

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АДЕНИНА В НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЯХ, ЖИВОТНЫХ И МИКРООРГАНИЗМАХ

Г.Г. СЕМЕРДЖЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375025

Исследовали процесс дезаминирования в микроорганизмах (*Candida guilliermondii* НП-4), растениях (моховидные – *Pellia epiphylla*), животных (крыса). Выявлено, что в вышеперечисленных организмах действует фермент адениндезаминаза, который проявляет в 2 раза больше активности у моховидных, по сравнению с дрожжами. Исследовано влияние ионов двухвалентных металлов (Mn^{2+} , Zn^{2+}) на активность фермента. Низкие концентрации ионов Zn^{2+} угнетают активность адениндезаминазы. При низких концентрациях ионы Mn^{2+} слабо влияют на активность фермента. Угнетающее влияние увеличивается с увеличением концентрации Mn^{2+} .

Методом гель-фильтрации получены два белковых пика и два ферментативных пика, которые не совпадают с белковыми.

Ուսումնասիրվել է դեզամինացման պրոցեսը միկրոօրգանիզմների (*Candida guilliermondii* ՆՊ-4), բույսերի (մամռանմաններ *Pellia epiphylla*) և կենդանիների մոտ: Բացահայտվել է, որ վերոհիշյալ օրգանիզմների բջիջներում գործում է ադենինդեզամինազ ֆերմենտը, որը մամռանմանների մոտ դրսևորում է երկու անգամ մեծ ակտիվություն խմորասնկերի համեմատությամբ: Ուսումնասիրվել է երկվալենտ մետաղների իոնների (Mn^{2+} , Zn^{2+}) ազդեցությունը ֆերմենտի ակտիվության վրա: Zn^{2+} իոնների ցածր կոնցենտրացիան արդեն ճնշող ազդեցություն է ունենում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Mn^{2+} իոնների ցածր կոնցենտրացիաները թույլ ազդեցություն են թողնում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Իոնների կոնցենտրացիայի մեծացմանը զուգընթաց մեծանում է նրանց արգելակող ազդեցությունը:

Գել-ֆիլտրացիայի եղանակով ստացվել են երկու սպիտակուցային և երկու ֆերմենտային զազաթներ, որոնք չեն համընկնում իրար հետ:

Process of adenine deamination in microorganisms (*Candida guilliermondii* НП-4), plants (*moos* – *Pellia epiphylla*) and animals (rat) has been studied. Comparatively high activity of enzyme was observed by moos. The influence of different concentrations of bivalent ions (Mn^{2+} , Zn^{2+}) on adeninedeaminase activity was investigated. It has been shown that the low concentrations of Zn^{2+} ions have an inhibitory influence on the enzyme activity. The low concentrations of Mn^{2+} ions have a weak influence on the enzyme activity, with the increase of concentrations Mn^{2+} ions this inhibitory influence was increased.

By gel-filtration two protein peaks and two enzymatic peaks were obtained, which don't coincide with each others.

Адениндезаминаза - *Candida guilliermondii* НП-4 - *Pellia epiphylla*

В течение долгого времени считалось, что адениндезаминаза представлена только у бактерий, дрожжей, беспозвоночных и отсутствует у позвоночных [3]. Однако применение современных методов позволило не только обнаружить активность фермента в тканях позвоночных, но и выявить

характерные особенности метаболизма аденина [13]. Возникли новые направления исследований в целях использования адениндезаминазы для энзимодиагностики при различных видах патологий. Так, обнаружение адениндезаминазы в тромбоцитах больных лейкемией и отсутствие ее в норме может представлять интерес в отношении разработки теста для определения риска развития лейкемических заболеваний [2]. Для окончательного решения вопроса о биологической распространенности адениндезаминазы необходимы исследования организмов, находящихся на разных уровнях эволюционного развития. В нашей работе приведены данные исследований адениндезаминазы в дрожжах, моховидных растениях и в органах крыс.

Материал и методика. Исследовали наличие адениндезаминазы в микроорганизмах (*Candida guilliermondii* НП-4), растениях (моховидные - *Pellia epiphylla*), животных (крыса) организмах. Эксперименты проводили в условиях фосфатного буфера (рН 7,4), в качестве субстрата применяли аденин, инкубацию проводили в термостате при t 37°, в присутствии $MgCl_2$ (29 μ на 0,2м) в течение 1ч 30мин. Аммиак определяли микродиффузионным методом Зелингсона [14] в модификации Силаковой [1].

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов была исследована ферментативная активность в гомогенатах у разных организмов при различных концентрациях субстрата (табл. 1).

Нами впервые обнаружена ферментативная активность в растительном объекте вообще и, в частности, у моховидных. Причем, активность у последних значительно превосходит таковую ферментов в дрожжах и у крыс.

