

7. Коваленко В. И., Липтев А. В. IV съезд ВОГИС им. Н. И. Вавилова. Тез. докл., 2, 218—219, Кишинев, 1982.
8. Коваленко В. И., Сметанин Н. И., Липтев А. В. В кн.: Селекция и генетика кормовых культур. 109—118, Новосибирск, 1983.
9. Нервахина Н. В. Проблемы морфологии и биологии цветка. 1—171, Л., 1970.
10. Тахтаджян А. Л. Происхождение и расселение цветковых растений. 1—146, Л., 1970.
11. Уильямс У. Генетические основы селекции растений. 1—148, М., 1968.
12. Шумный В. К., Коваленко В. И., Кавасова Э. В., Колосова Л. Д. Генетика, 14, 1, 25—35, 1978.
13. Эллиот Ф. Селекция растений и цитогенетика 1—147, М., 1961.
14. Buchholz J. T., Williams L. F., Blakeslee A. F. Proc. Nat. Acad. Sci., 21, 12, 651—656, 1935.
15. Crowe L. K. Heredity, 19, 3, 435—457, 1964.
16. Hogenboom N. G. Euphytica, 21, 2, 228—243, 1972.
17. Lamm R. Hereditas, 36, 4, 509—511, 1950.
18. Lesley Y. W. J. Heredity, 15, 5, 233—235, 1924.
19. Levin D. A. Taxon, 20 (1), 91—113, 1971.
20. Lewis D., Crowe L. K. Heredity, 12, 2, 233—256, 1958.
21. Martin F. W. Genetics, 50, 3, 459—469, 1964.
22. McGuire D. C., Rick C. M. Hilgardia, 23, 4, 101—124, 1954.
23. Ostensfeld C. H. Hereditas, 12, 33—40, 1929.
24. Rick C. M. Evolution, 4, 110—122, 1950.
25. Rick C. M. Evolution, 17, 2, 216—232, 1963.
26. Rick C. M., Dempsey W. H. Bot. Gaz., 130, 3, 180—186, 1959.
27. Rick C. M., Holle M., Thorp R. W. Plant Syst. and Evol., 129, 1—2, 31—44, 1978.
28. Whitehouse H. L. K. Ann. Bot. N. Y., 14, 54, 199—216, 1950.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXIX, № 2, 1986

УДК 577.1:576.8.097

## ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ L-АЛАНИНА И L-ГЛУТАМАТА В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ У-42

Л. Е. ЛАЧИНЯН, М. Б. АТАНЕСЯН

Аланин- и глутаматагидрогеназы в бесклеточных экстрактах дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 активируются при наличии в реакционной среде двухвалентных ионов металлов в концентрации  $10^{-3}$  М в следующем убывающем порядке:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ . ЭДГА в той же концентрации на 50% подавляет активность дегидрогеназ. Предполагается, что дрожжевые аланин- и глутаматдегидрогеназы нуждаются в  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  для проявления оптимальной активности.

*Ключевые слова:* ионы двухвалентных металлов, окислительное дезаминирование, L-глутамат, L-аланин, дрожжи.

Доказано, что неочищенные препараты аланин- и глутаматдегидрогеназ (АДГ и ГДГ) из бесклеточных экстрактов дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 катализируют реакции восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутарата и пирувата, а также окислительного

дезаминирования L-аланина и L-глутамата, что нашло подтверждение как в данных о приросте аммиачного и общего азота, так и убыли и прибыли восстановленных коферментов НАД(Н) и НАДФ(Н) [1, 3]. Была также доказана их субстратная индукция как в отношении катаболических, так и анаболических изоферментов [2—4]. Известно, что на активность ГДГ и АДГ различного происхождения весьма существенное влияние оказывают ионы металлов. Так, ГДГ из *Leptospira* много (ряски) стимулируется  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{La}^{++}$ , ЭДТА (этилендиамин тетраацетат) полностью подавляет активность фермента [6]. Даже ничтожные количества  $\text{Ca}^{++}$ , но не  $\text{Mg}^{++}$ , практически полностью реактивировали ГДГ, утратившую активность при пропускании ферментных препаратов через колонку с сефадексом G-50 [7]. Внесение 2 мМ  $\text{ZnSO}_4$  в бесклеточный экстракт *V. coryneae* с ингибирующей посредством ЭДТА ГДГ, специфичной к НАДФ, полностью восстанавливает активность фермента [5]. Очищенная АДГ из *Halobacterium salinarum* в реакции окислительного дезаминирования L-аланина проявляет абсолютное требование к присутствию  $\text{K}^+$ , тогда как в обратной реакции восстановительного аминирования  $\text{K}^+$  можно заменить  $\text{Na}^+$  или  $\text{NH}_4^+$  и отчасти  $\text{Cs}^+$  и  $\text{Li}^+$  [8].

