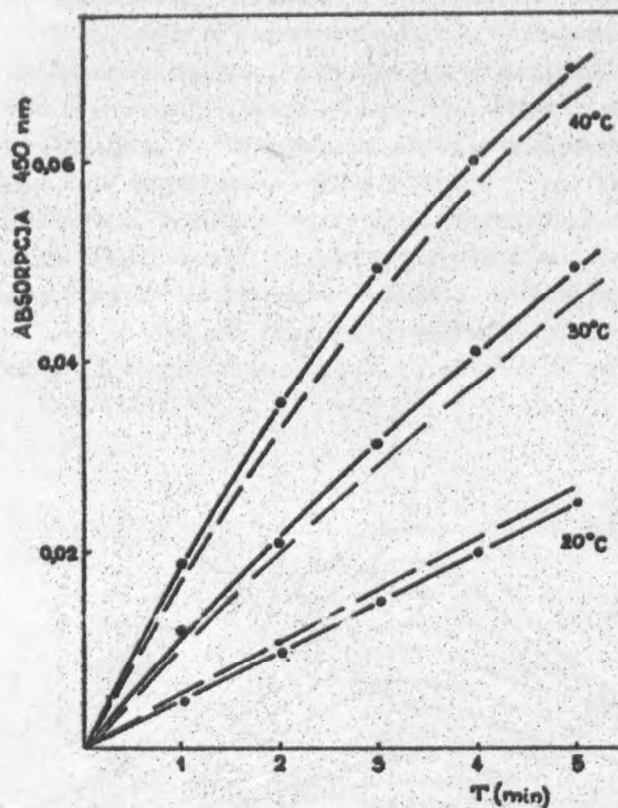


Rys. 5

Wpływ DDC na widmo absorpcji dysmutazy z wątroby wieprzowej. Szczegółowy opis warunków przy rys. 4

Effect DDC upon the absorption spectrum of porcine dismutase from liver

Maksimum absorpcji przy 450 nm było proporcjonalne do stężenia enzymu. Wpływ temperatury na szybkość reakcji DDC z dysmutazą, w buforze fosforanowym o pH 7,8 przedstawia rys. 6. Reakcja DDC z enzymem jest także zależna od pH.



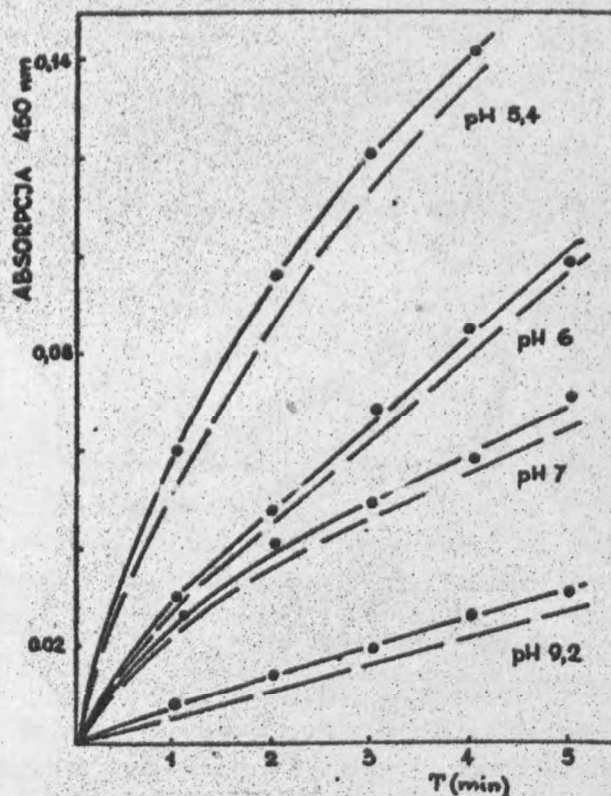
Rys. 6

Wpływ różnych temperatur na szybkość reakcji DDC z dysmutazą dorszą — i wieprzową ----, 0,25 mM SOD inkubowano z 0,25 mM DDC w buforze fosforanowym o pH 7,8

Effect of varied temperature on the rate reaction of DDC with cod — and porcine ---- dismutases. Enzyme at 0.25 mM was incubated with 0.25 mM DDC in phosphate buffer at pH 7.8

Wyniki przedstawione na rys. 7 wskazują, że reakcja, mierzona jako zmiany absorpcji przy 450 nm, była szybsza przy niższym pH. Nie obserwowano znacznych różnic w reakcjach przeprowadzonych z dysmutazą ponadtlenkową z wątroby wieprzowej i dorszą.

