

ЛАТВИЙСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. П. СТУЧКИ

На правах рукописи  
Для служебного пользования

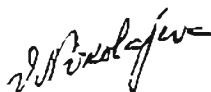
Н и к о л а е в а  
Визма Робертовна

УДК 575.8

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
АДЕНИЛАТДЕЗАМИНАЗЫ, ПРОДУЦИРУЕМОЙ *Penicillium*  
*lanoso-viride* 8D

Специальность 03.00.07 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Научный руководитель  
доктор биологических наук,  
профессор МАУРИНЬ Х.А.

Рига – 1982

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Глава I. Ферментативное дезаминирование аденина и его производных .....	8
I.1. Дезаминазы производных аденина высших организмов	8
I.2. Микроорганизмы – продуценты дезаминаз аденина и его производных. Свойства ферментов .....	14
I.2.1. Продуценты адениндезаминазы (К.Ф.3.5.4.2)	14
I.2.2. Продуценты аденозиндезаминазы (К.Ф.3.5.4.4) .....	15
I.2.3. Продуценты аденозинмонофосфатдезаминазы (К.Ф.3.5.4.6) и аденозиндифосфатдезаминазы (К.Ф.3.5.4.7) .....	19
I.3. Получение ферментных препаратов, обладающих аденозин- и аденилатдезаминазной (аденозинмонофосфатдезаминазной) активностью, в микробиологической и биохимической промышленности .....	26
Глава 2. Ферменты, дезаминирующие производные аденина, – регуляторы и индикаторы изменений физиологических процессов в организме .....	29
2.1. Участие дезаминаз в спорообразовании у микроорганизмов .....	29
2.2. Участие дезаминаз в обеспечивании нормального протекания физиологических процессов у высших организмов .....	32
2.3. Дезаминазная активность в различных тканях организма при злокачественных новообразованиях..	43
2.4. Заключение по литературному обзору .....	46

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 3. Объекты и методы исследований .....	48
3.1. Культивирование <i>P.lanosoviride</i> 8D .....	48
3.2. Методы выделения и очистки аденилатдезаминазы ..	53
3.3. Определение ферментативных активностей, белка и углеводов .....	57
3.4. Изучение свойств аденилатдезаминазы .....	61
3.4.1. Каталитические свойства .....	61
3.4.2. Определение молекулярной массы .....	63
3.4.3. Термоинактивация аденилатдезаминазы .....	64
3.4.4. Определение места локализации аденилатдеза- миназы в мицелии гриба .....	65
3.5. Изучение биологической активности аденилатдеза- миназы .....	66
3.5.1. Культуры клеток крови .....	66
3.5.2. Асцитные опухоли мышей .....	68
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
Глава 4. Влияние условий культивирования на продуцирование аденилатдезаминазы культурой <i>P.lanosoviride</i> 8D ..	70
Глава 5. Выделение и очистка аденилатдезаминазы <i>P.lanosoviride</i> 8D .....	81
5.1. Очистка с применением гельфильтрации и хромато- графии на анионообменных смолах .....	82
5.2. Очистка хроматографией на анионообменных матери- алах на основе кремнезема .....	87
5.3. Очистка с применением термо- и термокислотной денатурации и фракционирования полиолями .....	89
Глава 6. Каталитические и физикально-химические свойства аденилатдезаминазы <i>P.lanosoviride</i> 8D .....	92

Глава 7. Биологическая активность аденилатдезаминазы	
<i>P. lanoso-viride</i> 8D .....	108
7.1. Влияние на бласттрансформацию лимфоцитов и гемагглютинирующее воздействие .....	109
7.2. Влияние на синтез нуклеиновых кислот в клетках асцитных опухолей <i>in vitro</i> .....	112
7.3. Влияние на продолжительность жизни мышей с асцитным лимфлейкозом 15178Y .....	119
7.4. Аденилатдезаминаза в составе кормовых добавок ...	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	125
ВЫВОДЫ .....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	132