В настоящей работе представлены результаты исследования влияния двухвалентных ионов металлов ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ) а также ЭДТА на процессы дегидрогенизации L-аланина и L-глутамата в реакциях окислительного дезаминирования, осуществляемого в присутствии НАДФ в бесклеточных экстрактах дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42.

**Материал и методики.** Объектом исследований служил представитель рода *Candida* *Candida guilliermondii* ВКМ У-42, полученный из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. Методика выращивания дрожжей, получение гомогената и бесклеточного экстракта описаны в предыдущих работах [1, 3, 6]. Использовались реактивы фирмы «Reanal» (Венгрия).

Таблица 1  
Влияние хранения гомогената на интенсивность восстановления НАДФ в реакциях окислительного дезаминирования L-аланина и L-глутамата, мкМ НАДФН на 1 мг белка

Варианты проб	Длительность хранения белка, мин					
	15		30		45	
	$E_3-E_0$	НАДФН	$E_3-E_0$	НАДФН	$E_3-E_0$	НАДФН
Экстракт + НАДФ	0.055 ± 0.013	0.25	0.050 ± 0.012	0.21	0.047 ± 0.017	0.30
Экстракт + НАДФ + L-аланин	0.085 ± 0.011	0.38	0.035 ± 0.015	0.23	0.095 ± 0.015	0.43
Экстракт + НАДФ + L-глутамат	0.095 ± 0.015	0.43	0.075 ± 0.017	0.34	0.075 ± 0.016	0.31

Таблица 2

Влияние двухвалентных ионов металлов на процессы восстановления НАДФ в присутствии L-аланина и L-глутамата, мкМ НАДФН на 1 мг белка

Вариант	Без ионов	При внесении ионов металлов, $10^{-3}$ М				
		Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Co <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup>	Mo <sup>++</sup>
Среда выращивания (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + глюкоза)						
Экстракт + НАДФ	0.25±0.03	0.29±0.016	0.25±0.014	0.27±0.013	0.27±0.015	0.25±0.014
Экстракт + НАДФ + L-ала	0.38±0.015	0.63±0.014	0.59±0.017	0.59±0.015	0.52±0.018	0.51±0.010
Экстракт + НАДФ + L-глу	0.43±0.017	0.68±0.015	0.63±0.019	0.57±0.010	0.55±0.011	0.60±0.010
Среда выращивания (L-аланин + глюкоза)						
Экстракт + НАДФ	0.25±0.014	0.27±0.013	0.30±0.010	0.26±0.012	0.27±0.014	0.25±0.017
Экстракт + НАДФ + L-ала	0.53±0.016	0.68±0.017	0.64±0.017	0.58±0.015	0.52±0.013	0.60±0.018
Экстракт + НАДФ + L-глу	0.36±0.017	0.43±0.014	0.40±0.018	0.35±0.014	0.36±0.017	0.39±0.015

Для определения ферментативной активности по реакции восстановления НАДФ в результате окислительного дезаминирования L-аланина и L-глутамата использовалась реакционная смесь, содержащая 25 мкМ L-аминокислот, 2,5 мкМ НАДФ, растворенных в 0,1 М  $K_2HPO_4$ -фосфатном буфере, pH 7,4, и 1 мл дрожжевого экстракта — сульфатанта, содержащего от 0,6 до 1 мг белка, определяемого по Лоури [9]. Общий объем реакционной смеси — 3 мл. Ферментативную активность определяли по прибавке оптической плотности восстановленного НАДФ (Н) при 340 нм в спектрофотометре СФ-4 (кювета — 1,0) в течение 3 минут. Контрольные пробы содержали все компоненты, за исключением аминокислот. Биомасса дрожжей выращивалась на синтетической среде ( $NH_4^+$ -глюкоза), а также на среде, содержащей в качестве единственного источника азота L-аланин (L-ала+глюкоза). Двухвалентные ионы металлов в виде хлоридов и ЭДТА вносились в конечной концентрации, равной  $10^{-3}$  М.