Таблица 1. Деаминарование аденина в гомогенатах различных объектов при разных концентрациях аденина, мкМ на 1 г св.ткани

Концентрация, аденина, мкМ	Количество аммиака, мкМ			
	<i>C.guilliermondii</i> НП-4	Крысы		<i>Pellia epiphylla</i>
		мышцы	мозг	
20	4,82	0,94	1,65	9,41
30	5,01	1,06	1,94	11,76
40	4,74	0,81	1,76	9,06
50	4,24	0,71	1,53	8,24

Самая высокая активность фермента проявляется при концентрации субстрата 30 мкМ, при этом у моховидных она составляет -11,76 мкМ, у *Candida guilliermondii* НП-4 – 4,74, у крыс в мышцах и мозге соответственно 0,81 и 1,76 мкМ на 1г св.ткани. Представляет интерес определенное подавление активности адениндезаминазы при повышении концентрации субстрата. Так, у моховидных активность фермента при концентрации субстрата 50 мкМ снижалась до 8,24 мкМ от активности фермента 11,76 мкМ при концентрации субстрата 30 мкМ. Это подавление наблюдается также в отношении фермента тканей крыс и дрожжей, хотя и несколько слабее. Подобное ингибирование активности ферментов под влиянием высоких концентраций субстрата обнаружено лишь в отношении некоторых

Таблица 2. Влияние ионов Zn^{2+} на активность адениндезаминазы разных организмов, мкМ на 1 г св.ткани

Объект	Концентрации ионов Zn^{2+} , мкМ													
	Гомогенат		0.05		0.25		0.5		1.0		2.5		5.0	
	мкМ	%	мкМ	%	мкмоль	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%
Мозг крыс	2,31	100	0.82	35.90	0,61	26,67	0,47	20,45	0.12	5.13	0.05	2.05	0.01	0,5
<i>P. epiphylla</i>	10,35	100	-	-	4,47	43,18	2,59	25,00	1,41	13,64	0,48	4,66	0,094	0,9
<i>C. guilliermondii</i> НП-4	4,35	100	-	-	3,76	80,49	2,82	64,87	1,88	43,24	0,75	17,30	0,58	13,24

Таблица 3. Влияние ионов Mn^{2+} на активность адениндезаминазы различных организмов, мкМ на 1 г св.ткани

Объект	Концентрации ионов Mn^{2+} , мкМ													
	Гомогенат		0.05		0.25		0.5		1.0		2.5		5.0	
	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%
Мозг крыс	2,31	100	1.76	76.2	1.07	46.7	0,92	40,0	0.59	25.00	0.26	10.28	0.15	6.70
<i>P. epiphylla</i>	10,35	100	-	-	7,29	70,45	5,76	55,68	3,06	29,55	1,18	11,36	0,47	4,55
<i>C. guilliermondii</i> НП-4	4,35	100	-	-	4,12	94,60	3,29	75,68	1,88	43,24	1,16	26,76	0,70	16,22

ферментов (ксантиноксидазы, оксидазы L-аминокислот, неорганической пирофосфатазы и др.), возможно, вследствие образования неэффективных фермент-субстратных комплексов.

Исследования, проведенные при концентрации субстрата 30 мкМ, показали, что фермент в изученных объектах полностью обнаруживается в надосадке, полученном при центрифугировании гомогената (9000, 15мин), что позволяет констатировать отсутствие адениндезаминазы в крупных субклеточных структурах.

Дальнейшие исследования посвящены влиянию ионов двухвалентных металлов (Mn^{2+} , Zn^{2+}) на адениндезаминазу дрожжей, мозга крыс, моховидных. Полученные результаты обобщены в табл. 2 и 3. Как видно из данных табл. 2, Zn^{2+} ингибирует активность адениндезаминазы, причем ингибирующее влияние увеличивается по мере повышения его концентрации. Наиболее чувствителен в этом отношении фермент мозга крыс, тогда как фермент дрожжей проявляет некоторую стабильность в отношении влияния Zn^{2+} . Так, при концентрации Zn^{2+} 0,5 мкМ на пробу активность мозгового фермента угнетается на 80%, тогда как у дрожжевого всего на 35%. При концентрации же Zn^{2+} 0,25 мкМ на пробу активность фермента в мозге и у дрожжей ингибируется на 74% и 20% соответственно. Согласно литературным

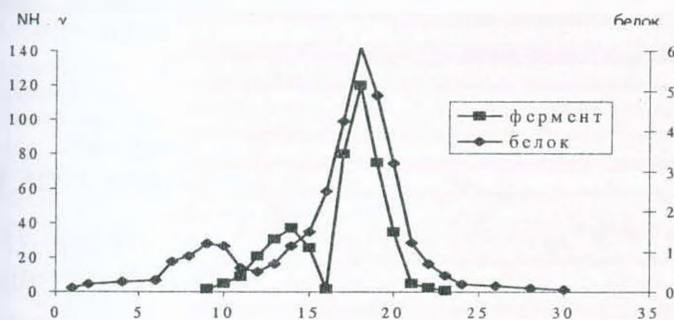


Рис. 1. Изоэнзимный спектр адениндезаминазы у моховидных *P. epiphylla*.

