

тивных способов управления активностью этой рефлекторной дуги в норме и в условиях воздействия экстремальных факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березовский В. К., Кебкало Т. Г., Савоскина Л. А. *Нейрофизиология*, 3, 353—362, 1984.
2. Вальберг Ф., Броуэл А., Поженко О. Вестибулярные ядра, связи, анатомия, функциональные корреляции. 163, М.—Л., 1966.
3. Григорян С. С., Нагичян Л. Г. Микроэлектрофизиологический анализ вестибулярных проекций в гипоталамусе кролика. XIII съезд Всесоюз. физиол. об-ва им. И. П. Павлова. 2, Алма-Ата, 1979.
4. Григорян С. С. Сравнительный анализ проекций вестибулярного и седативного нервов в различных областях гипоталамуса. XIV съезд Всесоюз. физиол. об-ва им. И. П. Павлова, Баку, 1983.
5. Куршаван А. Е., Бабин В. П. Физиологические функции вестибулярной системы. М., 1975.
6. Радцев В. С., Шляхосенко А. А. *Физиол. ж. СССР*, 58, 3, 377—384, 1972.
7. Саркисян В. А., Фанарджян В. В. Систематические механизмы афферентного контроля активности нейронов латерального вестибулярного ядра Дейтерса. Эффекты стимуляции ядер ретикулярной формации ствола мозга. Сенсорные системы, 1, 1, 370—380, 1987.
8. Саркисян В. А., Фанарджян В. В. *Нейрофизиология*, 16, 6, 822—829, 1984.
9. Фифковн Е., Маршал Дж. Стереотаксические атласы мозга кошки, кролика и крысы. Я. Буриш, П. Петрань, Н. Захар. Электрофизиологические методы исследования. 384—426, М., 1968.
10. Smith A. P., Mogg D. *Lancet*, 1, 403, 1966.
11. Katayama T., Yoshimatsu H., Pashiraya K. P. and Oomura Y. Neuronal input from the lateral vestibular nucleus to the lateral, hypothalamic area in rats. Kyushu University Faculty of Medicine, Department of Physiology, Fukuoka Japan, 1987.

Поступило 14.IV 1989 г.

Биол. журн. Армении, № 6, (43), 1993

УДК 577.154.3

АФФИННАЯ ОЧИСТКА ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ ПОЧЕК КРОЛИКА. ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ НЕКОТОРЫХ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

А. Б. АНАНЬЕВА, Ж. И. АКОНЯН, Р. Г. МЕЛИК-ОГАНДЖАНИН*,
Ю. А. МАУРИНЬШ**, Р. А. ПАЗГЛЕ**, М. Ю. ЛИДАК**

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван,

*Институт тонкой органической химии им. Мнджояна АН АрмССР, Ереван,

**Институт органического синтеза АН Латвии, Рига

Разработан новый метод очистки пуриинуклеозидфосфорилазы (КФ 2.12.1), включающий биоспецифическую аффинную хроматографию. Впервые получены гомогенные препараты пуриинуклеозидфосфорилазы из почек кролика, выход—75% общей активности.

Изучено влияние 23 синтетических производных пуриновых нуклеозидов и родственных конденсированных пиримидиновых соединений на активность фермента.

Մշակված է պորիննուկլեոզիդֆոսֆորիլազի անբյուրեղյալ և որ մեթոդ, որն իր մեջ
ընդգրկում է սպեցիֆիկ աֆֆինային քրոմատոգրաֆիա:

Сокращения: ПНФ-аза—пуриинуклеозидфосфорилаза.

Առաջին անգամ ստացված է պուրիննուկլեոզիդֆոսֆորիլազի նախաձևն պարա-
րաստով՝ Շազարի երկիամիջ, ընդհանուր ակտիվության հիշում— 75%։ Ուսում-
նասիրված է 23 պուրինային և ուկլեոզիդների սինթետիկ անանցյալների և կոն-
դենսացված պիրիմիդինային ազգակցական միացությունների ազդեցությունը
ֆերմենտի ակտիվության վրա։

The method of purification of purine nucleoside phosphorylase (EC—2.4.2.1),
including biospecific affinity chromatography, has been developed. The
electrophoretically homogenous enzyme is obtained with 75% yield.

The effect of 23 synthetic derivatives of purine nucleosides and re-
lative condensity pyrimidine compounds on enzyme activity is studied.

Пуриннуклеозидфосфорилаза—аналоги природных субстратов.