## В В Е Д Е Н И Е

Многостороннее значение в регуляции физиологических функций всех живых организмов имеют центральные метаболиты пуринового обмена - аденин и его производные (Blakley, Vitols, 1968; Hartman, 1970). Дезаминазы соединений аденина, которые широко распространены среди организмов, стоящих на различных ступенях организации (Chung et al., 1967; Пеккель, 1980), превращают их в биологически менее активные производные гипоксантина. Аденозин- и аденилатдезаминазы влияют на мышечное сокращение (Fishbeim et al., 1978; Sabina et al., 1980), нейротрансмиссию (Michaelis et al., 1979; Sadavivudu et al., 1980), кровообращение (Saito et al., 1981), липолиз (Fain, Wieser, 1975), иммунный ответ (Giblett, 1976; Cohen et al., 1978; Reem et al., 1979). Они могут устранить токсичность производных аденина, которые в высоких дозах поступают в организм с пищей, получаемой из одноклеточных. Дезаминазы находят применение в биохимической промышленности для производства соединений гипоксантина (Скрябин, Головлева, 1976), являющимися биохимическими реагентами и лекарственными средствами (Гнеушев и др., 1978) и используемых в качестве вкусовых добавок к продуктам питания (Киносита, 1968). Дезаминазы производных аденина необходимы также и для научно-исследовательской работы.

Важнейшим источником ферментов для промышленных целей являются микроорганизмы, в том числе продуценты аденозин- и аденилатдезаминаз (Шпрунка, 1978). На пути к их использованию в народном хозяйстве и медицине необходимы всесторонние исследования ферментов, получаемых из высокоактивных их продуцентов.

Актуальность проблемы. XXVI съездом КПСС и Постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР № 662 от 24 июня 1981 г.

"Основные направления работ по развитию физико-химической биологии и биотехнологии и использованию их достижений в народном хозяйстве и медицине" указывается на необходимость ускоренного развития исследований с целью создания новых отечественных препаратов, обладающих биологической активностью, в том числе ферментов микроорганизмов. Получение таких препаратов позволяет воздействовать на различные физиологические процессы, включая дифференциацию, и бороться со многими болезнями.

Актуальность настоящей работы определяется широкими перспективами использования препаратов дезаминаз различной степени очистки, получаемых из микроорганизмов, в медицине, биохимической и пищевой промышленности и в кормопроизводстве.

Цель и задачи исследования. Цель работы - разработка способов высокоэффективного получения очищенных препаратов фермента аденилатдезаминазы из микроскопического гриба *Penicillium lanoso-viride* 8D и всесторонняя характеристика свойств фермента.

Для выполнения работы были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние условий культивирования на накопление аденилатдезаминазной активности.
2. Разработать способы выделения и очистки аденилатдезаминазы.
3. Охарактеризовать физико-химические свойства аденилатдезаминазы.
4. Выявить биологическую активность аденилатдезаминазы.

Объекты исследования. В работе исследована аденилатдезаминаза, продуцируемая микроскопическим грибом *Penicillium lanoso-viride* 8D. Изучены условия биосинтеза фермента, спо-

собы его выделения и очистки, физико-химические свойства и биологическая активность.

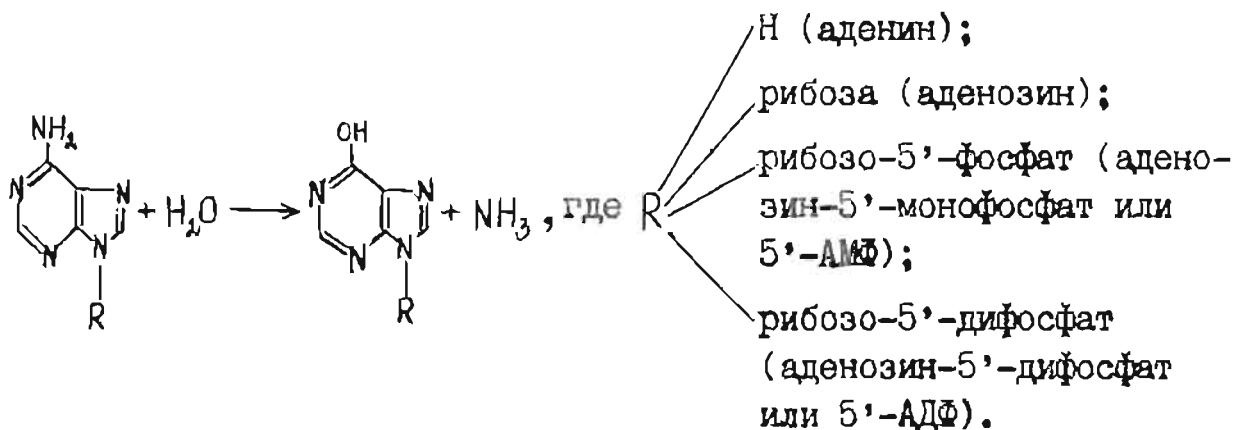
Научная новизна. Из *P. lanoso-viride* 8D выделен очищенный фермент аденилатдезаминаза и охарактеризованы его свойства. Изучены закономерности накопления деаминазной активности в культуре продуцента. Показано, что очищенный ферментный препарат индуцирует бласттрансформацию человеческих лимфоцитов и снижает уровень синтеза нуклеиновых кислот в клетках некоторых экспериментальных асцитных опухолей.