**Результаты и обсуждение.** В первой серии экспериментов исследовалось влияние хранения гомогената ( $4^\circ$ ) на активность ГДГ и АДГ. Данные табл. 1 показывают, что по мере увеличения времени хранения активность указанных дегидрогеназ падает, что характерно для окислительно-восстановительных ферментов.

Данные о влиянии двухвалентных ионов металлов, представленные в табл. 2, показали, что восстановление НАДФ в их присутствии в зна-

Таблица 3

Влияние ЭДТА на процессы восстановления НАДФ в присутствии L-аланина и L-глутамата, мкМ НАДФ/Н на 1 мг белка

Вариант	Без ЭДТА (Контроль)	С ЭДТА, $10^{-3}$ М
Среда выращивания ( $NH_4^+$ + глюкоза)		
Экстракт + НАДФ	0,25±0,013	0,010±0,009
Экстракт + НАДФ + L-аланин	0,38±0,015	0,013±0,012
Экстракт + НАДФ + L-глутамат	0,43±0,017	0,015±0,014
Среда выращивания (L-аланин + глюкоза)		
Экстракт + НАДФ	0,25±0,014	0,19±0,010
Экстракт + НАДФ + L-аланин	0,53±0,016	0,20±0,014
Экстракт + НАДФ + L-глутамат	0,46±0,017	0,15±0,010

чительной степени стимулируется при дезаминировании как L-аланина, так и L-глутамата. Указанные ионы металлов по своему воздействию на изучаемые реакции можно расположить в следующем нисходящем порядке  $Ca^{++} > Mg^{++} > Mn^{++} > Zn^{++} > Co^{++}$ . Как правило, стимулирующее влияние выражено сильнее в отношении L-глутамата, и лишь в индуцированных L-аланином культурах в реакции окислительного дезаминирования оно сильнее для L-аланина. Наибольшее стимулирующее влияние оказывают ионы кальция, наименьшее — ионы кобальта. Следовательно, для повышения активности дрожжевых препаратов АДГ и ГДГ необходимо наличие в реакционной среде ионов кальция или магния.

Для подтверждения наших выводов о влиянии ионов металлов на процессы восстановления НАДФ в присутствии L-аланина и L-глутамат-

та эти же реакции изучались в присутствии ЭДТА в концентрации  $10^{-3}$  М (табл. 3).

Сильное подавление (более чем на 50%) активности восстановления НАДФ в присутствии L-аланина и L-глутамата под влиянием ЭДТА данной концентрации еще раз подтверждает необходимость внесения в реакционную среду двухвалентных ионов металлов и согласуется с литературными данными в отношении других объектов [5, 6, 10].

Ереванский государственный университет,  
кафедра биохимии

Поступило 29 XI 1985 г.

ԵՐԻՎԱՆԵՏ ՄԵՏԱԳՆԵՐԻ ԻՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՏՈՒԹՅՈՒՆԸ L-ԱԼԱՆԻՆԻ ԵՎ  
L-ԳԼՈՒՏԱՄԱՏԻ ՕՔՍԻԴԱՏԻՎ ԴԵՊՏՄԵՆԱՑՄԱՆ ՎՐԱ CANDIDA  
GUILLIERMONDII BKM Y-42 ՆՄՈՐԱՆԿՆԵՐԻ ԱՆՔՋԻՋ ԷՔՍՏՐԱԿՏՆԵՐՈՒՄ

Լ. Ե. ԼԱՇԻՆՅԱՆ, Մ. Բ. ԱԹԱՆԵՍՅԱՆ

*Candida guilliermondii* BKM Y-42 խմորասնկերի էքստրակտում հայտնաբերված ալանին և գլուտամատգեհիրոզենազները ակտիվանում են երկվալենտ մետաղների իոնների ( $10^{-3}$  М կոնց) ատկայությամբ հետևյալ կարգով.  $Ca^{++} > Mg^{++} > Mn^{++} > Zn^{++} > Co^{++}$ :