Пуриннуклеозидфосфорилаза (КФ 2.4.2.1) играет принципиальную роль в усвоении клеткой нуклеотидов и нуклеозидов. Фермент катализирует обратимую реакцию фосфорилиза пуриновых (дезоксид) рибонуклеозидов с образованием (d) Rib-1-P и соответствующих оснований, которые служат основным источником пуринов. Он выделен был из разных органов и тканей млекопитающих [11, 12].

Наиболее удачные из описанных методы очистки включают аффинную хроматографию, при которой в качестве лиганда использовались аналоги инозина. В качестве первого аффинного лиганда был применен периодат-окисленный формицин Б, связанный с сефарозой 4Б [8, 15]. Применение колонки с этим аффинным сорбентом сразу после единственного этапа ионно-обменной хроматографии позволяет получить гомогенные препараты из эритроцитов человека [9, 15], фибробластов [16] и гранулоцитов [14], а также из печени крысы [8] и цыпленка [13]. Второй из двух известных аффинных лигандов, 6-гидрокси-9-р-бензилламинопуриин, связанный на трихлоротриазин активированной сефарозе С1-6В, был использован для очистки ПНФ-азы из эритроцитов человека [10].

Разработка и совершенствование новых эффективных методов очистки ПНФ-аз из различных источников актуальны в связи с интенсивным поиском малотоксичных ингибиторов этого фермента. Некоторые из них уже находят применение в создании селективного Т-клеточного иммунодефицитного статуса организма при трансплантации органов и тканей, а также при химиотерапии ряда патологий [1]. Но для успешного практического применения необходимо глубокое знание структуры, функций, аффинности как ПНФ-азы человека, так и фермента из органов тех лабораторных животных, на которых будут испытываться препараты. С нашей точки зрения, удобным объектом для этой цели является кролик, так как ПНФ-аза кролика по своим физико-химическим свойствам и субстратной специфичности имеет большое сходство с ферментом человека [3, 11, 15].

Нами разработан новый метод очистки ПНФ-азы почек кролика с применением биоспецифической аффинной хроматографии, проверена способность к ингибированию фермента некоторыми аналогами пуриннуклеозидов и конденсированных пиримидиновых соединений.

Материал и методика. Аффинный лиганд—9-(*p*-амилобензил) гипоксантин был синтезирован и любезно предоставлен нам д-ром А. Голи из Института органической химии и биохимии АН ЧССР. Соединения 1—13 были синтезированы и любезно предоставлены лабораторией синтетических лекарственных средств Института органического синтеза АН Латвии [4], соединения 14—23—лабораторией синтеза противоопухолевых препаратов Института тонкой органической химии им. Миджояна АН Арм. ССР [5].

Аффинный сорбент индивидуальной специфичности получали путем связывания 9-(*p*-амилобензил) гипоксантина на Вт CN-активированной сефарозе 4В. Для этого к матрице Вт CN-активированной сефарозы 4В в качестве спейсера присоединяли 6-аминокапроновую кислоту в буфере А, содержащем 100 мМ NaHCO_3 — NaCO_3 , pH 9,0 и 0,5М NaCl (перемешивая при комнатной температуре в течение 10 ч). Отношение 6-аминокапроновой кислоты к матрице составляло 20 мкмоль/1 мл. Затем матрицу с присоединенным к ней спейсером дважды промывали растворами в следующей последовательности: 0,1 М Na -ацетат (pH 4); буфер А; H_2O . Для создания прочной пептидной связи между свободной аминогруппой лиганда и свободной концевой карбоксильной группой спейсера использовали карбодимид, катализирующий эту реакцию. Стандартная процедура включала следующие процедуры: гель промывали разбавленным до 50% и подкисленным до pH 4,5 диоксаном (0,5 л); лиганд растворяли (50 мкмоль/мл геля) также в 50%-ном диоксане (pH 4,5); карбодимид—в воде, доводя pH до 4,5 разбавленным HCl . Концентрацию карбодимида брали из расчета 10 мг на 1 мл геля. Растворы лиганда, карбодимида и геля смешивали и контролируя pH, оставляли при комнатной температуре на магнитной мешалке. После 20-часового перемешивания оставшиеся спейсеры блокировали давлением этаноламина, а затем обильно промывали 50%-ным этанолом и использованными буферами, а также буфером Б, содержащим 20 мМ трис- HCl (pH 7,6) и 2 мМ ЭДТА, перед нанесением на аффинный сорбент фермента.

