

Таблица 1. Перенос супрессии ГЭТ клетками селезенки УФ-облученных иммунизированных животных

Обработка животных	Уровень ГЭТ, мм	Число мышей
УФ, сенси.	0.097±0.017	13
УФ сенси.	0.226±0.035	10
(+) контроль	0.260±0.023	10
(-) контроль	0.063±0.011	11

Таблица 2. Влияние УФ-облучения на время жизни аллотрансплантатоз кожи

Обработка животных	Время жизни трансплантатов, дни	Число мышей
УФ	14.18±0.26	17
Контроль	12.17±0.41	18

С57BL/6. Как видно из табл. 2, предварительное облучение реципиентов в течение 90 мин приводит к замедлению отторжения трансплантатов, несовместимых по H-2 антигенам.

В работах последних лет многие авторы указывают на потенциальную терапевтическую ценность модуляции иммунной функции, индуцированной УФ-облучением. Показано [6], что предварительное УФ-облучение подавляет индукцию экспериментального аллергического энцефаломиелита у мышей; однократное УФ-облучение подавляет реакцию трансплантат против хозяина [9], возможность индукции специфической толерантности к белковым антигенам путем аппликации антигена на облученный ультрафиолетом участок кожи [11]. Супрессия ответа к аллоантигенам, полученная нами, является еще одним примером терапевтического применения УФ-облучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Григорян Р. А., Акопян Т. Р., Залитян А. А. Журн. экпер. и клинич. медицины АН Армении, 5, 419—422, 1985.
2. Григорян Р. А., Асатрян Н. Г. Журн. экпер. и клинич. медицины АН Армении, 5, 426—430, 1990.
3. Гушина Л. А., Кудрявцева Г. В., Макаров С. А., Стрижак Н. Г. Лаб. дело, 4, 223—225, 1984.
4. Зарубина Н. В., Кривооручко В. И. Укр. биол. журн., 4, 437—439, 1982.
5. Taraji K., Okabe S., Sasaki R. Jap. J. Pharmacol., 19, 418—426, 1969.

Поступило 19.XII 1990 г

Биолог журн. Армении, № 2(45), 1992

УДК 591.1.05

## ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ ВНОСИТЕЗА ПРОЛИНА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС ПРИ ЛАКТАЦИИ

А. У. АГАДЖАНИЯ, М. А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

*Биосинтез пролина—молочная железа.*

Установлена четкая корреляция между активностями аргиназы и ферментов биосинтеза пролина—ОТ и П5КР в молочной железе лактирующих крыс [2], у тутового шелкопряда [1], личинок и жуков фасолевой зерновки [3] и при регенерации дождевого червя [4].

Сокращения: ОТ—орнитин—δ-трансаминаза—П5КР—пирролин-5-кербоксилактредуктаза.

Образование П5К при метаболизме арг и ори было доказано на срезах молочной железы лактирующих крыс [10]. Установлены также присутствие ферментов ОТ и П5КР в большинстве тканей и органов крыс [5].

В мозге мышей обнаружен транспорт арг во внутрь синапсом и превращение его в ори для синтеза пролина, глу и ГАМК [6]. Авторами убедительно доказано функционирование аргиназы и ферментативной системе биосинтеза пролина, глутамина и ГАМК в синаптических мозгах крыс и выявлен тонкий баланс между потоком метаболитов, концентрации которых регулируются как ингибированием их синтеза по принципу обратной связи, так и уровнем кофакторов.

ОТ печени птиц была очищена в 100 раз [13]. Пиридоксаль-5-фосфат является обязательным кофактором для проявления активности лишь очищенного фермента. ПХМБ ингибирует его активность на 60%.

Очищена и получена в кристаллическом состоянии ОТ из печени крыс с мол. массой 160.000—180.000 и изучены некоторые ее физико-химические свойства [9]. П5КР из хрусталика глаза крыс очищена почти до гомогенного состояния. Фермент является актомером с мол. массой каждого 30000 и ингибируется ионами  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , ПХМБ, НАДФ<sup>+</sup> и АТФ [12].

Настоящая работа посвящена очистке ферментов биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) молочной железы крыс при лактации.

*Материал и методики.* Используются белые крысы линии Вистар массой 150—180 г. Произведена очистка ферментов биосинтеза пролина (ОТ и П5КР) молочной железы крыс на 7 день лактации.