Wiadomo, że cyjanek działa jako inhibitor na SOD i mechanizm reakcji polega na przyłączeniu CN^- do Cu(II) [13].

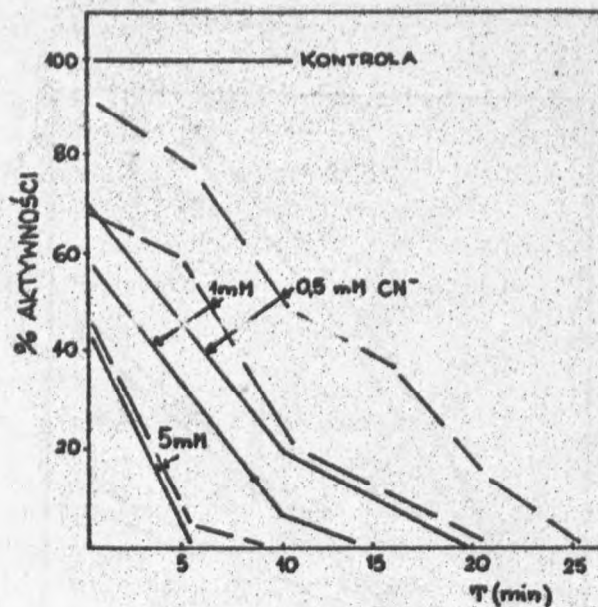


Rys. 7

Wpływ pH na szybkość reakcji DDC z dysmutazą dorszą ——— i wieprzową - - - - Enzym o stężeniu 0,25 mM był inkubowany z 0,25 mM DDC. Stosowano bufory o pH 9,2 - węglan sodowy; pH 7,0 i 6,0 - fosforan potasowy; pH 5,4 - octan sodowy

Effect of pH on the rate of reaction of DDC with the cod SOD ——— and porcine SOD - - - - Enzyme at 0.25 mM was incubated with 0.25 mM DDC. The buffers used were: pH 9.2 - sodium carbonate; pH 7.0 and 6.0 potassium phosphate; pH 5.4 - sodium acetate

Wpływ CN^- na aktywność SOD przedstawia rys. 8. Ponieważ stwierdzamy, że DDC także przyłącza się do Cu(II) , pożyteczne było zbadanie efektu kompetycji CN^- i DDC w reakcji z SOD.



Rys. 8

Wpływ cyjanku na aktywność dysmutazy dorsza — i wieprzowej ----.
 Effect of varied cyanide concentrations on cod — and porcine ---- dismutase activity

Tabela 3

Skład aminokwasowy dysmutaz
 z wątroby wieprzowej, ryby miecz i dorsza
 Amino acid composition
 of porcine, swordfish and cod dismutases

Aminokwasy	Wątroba wieprzowa [5]	Wątroba ryby miecz [1]	Wątroba dorsza
Kwas asparaginowy	30,0	37,4	40,4
Treonina	15,0	23,1	18,7
Seryna	17,2	8,6	11,7
Kwas glutaminowy	29,8	27,3	23,0
Prolina	8,9	11,1	—
Glicyna	47,8	45,4	48,0

Tabela 3 (cd.)

Aminokwasy	Wątroba wieprzowa [5]	Wątroba ryby miecz [1]	Wątroba dorsza
Alanina	20,2	27,2	31,1
Walina	27,4	26,0	30,6
Metionina	1,3	2,2	3,3
Izoleucyna	12,8	19,9	17,1
Leucyna	14,3	17,2	26,2
Tyrozyna	1,7	4,6	-
Fenylalanina	5,8	8,8	9,4
Lizyna	19,6	20,3	23,1
Histydyna	17,3	16,2	10,4
NH ₃	25,3	31,5	39,8
Arginina	8,2	13,7	7,3

Dane przedstawione na rys. 9 wskazują, że cyjanek powoduje inhibicję reakcji DDC z dysmutazą. Wyznaczony skład aminokwasowy dla dysmutazy z wątroby dorsza (tab. 3) przedstawiono jako ilość reszt poszczególnych aminokwasów przeliczonych na cząsteczkę białka enzymatycznego, przyjmując jej masę jako równą 30 000. Porównując skład aminokwasowy dysmutazy z wątroby dorsza z dysmutazą z wątroby ryby miecz i wieprza można zauważyć duże podobieństwo.