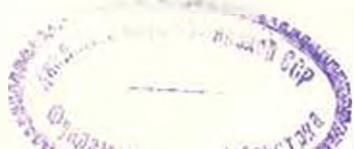
Перед нанесением на аффинную колонку экстракт из почек кролика подвергали предварительной очистке, повторяя первые два этапа (осаждение сульфатом аммония и хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой), описанного ранее выделения [2]. Затем активные фракции объединяли и наносили на колонку (0,9×7,1) с сефарозой 4В, иммобилизованной аффинным лигандом—9-(*p*-амилобензил) гипоксантином. Колонку промывали сначала 250 мл буфера Б, затем 100 мл того же буфера, содержащего 0,5М NaCl . После такой промывки связанная с сорбентом ПНФ была элюирована буфером В, содержащим 40 мМ NaH_2PO_4 — NaOH (pH 6,9) и 4 мМ инозина. Объединенные активные фракции диализовали против 100-кратного объема буфера Б в течение 20 ч с четырьмя сменами диализного буфера. Диализованный препарат фермента концентрировали, используя колонку (0,9×2,5 см) с гидроксильцеллюлозой, как описано ранее [12]. Скоцентрированный препарат ПНФ из почек кролика хранили в 40%-ном глицерине при -18° .

Ферментативную активность в процессе очистки определяли калориметрически по температуре гуанина (по цветной реакции этого основания с реактивом Фолина) [6].

Все пуриновые и конденсированные пиримидиновые производные были изучены на способность ингибировать реакцию фосфорилиза гуанозина. При этом фосфоролитическую активность фермента определяли спектрофотометрически (на двухлучевом спектрофотометре Specord M 40 (ГДР) с термостатируемой кюветой) по изменению поглощения вследствие различий в молярной абсорбции субстрата и продукта ($\lambda = 258$ нм). Концентрация аналога в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Na -фосфата (pH 7,0), составляла 0,1 мМ и превращала концентрацию субстрата—гуанозина в 4 раза.

Реакции фосфорилиза нуклеозидов проводили при 37°, за единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Во всех спектральных исследованиях использовали кварцевые кюветы с длиной пробега 1 см. Объем реакционной смеси составлял 2 мл. Концентрацию белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Электрофорез в ПААГ проводили при ранее описанных условиях [2].

В экспериментах были использованы: гуанозин, инозин, ксантозин, гипоксантин,



гуанин, ксантин, набор маркерных белков, трис, 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид, активированный уголь, ксантиноксидаза (уд. акт—1 Е/мг) производства фирмы «Серва» (ФРГ), DS-Na—«Сигма» (США), ВгСN-активированная сефароза 4В-«Фармация» (Швеция); ДЭАЭ-целлюлоза ДЕ-32 «Ватман» (Англия), глицерин—«Мерк» (ФРГ), кумалес R-250—«Форак» (Зап. Берлин), набор реактивов для электрофореза—«Реал» (ВНР).

Результаты и обсуждение. Большинство изученных к настоящему времени ПНФ из различных биологических объектов были выделены с помощью многоступенной очистки, включающей фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и гидроксилапатите с небольшими модификациями [11, 12]. Ранее нами были использованы эти подходы при получении гомогенных препаратов ПНФ из эмбрионов и различных органов кролика [3]. Из почек кролика был выделен гомогенный препарат фермента с удельной активностью 12,3 Е/мг и с 26%-ным выходом общей активности [2].

Биоспецифическая аффинная хроматография ПНФ из почек кролика на колонке с ВгСN активированной сефарозой, иммобилизованной лигандом—9(р-аминобензил) гипоксантином, впервые осуществленная в данном исследовании, оказалась гораздо более эффективной.

Таблица 1. Схема аффинной очистки ПНФ из почек кролика

Этапы очистки	Объем, мл	Общая активность	Общая белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	95	17,3	761,5	0,023	100	1
Осаждение сульфатом аммония	57	15,7	325,6	0,048	91	2,1
ДЭАЭ-целлюлоза	35	14,8	77,4	0,191	86	8,3
Аффинная хроматография	8	12,9	0,7	19,4	75	847

Как видно из табл. 1, при использовании такой очистки удалось получить около 75% выхода общей активности, что почти в 3 раза выше, чем при традиционной многоступенной очистке. Данные литературы также указывают на то, что без использования аффинной хроматографии при очистке не удается избежать больших потерь и выход составляет от 5 до 36% [11, 12]. Удельная активность полученного препарата фермента 19,4 Е/мг также значительно выше аналогичного показателя полученного ранее препарата (12,3 Е/мг).