Активность ОТ и П5КР, а также содержание пролина определяли по описанному ранее методу [1], содержание белка в образцах—по методу Лоури [7].

*Результаты и обсуждение.* Очистка ОТ молочной железы крыс. Очистка ОТ осуществлена при температуре 0—4° поэтапно.

*1 этап. Экстракция фермента.* 15—20 г молочной железы гомогенизировали в 70 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,5) и центрифугировали при 27000 г 30 минут.

*2 этап. Высаливание.* Высаливание осуществляли при 50—65% ом насыщения сульфатом аммония. И хотя активность падала в 3 раза, вследствие удаления балластных белков удельная активность фермента возрастала более чем в 7 раз.

*3 этап. Тепловая обработка.* Надосадочную жидкость (10 мл) обрабатывали при 60° 1 мин в присутствии 50 мкг пиридоксаль-5-фосфата и 5 мкМ  $\alpha$ -КГ. Осевшие балластные белки удаляли центрифугированием при 12000 г 10 минут. В результате удаления активность повышалась в 3,5 раза.

*4 этап. Высаливание.* Высаливание осуществляли до 65%-ного насыщения сульфатом аммония. Осадок суспендировали в 4 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,5). При этом удельная активность фермента удваивалась.

*5 этап. Фракционирование на голубой сефарозе.* Надосадок переносили на колонку с голубой сефарозой. Уравнивание и элю-

цию проводили 0,005 М трис-HCl буфером (pH 7,4). Размеры колонки—1×20 см. Скорость элюции—1 мл за 2 мин. Собраны 20 фракций по 3 мл. В результате удельная активность фермента увеличивалась более чем в 6 раз.

*6 этап. Фракционирование на сефадексе G-150.* 3 мл из активных фракций переносили на колонку с сефадексом G-150. Уравновешивание и элюцию проводили тем же буфером, что и при фракционировании на голубой сефарозе. Размер колонки—2,5×40 см. Скорость элюции—1 мл за 3 мин. Собрана 21 фракция. Объем фракций—5 мл. ОТ выходила во фракциях 9—12.

Этапы очистки ОТ приведены в табл. 1.

Таблица 1. Очистки ОТ молочной железы крыс (7 день лактации)

Этапы	Общий белок, мг	Общая активность, мкМ про	Удельная активность	Выход фермента (%)	Степень очистки
Целый гематогенат	1430	365	0,19		
Высаливание сульфатом аммония (65%-ос)	73,6	106,5	1,44	29,1	7,5
Термообработка при 60°, 1 мин	23,2	119,3	5,14	32,6	27,0
Высаливание сульфатом аммония (65%-ос)	11,3	108,4	9,6	29,5	50,1
Фракционирование на голубой сефарозе (фракции 5—8)	2,25	39,6	17,7	10,9	93,1
Фракционирование на сефадексе G-150 (фракции 9—12)	1,10	37,2	33,8	10,1	177,8

Таким образом, получена ОТ со степенью очистки 178 и с выходом фермента 10%.

Очистка П5КР молочной железы крыс. Осуществлена поэтапно при температуре 22°.

*1 этап. Экстракция фермента.* 15—20 г молочной железы гомогенизировали в 70 мл 0,02 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 7 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5 ЕДТА и 10% глицерина (v/v), и центрифугировали при 12000 g 30 мин.

*2 этап. Высаливание.* Высаливание проводили сульфатом аммония до 40—60%-ной степени насыщения. Суспензию перемешивали 1 ч на магнитной мешалке, после чего осадок удаляли центрифугированием. Полученный осадок растворяли в минимальном количестве 0,02 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 7 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5 мМ ЕДТА и 10% глицерина (v/v). В результате удельная активность увеличивалась почти в 6 раз, хотя общая активность падала почти в 2,5 раза.

*3 этап. Диализ.* Препарат подвергали диализу в течение ночи против указанной буферной смеси. В результате этого удельная активность фермента увеличивалась в 2 раза.

*4 этап. Высаливание.* Высаливание осуществляли до 60—80%-ной степени насыщения. Остальные процедуры проводили, как на 2 этапе. Удельная активность П5КР увеличивалась почти в 2,5 раза.