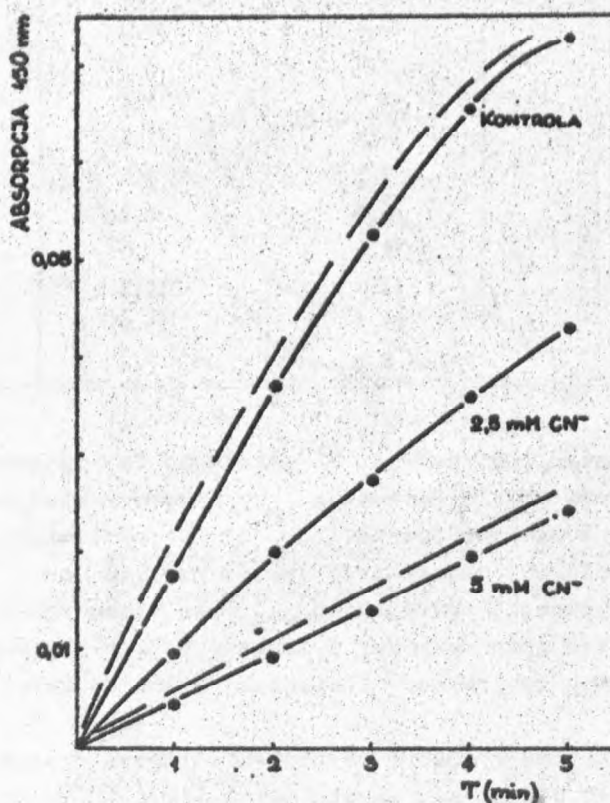
Oznaczone stężenie miedzi w próbce roztworu dysmutazy dorsza wynosiło $7,69 \pm 0,044$ mg/ml, co stanowi 0,32%.

DYSKUSJA

Nasze badania nad dysmutazą nadadtlenkową ryb [4, 22], jak również innych badaczy [1, 12, 15], wskazują, że istnieją strukturalne i funkcjonalne różnice pomiędzy cytosolową SOD ryb i ssaków.

Przyjęta do izolowania dysmutazy z wątroby dorsza metoda Frieda i wsp. [10], stosowana powszechnie dla tkanek ssaków, okazała się w pełni zadowalająca w odniesieniu do tak spe-

cyficznego materiału, jakim jest wątroba ryby. Musiano zmodyfikować ją obniżając temperaturę i skracając czas trwania etapu denaturacji termicznej przedłużając natomiast czas wirowania (do 1 h) po wysoleniu enzymu przy pomocy $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Rys. 9

cyjanku na reakcję DDC z dysmutazą z wątroby dorsza — i wieprza
 ----- .Enzym o stężeniu 0,1 mM w buforze fosforanowym o pH 7,8 preinkubowany z cyjankiem był poddany działaniu 1,0 mM DDC

Effect of cyanide on the reaction of DDC with the cod — and porcine SOD
 ----- .Enzyme at 0.1 mM in phosphate buffer at pH 7.8 preincubated with cyanide was exposed to 1.0 mM DDC

Modyfikacja wyjściowej metody polegała również na zastosowaniu dodatkowego oczyszczania na drodze chromatografii jonowymiennej na DE-32 celulozie, a następnie na filtracji molekularnej na Bio-gelu P-60. Ostatecznie więc preparatyka dysmutazy z wą-

troby dorsza znacznie różniła się od preparatyki dysmutazy z wątroby wieprzowej. Wątroba dorsza zawiera bowiem duże ilości lipidów i właśnie one w znacznym stopniu zmuszały do zmiany warunków preparatyki i utrudniały ją.

Porównując aktywność obu dysmutaz należy stwierdzić, że dysmutaza ponadtlenkowa z wątroby dorsza wykazywała większą aktywność w przeliczeniu na mg białka w porównaniu z dysmutazą z wątroby wieprzowej. Wyższa aktywność dysmutazy z wątroby dorsza może być uwarunkowana temperaturą środowiska, w jakim żyje dorsz. Wykazano już wcześniej, że metabolizm wielu enzymów ryb [20] nastawiony jest na niższą temperaturę w zakresie 10-20°C, dlatego też aktywność badanej dysmutazy, która była mierzona w temperaturze 25°C, jest wyższa w porównaniu z dysmutazą wieprzową.