Практическая ценность. Выяснены условия культивирования продуцента аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, и разработаны технологически легко осуществляемые методы получения ферментных препаратов с различной степенью очистки. Показана возможность применения *P. lanoso-viride* 8D для микробиологического обогащения отходов растительных продуктов сельского хозяйства белками и гидролитическими ферментами. Аденилатдезаминаза является перспективной для медицины как потенциальное канцеростатическое и иммуностимулирующее средство.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава I. Ферментативное дезаминирование аденина  
и его производных

Ферментативное дезаминирование аденина и его производных осуществляется гидролитическим путем при участии соответствующих ферментов - адениндезаминазы (К.Ф.З.5.4.2), аденозиндезаминазы (К.Ф.З.5.4.4), аденозинмонофосфат- или аденилатдезаминазы (К.Ф.З.5.4.6) и аденозиндифосфатдезаминазы (К.Ф.З.5.4.7), называемых также и аминоксидазами. Реакции протекают по следующей схеме:



С помощью этих ферментов дезаминируются также НАД, НАДФ и АТФ.

I.I. Дезаминазы производных аденина высших  
организмов

Имеется много данных о наличии в тканях человека и высших животных аденозин- и аденилатдезаминаз, что рассмотрено в нескольких обзорах (Nikiforuk, Colowick, 1955; Blakley, Vitols,

1968; Hartman, 1970; Акопян, Горкин, 1973; Четверикова, 1975; Акопян, 1977; Пеккель, 1980). Наиболее высокая дезаминазная (0,4 единицы на мг сырого веса), а именно аденилатдезаминазная активность характерна для клеток скелетных мышц (Пеккель, 1980). В тканях скелетных мышц, мозга и крови аденилатдезаминазная реакция представляет собой единственный путь, по которому осуществляется дезаминирование производных аденина. Уровень аденозиндезаминазной активности наиболее высокий в гладких мышцах (0,1 единица на мг сырого веса) и селезенке, значительная активность обнаруживается в легких и почках, но отсутствует в поперечнополосатых мышцах (кроме сердца) и в мозге (Четверикова, 1975).

Адениндезаминаза не характерна для тканей высших животных, она обнаруживается лишь в некоторых патологических случаях, например, при гемобластозе (Соковнина и др., 1977). Аденин, как правило, обладает цитотоксическим действием (Snyder et al., 1977, 1978).

Описано присутствие в миофибриллах и в мозге аденозиндифосфатдезаминазы (Webster, 1953; Deutsch, Nilsson, 1953, 1954; Арутюнян, Нерсисян, 1970), однако более подробные сведения об этом ферменте в литературе нами не были найдены.

Аденилат- и аденозиндезаминазы обнаружены также в некоторых растениях - в ячмене (Brawerman, Chargaff, 1954), горохе (Turner, Turner, 1961) и шпинате (Yoshino, Murakami, 1980).

Хорошо изученной аденилатдезаминазой высших животных является дезаминаза мышц крыс, обозначаемая изоферментом А в отличие от изофермента В, характерного для печени и почек, и С, свойственного сердцу (Ogasawara et al., 1975; Caffee, 1978). Аденилатдезаминаза мозга представляет собой изоферменты В и С