5 этап. Фракционирование на голубой сефарозе. Надосадок был перенесен на колонку с голубой сефарозой, уравнированную 0,02 М калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 7 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5 мМ ЕДТА и 10% глицерина (v/v). Элюцию проводили 0,02 М калий-фосфатным буфером. Размеры колонки—1×20 см. Скорость элюции—1 мл за 2 мин. Были собраны 20 фракций по 3 мл. В результате фракционирования на колонке с голубой сефарозой удалось повысить удельную активность более чем в 2,5 раза.

6 этап. Фракционирование на сефидексе G-150. 3 мл из активных фракций переносили на колонку с сефидексом, уравнированную 0,02 М калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,2 М КСl и 0,5 мМ ЕДТА. Элюцию проводили тем же буфером. Размеры колонки—2,5×40 см. Скорость течения—1 мл за 3 мин. Были собраны 21 фракция. Объем фракции—5 мл. П5КР выходила во фракциях 9--12.

Этапы очистки П5КР молочной железы крыс представлены в табл. 2.

Таблица 2. Очистка П5КР молочной железы крыс (7 дней лактации)

Этапы	Общая белок, мг	Общая активность, мкМ/про	Удельная активность	Выход фермента (%)	Степень очистки
Цельный гомогенат	1480	375	0,25		
Высаливание сульфатом аммония (40—50%)	78,3	112,4	1,3	29,9	5,7
Диализ	43,4	124,3	2,86	31,5	11,4
Высаливание сульфатом аммония (60—80%)	16,1	104,5	6,49	27,8	25,9
Фракционирование на голубой сефарозе (фракции 5,6)	2,3	36,5	15,53	9,7	62,1
Фракционирование на сефидексе G-150 (фракции 5—8)	1,0	33,2	31,61	8,8	124,4

Из данных табл. 2 следует, что получена П5КР со степенью очистки 124 и с выходом фермента 8,8%.

При использовании разработанного Матеузава и сотр. [8] метода очистки фермента ОТ, у нас возникла мысль, что П5КР при диализе в течение ночи переходит в осадок, а ОТ остается в надосадоке. Приведенные в таблице 3 данные подтверждают наше предположение.

Из данных таблицы видно, что осадок, образовавшийся после ночного диализа, обладает сильно выраженной П5КР активностью, превосходящей таковую фракции, полученной на колонке с голубой сефарозой. Таким образом, при очистке ОТ на стадии диализа нам удалось разделить ферменты биосинтеза пролина молочной железы крыс ОТ и П5КР. При этом ОТ полностью переходит в надосадочную фракцию, а П5КР остается в нерастворимой фракции—в осадке. Этот осадок авторами [8] при очистке ОТ обычно выбрасывается.

Таблица 3. Разделение ферментов ОТ и П5КР при фракционировании гомогената молочной железы крыс (7 день лактации)

Источник ОТ	Источник ПКР	Активность, мкК про на 1 г ткани
Надосадок 65%-ной степени насыщения (второе осаждение)	Надосадок от 60% ной насыщения сульфатом аммония	0
.	Осадок, образованный при темн.обработке	0
.	Фракция на колонки с голубой сефарозой, обладающая П5КР активностью	4,1±0,35
.	Осадок, образовавшийся при диализе	4,8±0,70

Путем растворения последнего в 0,1 М калий-фосфатном буфере можно получить препарат, являющийся источником П5КР. Этот прием позволяет облегчить трудоемкую работу по очистке ферментов ОТ и П5КР.

Нами изучено влияние окисленных нуклеотидов на активность очищенной П5КР молочной железы крыс. Установлено, что НАДФ является строгим ингибитором очищенной П5КР. Обнаруживается также сравнительно слабое ингибирование активности П5КР окисленным НАД<sup>+</sup>. Аналогичные результаты получены также в отношении неочищенного фермента листьев сои [11] и очищенного до гомогенного состояния фермента хрусталика глаз крыс [12].