Большим преимуществом данного метода является также то, что аффинный гель можно использовать многократно без видимой утраты специфичности. Электрофорез очищенного препарата ПНФ из почек кролика выявил одну белковую полосу, совпадающую с ПНФ активностью, что говорит о высокой степени гомогенности полученного препарата.

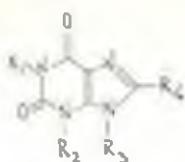
Аффинный лиганд—9(р-аминобензил) гипоксантин является аналогом инозина и конкурентно ингибирует фермент с $K_i=2 \times 10^4$ [7]. Бензильная группа иммобилизованного ингибитора эффективно связывается, по-видимому, в том участке активного центра, с которым обычно связываются рибоза или дезоксирибоза. В условиях отсутствия

фосфатных ионов ПНФ настолько хорошо связывается с гелем, что выдерживает промывку колонки буфером с очень высокой молярностью, содержащим свыше 0,5 М NaCl. При этом элюируются неспецифически связанные белки. Ионы фосфата (одного из субстратов) ослабляют связывание ПНФ с аффинным гелем и уменьшают емкость колонки. Поэтому удавалось элюировать фермент буфером, содержащим 1 М NaCl и 200 мМ фосфат, но пик элюции при этом был намного шире, чем при пропускании через колонку инозин-фосфатного буфера. Полученный гомогенный препарат ПНФ из почек кролика был использован нами при исследовании влияния на его активность некоторых отдаленных аналогов природных субстратов.

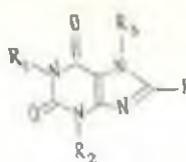
Была проверена группа производных мочевой кислоты и ксантина, гликозилированных триацетатом β -D-глюкофурануроно-6,3-лактона [4]. Ранее нами было показано [3], что скорость фосфороллиза ксантозина составляет всего 4% от скорости фосфороллиза инозина, т. е. кетогруппа в положении С (2) резко уменьшает сродство пуринового нуклеозида с ПНФ. Наша задача заключалась в проверке возможности предотвращения этого уменьшения некоторыми замнами в положениях 1, 3, 7, 9 гетероциклического основания (табл. 2). Спектральное исследование аналогов ксантозина было сопряжено с некоторыми объективными трудностями из-за невозможности использования наиболее чувствительного метода определения активности фермента по приросту гипоксантина в сопряженной с ксантиноксидазой реакции ввиду того, что многие аналоги легко вступают во взаимодействие с ксантиноксидазой и окисляются ею. Поэтому эти соединения были изучены только в прямом спектральном исследовании на способность ингибировать реакцию фосфороллиза гуанозина. Результаты показывают, что проведенные модификации не обеспечивают аналогам ксантозина способности значительно подавлять реакцию фосфороллиза гуанозина (табл. 2), хотя, как было показано ранее, аналогичные замены приводят к повышению аффинности производных инозина и гуанозина [7, 17]. Видимо, кислотность ксантозина ($pK_a=5,7$) может мешать связыванию с ферментом. Возможно также, что гидроксильная группа в положении С (2) взаимодействует с углеводным остатком, мешая связыванию с активным центром фермента. Метилирование положений N (1) и N (3) также не приводит к усилению ингибирования этими аналогами. Это можно объяснить, видимо, тем, что метил-группы в этих положениях не воздействуют на ароматические свойства пуринового кольца гетероциклического основания и не влияют на сродство аналогов ксантозина с ферментом.

Были исследованы также отдаленные аналоги пуринов—конденсированные пиримидиновые соединения (14—23 из табл. 3 и 4). Пирроло-2,3-пиримидины несколько сильнее влияют на активность ПНФ, чем соединения 14—19 из табл. 3, но ингибирующий эффект настолько незначителен, что какие-либо выводы о связи химической структуры этих соединений с их биологической активностью делать преждевременно. Однако исследование таких соединений, по своему строению отдаленно напоминающих природные субстраты ПНФ-азы и не обла-

Таблица 2. Ингибирование фосфоролитической активности ПНФ производными мочевой кислоты и ксантина



1, 2, 11



3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13

№	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	% ингибирования
1	H	H	Glf ^{Ac}	H	7
2	H	H	Glf ^{Ac}	H	12
3	CH ₃	CH ₃	Glf ^{Ac}	H	14
4	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Glf ^{Ac}	H	9
5	H	Glf ^{Ac}	H	OH	8
6	C ₂ H ₅	CH ₃	Glf(Na)	H	3
7	H	H	Glf	H	6
8	H	H	Glf	H	17
9	CH ₃	CH ₃	Glf	H	3
10	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Glf	H	7
11	H	H	Rib	OH	10
12	H	Rib	Rib	OH	11
13	H	H	Rib	OH	16