и их гибриды, всего 5 форм, отличающихся по электрофоретической подвижности (Ogasawara et al., 1975; Арутюнян, Ловенштейн, 1977). В тканях человека найдены 4 изофермента:  $E_1$  и  $E_2$  - в эритроцитах,  $M$  - в мышцах и  $L$  - в печени и в мозге. Изофермент  $M$  иммунологически сходен с изоферментом  $A$  мышц крыс, а  $E_1$  похож на  $C$  по электрофоретическому поведению. Они все состоят из 4-х субъединиц с молекулярной массой для субъединиц изоферментов  $E_1$ ,  $M$  и  $L$  соответственно 80 000, 72 000 и 68 000 (Ogasawara et al., 1982). Очищены и охарактеризованы также и аденилатдезаминазы эритроцитов (Nathans et al., 1978; Yuan, Suelter, 1978) и тромбоцитов (Ashby, Holmsen, 1981). Во всех изоферментах преобладает тетрамерная структура, включающая 2-4 грамма атома  $Zn$  на 1 моль фермента (Zielke, Suelter, 1971; Пеккель, 1980). Фермент может находиться и в димерной форме (Ranieri-Raggi et al., 1980). Ограниченный протеолизис аденилатдезаминазы мышц кролика трипсином как будто замораживает молекулу фермента в конформации тримера (Ranieri-Raggi, Raggi, 1980). Кроме того, в составе деаминазы волокон красных скелетных мышц кролика обнаружен глюкозамин (Stankiewicz, Spsychala, 1981). Одна молекула содержит около 30 свободных  $SH$ -групп, 12 из которых можно оттитровать без потери активности, а остальные необходимы для каталитического действия фермента (Nikiforuk, Colowick, 1956; Wolfenden et al., 1968). Известно, что в активном центре кроме сульфгидрильных групп входит  $Zn$  и тирозин (Пеккель, 1980).

В очищенном виде аденилатдеаминаза была получена уже в 1956 году (Nikiforuk, Colowick, 1956). В 1957 году описана кристаллизация фермента скелетных мышц кролика, этот ферментный препарат до сих пор остается непревзойденным по своей

удельной активности, составляющей 1600 мкмоль дезаминированного АМФ в течение 1 мин. на мг белка (Lee, 1957<sup>a</sup>, 1963). Однако, судя по спектру абсорбции в ультрафиолетовом свете, он содержит некоторое количество нуклеиновых кислот (Smiley et al., 1967). Изоферменты разделяются при хроматографировании на фосфоцеллюлозе (Ogawara et al., 1975). Высказано мнение, что здесь имеет место аффинное взаимодействие фермента с фосфатными группами ионообменника (Пеккель, 1980). В обзоре В.А.Пеккеля (Пеккель, 1980) отмечено, что исторически по мере усовершенствования методов очистки убывает установленная разными авторами молекулярная масса фермента — от 320 000 (Lee, 1957<sup>b</sup>) до 190 000 (Пеккель, Киркель, 1979). Одновременно уменьшается удельная активность фермента, возможно, из-за потери какого-нибудь стабилизирующего компонента, отделение небольшой части которого уменьшает молекулярную массу, а при удалении большей части его теряется каталитическая активность.

Аденилатдезаминазы высших организмов обладают строгой субстратной специфичностью. Так фермент из скелетных мышц дезаминирует только 5'-АМФ и некоторые его производные: дезокси АМФ, N6-метилАМФ, N6-этилАМФ, формицин-5'-монофосфат, аденозин-5'-моносульфат, аденозин-5'-фосфоамидат (Nikiforuk, Colowick, 1955; Lee, 1957<sup>b</sup>; Smiley et al., 1967; Zielke, Suelter, 1971). Ж.И.Акопян (1977) делает вывод, что любое замещение в молекуле АМФ при 1, 2, 6 или 7 атоме основания или 2 или 3 атоме рибозы препятствует дезаминированию соответствующего субстрата.

Много труда приложено к изучению кинетических свойств аденилатдезаминаз. Все деаминазы регулируются аллостерически, содержат по несколько аллостерических центров (Blakley, Vitols, 1968; Hartman, 1970). Наблюдается сигмоидальная зависимость

скорости реакции от концентрации субстрата при отсутствии активаторов – катионов щелочноземельных металлов или нуклеотидов (Smith, Kizer, 1969). Это объясняется тем, что фермент может находиться в активной или неактивной форме (Ranieri-Raggi et al., 1980). Субстрат может свободно присоединяться к активной форме, а активация неактивной формы осуществляется присоединением активаторов к аллостерическому центру или субстрата – к каталитическому центру (Keitz et al., 1971). К нуклеотидам-активаторам, кроме субстрата, принадлежит АТФ, а ГТФ является ингибитором (Setlow et al., 1966; Burger, Lowenstein, 1967). Однако нельзя однозначно сказать, что аденилатдезаминазу ингибирует ГТФ, а активирует АТФ, это зависит от наличия или отсутствия некоторых ионов, от величины рН, а также от абсолютных концентраций обоих нуклеотидов и др. (Smith, Kizer, 1969; Ranieri-Raggi, Raggi, 1980; Ranieri-Raggi et al., 1980).