Otrzymaną w niniejszej pracy w wyniku elektroforezy z SDS frakcję białkową o masie cząsteczkowej 14 700, występującą po działaniu na enzym czynnikami denaturującymi (SDS, β -merkapt-etanol, ciepło), zidentyfikowano jako podjednostkę dysmutazy. W porównaniu z innymi masami podjednostek dysmutaz, np. wieprzowej [5], wołowej [21] i ludzkiej [2], masa podjednostki SOD dorsza jest nieco niższa.

Oznaczona ilość miedzi w próbce badanej dysmutazy dorsza (0,32%) nie jest całkowicie zbieżna z doniesieniem B a n n i s t e r a i wsp. [1], który podaje, że zawartość miedzi w dysmutazie z wątroby ryby miecz stanowi 0,38%.

Bardzo interesująco przedstawia się porównanie denaturacji termicznej dysmutazy wieprzowej i dorsza. Wykazano, że denaturacja (określona poprzez spadek aktywności) SOD dorsza szybciej zachodziła w niższej temperaturze (już w 70°C w ciągu 90 min następowała całkowita inaktywacja) w porównaniu z SOD wieprzową (która była zdenaturowana dopiero w temperaturze 90°C po 1 h inkubacji). Może to świadczyć o mniejszej stabilności dysmutazy dorsza w porównaniu z enzymami innych gatunków zwierząt.

Ważną cechą charakteryzującą wszystkie dysmutazy zawierające miedź i cynk jest inhibicja ich przez cyjanki, które blokują Cu uniemożliwiając katalizowanie reakcji dysmutacji. W pracy wykazano, że przy wysokich stężeniach KCN (5 mM) następuje również szybka inaktywacja obu badanych dysmutaz. Natomiast przy mniejszych stężeniach KCN (lecz zawsze w nadmiarze) inaktywacja dysmutazy dorsza zachodziła szybciej niż w przypadku dysmutazy wątro-

by wieprzowej. Przyczyną tego zjawiska może być większa dostępność centrum aktywnego enzymu dorsza dla CN^- .

Innym inhibitorem stosowanym często w ostatnich latach jest DDC [13, 14, 17, 19], który również tworzy kompleks z Cu centrum aktywnego, ale w przeciwieństwie do cyjanków może być stosowany w badaniach *in vivo*. W przeprowadzonych przez nas badaniach stwierdzono, że inhibicja SOD dorsza zachodzi szybciej (przy niższych stężeniach DDC) w porównaniu z SOD wieprzową. Różnice w prędkości inhibicji są tutaj znacznie bardziej wyraźne niż w przypadku blokowania obu dysmutaz cyjankami. Są one prawdopodobnie spowodowane (jak to stwierdzono już powyżej) większą dostępnością centrum aktywnego dysmutazy ponadtlenkowej z wątroby dorsza. Część cząsteczka DDC, znacznie większa niż anion CN^- , ma w przypadku dysmutazy wieprzowej jeszcze bardziej, niż cyjanek utrudniony konformacyjnie dostęp do centrum aktywnego, dlatego też dopiero w wyższych stężeniach i w znacznie dłuższym okresie czasu związek ten potrafi chelatować Cu, co prowadzi do inhibicji enzymu.

Częściowe potwierdzenie tej hipotezy sugerują wyniki innego eksperymentu z dysmutazą i DDC. Podczas inkubacji enzymu z DDC pojawia się pasmo pochłaniania przy 450 nm. Za wzrost absorpcji przy tej długości fali odpowiedzialny jest przyrost ilości tworzącego się podczas reakcji kompleksu DDC-Cu (enzymu). Porównując przyrosty absorpcji przy 450 nm dla dysmutazy dorsza i wieprza z DDC (w reakcji z nadmiarem), należy stwierdzić, że różnią się one kinetyką wzrostu absorpcji tuż po dodaniu DDC, natomiast w miarę upływu czasu (30 min) maksymalne absorpcje osiągane przy 450 nm (przeliczone na stężenie enzymu) dla obu dysmutaz są zbliżone. Oddziaływanie DDC-SOD przedstawione przez nas jest zgodne z wynikami Misry [17] dotyczącymi dysmutazy wołowej.

Porównując obie analizowane dysmutazy, nie stwierdzono istotnych różnic w efektach wpływu czynników zmieniających oddziaływanie DDC-SOD, takich jak: temperatura, pH i warunki interakcji kompetycyjnej z CN^- . Spowodowane jest to zapewne faktem, że zastosowane czynniki modyfikujące strukturę białka enzymatycznego wywierają wpływ tego rzędu, iż niewielkie w gruncie rzeczy różnice konformacyjne obu dysmutaz nie uwidaczniają się w warunkach prowadzonego eksperymentu.