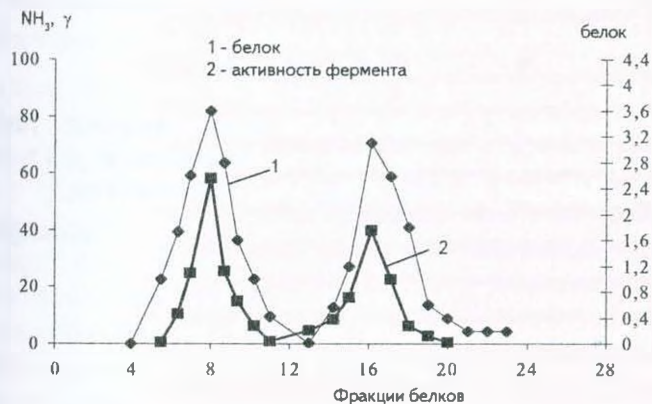


Рис. 2. Изоэнзимный спектр адениндезаминазы у *C. guilliermondii* HP-4.

данным, Zn^{2+} также ингибирует адениндезаминазу дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [4], тогда как активирует фермент дрожжей *Candida utilis* [5, 6, 11]. Из данных табл. 3 явствует, что Mn^{2+} тоже ингибирует адениндезаминазу, ингибирующее влияние усиливается по мере увеличения концентрации иона, и в данном случае Mn^{2+} сильнее влияет на мозговой фермент, несколько слабее на фермент моховидных и еще слабее на фермент дрожжей. Однако по ингибирующему воздействию ионы Mn^{2+} несколько уступают ионам Zn^{2+} . Авторы отмечают ингибирование адениндезаминазы у *Azotobacter vinelandii* [8, 9, 12], у дрожжей *Torulopsis utilis*, *C. utilis* [7, 10], *S. cerevisiae* [11].

Наши дальнейшие исследования на вышеуказанных объектах продолжались в направлении частичной очистки адениндезаминазы. Произведено фракционирование надосадков гомогената методом гель-фильтрации (сефадекс G-200). У моховидных обнаружены два белковых пика (рис.1), причем активность высокомолекулярного фермента (40γ) в три раза превосходит активность низкомолекулярного (120γ).

У дрожжевых организмов также выявлены 2 пика активности (рис.2), однако активность высокомолекулярного фермента (60γ) на 35% превышает такую же низкомолекулярного (40γ).

Таким образом, у моховидных растений и у дрожжей обнаружены по два изоэнзима (низкомолекулярный и высокомолекулярный), соотношение активности которых у исследованных объектов различно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Силакова А., Труш Г. *Вопр. мед. химии*, 5, 538, 1962.
2. Соковнина Я., Тенцова И., Дебов С. *Вопр. мед. химии*, 3, 425, 1997.
3. De Bersagues J. J. *Invest. Derm.*, 48, 169, 1967.
4. Guern J., Dorel M., Lequay J., et al. *C.R.Acad.Sci.*, 275-D, p.377, 1972.
5. Gribanov V.A., Vulf's L., Miestein O. *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis*, 11, p. 72, 1972.
6. Hartensten R.C., Fridovich J.E. *J. Biol. Chem*, 242, p. 740, 1967.
7. Happel L.A., Hurwitz J., Horecker B.L. *J. Am. Chem. Soc.*, 7, p. 630, 1957.
8. Hardy R.W., Knight E. *Biochem. Biophys. Acta*, 122, p. 52, 1966.
9. Larry G.H. *Diss. Abstr.*, 29-B, p. 2737, 1969.
10. McElray N.D. *Meth. Enzymol.*, 6, p. 203, 1963.
11. Medhat P. *Diss. Abstr.* 27-B, p. 1785, 1966.
12. Vishikno, Ogasawara N., Suzuki N., et al. *Ibid.*, 146, p. 620, 1967.
13. Zielke C.L., Sulter C.H. In: *The Enzymes*. New York, 4, p. 47, 1971.
14. Zelingson D., Zelingson H. *J.Lab.Clin. Med.*, 38, 324, 1951.

Поступила 22.IV.2004