ЭДТА-ի նույն կոնցենտրացիան 50 %-ով ճնշում է դեհիդրոգենազների ակտիվությունը:

Ստացված փորձնական տվյալներից հանդում ենք այն եզրակացության, որ խմորասնկային ալանինի և գլուտամատգեհիրոզենազների օպտիմալ ակտիվության համար պահանջվում են  $Ca^{++}$  կամ  $Mg^{++}$ :

EFFECT OF TWO VALENCY IONS OF METALS ON THE  
OXIDATIVE DESAMINATION OF L-ALANINE AND L-GLUTAMATE  
IN THE CELL-FREE EXTRACTS OF *CANDIDA GUILLIERMONDII*  
BKM Y-42 YEASTS

L. E. LATSCHINJAN, M. B. ATHANESJAN

Alanine- and glutamate dehydrogenases, found in the uncellular extracts of the yeasts *Candida guilliermondii* BKM Y-42 are activated by ions with valency II ( $C=10^{-3}$  M) in the following manner:  $Ca^{++} > Mg^{++} > Mn^{++} > Zn^{++} > Co^{++}$ .

The same concentration of EDTA suppresses the dehydrogenases activity by 50 per cent.

It can be concluded from the experimental results that the yeast alanine and glutamate dehydrogenases require  $Ca^{++}$  or  $Mg^{++}$  for the optimal activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979
2. Давтян М. А., Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 24, 5, 1975.
3. Инджикян С. М. Уч. зап., ЕГУ, 1, 119, 1969.

4. Лачинян Л. Е., Цатурян С. С., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 29, 4, 1976.
5. Verma N. S., Sharma D., Gollakota A. Indian J. Biochem and Biophys, 139, 1, 99, 1976.
6. Ehmke A., Hachmann Th. Phytochemistry, 15, 11, 1611, 1976.
7. Towole M. O., Boulter D. Planta, 134, 1, 97, 1977.
8. Kim E., Flitt P. Biochem J., 161, 2, 1977.
9. Lawry O. M., Rosenbrough M. S., Farra A., Randal R. S. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
10. Ehmke A., Hartmann Th. Phytochemistry, 17, 4, 637, 1978.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXIX, № 2, 1985

УДК 576.312.32/33

## КЛИНИКО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МОЗАИЧНЫХ АНОМАЛИЙ КАРИОТИПА

Н. П. КУЛЕШОВ, И. В. СИМОНЯН

Разработана схема проведения цитогенетического анализа с учетом диагностики мозаицизма при клинико-цитогенетических исследованиях.

*Ключевые слова* — аменорея, мозаицизм, ступенчатый анализ.

Цитогенетическая диагностика аномалий кариотипа гаметического происхождения, когда хромосомный набор всех клеток сформирован одинаково, не представляет больших трудностей. Обычно для их выявления требуется анализ не более 5—7 клеток. Трудности в диагностике связаны с аномалиями мозаичного типа, возникающими на стадии постзиготического деления. Организм в этом случае сформирован двумя, тремя и более клонами клеток с различной хромосомной конституцией, закрепившихся в онтогенезе клеточной селекцией. Соотношение клеточных клонов может варьировать в широких пределах и зависит от стадии развития зиготы, на которой произошло нарушение. Анализ литературных данных показывает, что в большинстве описанных случаев мозаицизма отношение одного из клонов к остальным составляет не менее 10% [1, 2], при этом их основная часть обусловлена аномалиями в системе половых хромосом. Распространенными формами мозаицизма являются варианты XO/XX, XO/XU, XU/XXU, XO/XXX и другие [2, 7], концентрирующиеся у больных с акушерско-гинекологической и эндокринной патологией.

Ранее нами были изложены принципы диагностики мозаицизма применительно к популяционно-цитогенетическим исследованиям, охватывающим большие группы популяций [3, 5]. Они не могут быть применены к условиям клинико-цитогенетического исследования, так как здесь требуется исключительно точная постановка диагноза.

В настоящей работе приводятся основные методические особенности проведения цитогенетического анализа с учетом диагностики мозаицизма при клинико-цитогенетических исследованиях.