Powyższa obserwacja, sugerująca duże analogie obu dysmutaz pod względem zarówno struktury, jak i mechanizmów działania, znaj-

duże dalsze uzasadnienie w analizie składu aminokwasowego. Określenie składu aminokwasowego dysmutazy dorsza wykazało jego duże podobieństwo do składu aminokwasowego dysmutazy z wątroby wieprza oraz dysmutaz z innych zwierząt [1, 5, 21].

Podsumowując można stwierdzić, że chociaż dysmutaza z wątroby dorsza wykazuje pewne różnice w porównaniu z dysmutazą ssaków, to jednak działanie obydwu enzymów oparte jest na takim samym mechanizmie. Istotna jest obserwacja, że pewne czynniki, jak np. DDC, które modyfikują aktywność dysmutazy ssaków, mogą być również stosowane dla przyszłych badań *in vivo* nad funkcją tego enzymu u ryb.

LITERATURA

- [1] Bannister J. V., Anastasi A., Bannister W. H., 1977, *Comp. Biochem. Physiol.*, 56B, 235-238.
- [2] Barra D., Martini F., Bossa F., Rotillio O., Bannister J. V., Bannister W. H., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1195-1200.
- [3] Bartkowiak A., 1979, *Zesz. Nauk. UŁ*, S. II, 23, 105-121.
- [4] Bartkowiak A., Grzelińska E., Varga I. Sz., Leyko W., 1981, *Int. J. Biochem.*, 13, 1039-1042.
- [5] Bartkowiak A., Leyko W., Fried R., 1979, *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 61-66.
- [6] Bartosz G., Leyko W., Fried R., 1979, *Experientia*, 35, 1194-1195.
- [7] Beauchamp Ch., Fridovich I., 1971, *Anal. Biochem.*, 44, 276-287.
- [8] Brock Ch., Walker J. E., 1980, *Biochemistry*, 19, 2873-2875.
- [9] Fridovich I., 1975, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 147-160.
- [10] Fried R., Fried L. W., Babin D. R., 1970, *Eur. J. Biochem.*, 16, 399-406.
- [11] Gould E., Karolus J. J., 1975, *Anal. Biochem.*, 67, 515-519.
- [12] Healy I. A., Mulcahy M. F., 1979, *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 563-565.

- [13] Heikkilä R. E., Cabbat F. S., Cohen G., 1976, J Biol. Chem., 251, 2182-2185.
- [14] Lengfelder E., 1979, Z. Naturf., 34C, 1292-1294.
- [15] Mazeaud F., Maral J., Michelson A. M., 1979, Biochem. Biophys. Res. Commun., 86, 1161-1168.
- [16] McCord I. M., Fridovich I., 1969, J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.
- [17] Misra H., 1979, J. Biol. Chem., 254, 11623-11628.
- [18] Misra H., Fridovich I., 1972, J. Biol. Chem., 247, 3170-3175.
- [19] Miura T., Ogawa N., Ogiso T., 1978, Chem. Pharm. Bull. Tokyo, 26, 1261-1266.
- [20] Stegeman J., Binder R., Orren A., 1979, Biochem. Pharm., 28, 3431-3439.
- [21] Steinman H. M., Abernathy J. L., Hill R. L., 1974, J. Biol. Chem., 249, 7339-7347.
- [22] Wdźięczak J., Zaleśna G., Bartkowiak A., Witas H., Leyko W., 1981, Comp. Biochem. Physiol., 68B, 357-358.
- [23] Weber K., Osborn M., 1969, J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.

Zakład Biofizyki
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ

Anna Bartkowiak, Kazimierz Studzian

COMPARATIVE STUDIES ON SUPEROXIDE DISMUTASE FROM COD AND PORCINE LIVER

Cytosol superoxide dismutase was isolated from cod liver and some new conditions of enzyme preparation and purification were established. Chemical composition and some physicochemical characteristics of cod SOD were described. Effects of DDC, cyanide and heat on the enzyme activity and its absorption spectrum were tested. The obtained results for cod liver SOD were compared with parallel analysis of porcine liver dismutase. Some distinct differences concerned with changes of SOD activity induced by temperature were observed.