Следует отметить, что в целом гомогенате мозга крыс, личинок, жуков и жуков фасоловой зерновки (неопубликованные данные) указанные окисленные нуклеотиды не только не ингибируют, но и значительно стимулируют процесс биосинтеза пролина, в частности, активность П5КР. Это обусловлено интенсивным функционированием восстановительных систем клетки, снабжающих кофакторы (НАД<sup>+</sup>, НАДФН) и приводящих к активированию процесса биосинтеза пролина в качестве кофакторов П5КР. Эти данные могут иметь важное значение для регуляции метаболизма пролина окисленными нуклеотидами при регенеративных, восстановительных и пролиферативных процессах клетки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биолог. журн. Армения, 27, 19, 1974.
2. Агаджанян А. Х. Биолог. журн. Армения, 37, 40, 1984.
3. Гагпарян Х. Г. Молодой научн. работник ЕГУ, 36, 143, 1982.
4. Агаджанян А. Х., Арутюнян Л. М. Биолог. журн. Армения, 32, 1179, 1979.
5. Herzfeld A., Knex W. E. J. Biol. Chem. 243, 3327, 1968.
6. Jonson J. L., Roberts E. J. Neurochem., 42, 1123, 1984.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. J. Biol. Chem., 191, 265, 1951.
8. Matsuzawa T., Kazuyuki T., Kazusanuma M. Biochem. Biophys. Res. Commun 32, 161, 1968.
9. Matsuzawa J. Biochem. Biophys. Acta, 747, 215, 1982.

10. Mezl V. A., Knox W. E. Biochem. J., 165, 105, 1977.
11. Miller P. M., Stewart C. R. Phytochemistry, 15, 1855, 1976.
12. Shiono T., Kador P. F., Kinoshita J. J. Biochem. Biophys. Acta, 881, 72, 1986
13. Vecchio D. A., Kalman S. M. Arch. Biochem. Biophys., 127, 376, 1968.

Поступило 30.III 1990 г.

Биолог. журн. Армения, № 2.(45).1992

УДК 577.15.591.8

## ЗНАЧЕНИЕ ТИОЛОВЫХ ГРУПП В АКТИВНОСТИ ИЗОЭНЗИМОВ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ *ASPERGILLUS NIGER* R-3

А. Г. БАБАЯН, С. П. ОГАНЕСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

*Оксидазы аминокислот-тиоловые группы-изоэнзимы.*

При изучении механизма химической реакции, катализируемой ферментами, важное значение имеет природа тех функциональных групп в молекуле фермента, которые обеспечивают специфичность его действия на данный субстрат и высокую каталитическую активность.

Ранее нами было [2] показано, что изоэнзимы оксидазы D-аминокислот *Asp. niger* R-3 состоят из четырех субъединиц с молекулярной массой, равной 46700 Да; I изоэнзим активируется ионами Mg, Zn, и II — Co<sup>2+</sup>. Оба изоэнзима ингибируются ионами Ag, Cd, Hg.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния некоторых ингибирующих и восстанавливающих агентов на активность изоэнзимов оксидазы D-аминокислот у *Asp. niger* R-3.

*Материал и методика.* Объектом исследований служил *Asp. niger* R-3, полученный из Спитякского завода по производству лимонной кислоты в 1984г. Методика приготовления питательной смеси и выращивания гриба излагалась ранее [1].

Для определения оксидазной активности D-аминокислот (D-AAOX), пробу инкубировали при 37° в течение 60 мин в 0,05 М K/Na-фосфатном буфере (рН 3,3) в присутствии 10 мкМ D-Met при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали 20 %-ным ТХУ, после чего в экстракте определяли выделившийся аммиак микродиффузионным методом Зелингера в модификации Силаковой [4]. Активность фермента выражали в мкМ аммиака, выделившегося при часовой инкубации, на 1 г мицелия. Белок определяли по методу Лоури [7].

*Результаты и обсуждение.* Изучение влияния некоторых известных ингибиторов D-AAOX на I и II изоэнзимы *Asp. niger* R-3 (табл. 1) показало, что оба они являются тиоловыми ферментами, поскольку такие реагенты сульфгидрильных групп, как ПХМБ и ДТНБ (5,5-дитиобис 2-нитро бензойная кислота), ингибируют их активность. Любопытно, что классический ингибитор аминокислотных оксидаз бензоат натрия не оказывает подобного влияния на фермент. Аналогичные результаты были получены при изучении D-AAOX, выделенной из *T. variabilis* [5], а также при воздействии п-бензохинона на оксидазу из *Asp. niger* R-3 [3].