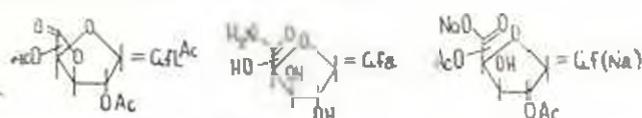
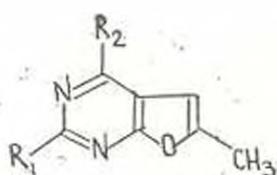


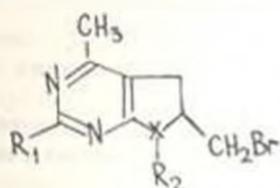
Таблица 3. Ингибирование фосфоролитической активности ПНФ конденсированными фуру [2,3-d] пиримидинами



№	R ₁	R ₂	% ингибирования
14	NHNC ₆ H ₄ F	CH ₃	5
15	NHNC ₆ H ₄ NO ₂	CH ₃	5
16	CH ₃	CH ₂ NHC ₆ H ₄	7
17	CH ₃	CH ₂ NHC ₆ H ₄ NO ₂	6
18	OH	CH ₃	7
19	N(CH ₃) ₂	CH ₃	6

дающих сильным ингибирующим действием, все же необходимо, так как дальнейшее направление работы предполагает компьютерный анализ соотношений между химической структурой аналогов пурин-нуклеозидов и их биологической активностью. Для этого необходимо

Таблица 4. Ингибирование фосфоролитической активности ПНФ конденсированными пирроло [2,3-d] пиримидинами



№	R ₁	X	R ₂	% ингибирования
20	SCH ₃	O	—	13
23	NH ₂	O	—	11
22	CH ₃	N	—	14
23	H	N	—	9

определенный набор статистических данных по конденсированным, обладающим различной конформацией и ингибиторной способностью. После проведения такого анализа можно будет целенаправленно синтезировать гораздо более эффективные ингибиторы ПНФ-азы и создавать на их основе новые лекарственные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амалян А. В., Амалян Ж. И. Журн. эксперим. и клин. мед. АН АрмССР, 29, 3, 266—273, 1989.
2. Амалян А. В., Бедикян Х. О., Амалян Ж. И. Биолог. журн. Армении, 19, 9, 768—772, 1986.
3. Амалян А. В., Бедикян Х. О., Амалян Ж. И. Биохимия, 22, 12, 2022—2028, 1987.
4. Мауриньш Ю. А., Пазыл Р. А., Лудак М. Ю., Каацок Е. И., Митийданура Н. А. Биоорганическая химия, 12, 11, 1514—1521, 1985.
5. Мелик-Оганджян Р. Г., Гипоян А. С., Хачатрян В. Э., Мовсисян Н. С. Химия гетероцикл. соединений, 5, 678—681, 1985.
6. Ahmad S. J., Pritchard R. H. Mol. and Genet. Evol., 351—357, 1969.
7. Anan'ev A. V., Abovyan Zh. I., Zhuk R. A., Madre M. A., Martins J. 2-nd International Symposium on molecular aspects of chemotherapy, 63, Gdansk, 1988.
8. Cowen M. E., Oegami T. R., Sandberg J. N., Drach J. C. Fed. Proc., 35, 376—380, 1976.
9. McRoberts J. A., Martin D. W. Jr. J. Biol. Chem., 253, 12, 5605—5615, 1980.
10. Osborn W. R. A. J. Biol. Chem., 257, 15, 7097—7092, 1980.
11. Purks R. E. Jr., Agarwall R. P. In: The Enzymes, New York, Acad. Press., 7, 493—514, 1972.
12. Stoeckler J. D. In: Developments in cancer chemotherapy, CRC Press., 35—60, 1984.
13. Umemura S., Nishiku T., Murakami K., Tsushima K. J. Biol. Chem., 257, 22, 13374—13378, 1982.
14. Wiginton D. A., Coleman M. S., Hutton J. J. J. Biol. Chem., 253, 6667—6669, 1980.
15. Zannis V., Doyle D., Martin D. W. Jr. J. Biol. Chem., 253, 2, 504—510, 1978.
16. Zannis V., Gudas L. J., Martin D. W. Jr. Biochem. Genet., 17, 7—8, 621—630, 1979.
17. Zhuk R., Madre M., Anan'ev A. V., Abovyan Zh. I. 16th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (IUPAC), Kyoto, Japan, 661, 1988.

Поступило 16.III 1990 г.