Из аденозиндезаминаз высших организмов подробно изучены дезаминазы эритроцитов человека и тонкой кишки телят. Найдены 4 формы человеческих дезаминаз, различающиеся по молекулярной массе (Van Der Weyden, Kelley, 1978) – малая (36 000), средняя (114 000), большая (298 000) и форма, ассоциированная с органеллами (больше 20 000 000). Кроме того, малая форма, по данным разных авторов – 30–38 тыс. дальтон, при хроматографировании на ДЭАЭ-сефадексе разделяется на 3 изофермента с одинаковой величиной константы Михаэлиса ( $K_M$ ) – 30 мкМ и оптимумом рН – 7,0, но разной электрофоретической подвижностью и термоустойчивостью (Van Heukelom et al., 1976). Установлено, что малая форма превращается в большую путем присоединения к ней конвертирующего высокомолекулярного фактора, не обладающего дезаминазной активностью (Nishihara et al., 1973). Малая форма

характерна для тканей с высокой аденилатдезаминазной активностью, большая - с низкой. А большая и средняя формы в свою очередь могут спонтанно диссоциировать в малую (Van Der Weyden, Kelley, 1978). Конверсирующий фактор на самом деле является гликпротеидом и состоит из 2 субъединиц и углеводного остатка (Daddona, Kelley, 1980). Это объясняет ранее полученные данные о различной степени связывания изоферментов аденозиндезаминазы с лектином (Swallow et al., 1977).

В последние годы большое внимание уделено изучению генов аденозиндезаминазы и их фенотипического выражения. Выяснено, что структурный ген фермента локализован в 20 хромосоме, ген связывающегося с ним белка (АДСР-1) - в 6 хромосоме, а ген АДСР-2, кодирующий белок, ответственный за экспрессию продукта гена АДСР-1, - во 2 хромосоме (Koch, Shows, 1978, 1980).

Каталитические свойства изоферментов аденозиндезаминазы имеют некоторые различия -  $K_m$  находится в пределах от 72 до 95 мкМ, оптимум pH - от 5,5 до 7,4 (Van Der Weyden, Kelley, 1978). Все изосимы дезаминируют только аденозин и дезоксиаденозин, а адениловые нуклеотиды являются конкурентными ингибиторами реакции (Van Heukelom et al., 1976).

Подробно изучена субстратная специфичность аденозиндезаминазы тонкой кишки телят, дезаминирующей аденозин и дезоксиаденозин с оптимумом pH 7,0 (Kaplan, 1955<sup>a</sup>; Brady, O'Connell, 1962). Тот же активный центр фермента катализирует гидролиз 6-гидрозин-, 6-хлор-, 6-метил-амино-, 6-метокси-пуринрибозидов (Bruce, Suhadolnik, 1967). Установлено, что связывание фермента при 9 позиции основания является более специфичной, чем при 6 позиции. В связи с применением аналогов аденозина в медицине изучается степень опасности их дезаминирования в организме,

что привело бы к их биологической инактивации (Frieden et al., 1980).

Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что в высших организмах широко распространены строго специфические аденозин- и аденилатдезаминазы, обладающие сравнительно сложной структурой и механизмами регуляции активности. Их участие в регулировании различных физиологических процессов будет рассмотрено в следующей главе.

## 1.2. Микроорганизмы - продуценты деаминаз аденина и его производных. Свойства ферментов

### 1.2.1. Продуценты адениндезаминазы (К.Ф.3.5.4.2)

Адениндезаминаза описана у небольшого числа микроорганизмов - бактерий *Azotobacter vinelandii* (Heppel et al., 1957; Кирштейне и др., 1968; Schramm, Lazorik, 1975), *Escherichia coli* (Соковнина и др., 1981), *Pseudomonas aeruginosa* (Franke, Hahn, 1955), *P. synxantha* (Takuo, Hong, 1978), микроскопических грибов *Candida utilis* (Hartenstein, Fridovich, 1967), *Penicillium chrysogenum* (Tai, Wolf, 1961; Allan, Elzainy, 1970), *P. sizowii* (Попова и др., 1972), *Saccharomyces cerevisiae* (Грибанов, 1974), *Schizosaccharomyces pombe* (Abbondandolo et al., 1971), *Torulopsis utilis* (Roush, 1954). Ранние сообщения (Stephenson, Trim, 1938; Kream, Chargaff, 1952) об адениндезаминазе *Escherichia coli* некоторое время отрицались, так как в дальнейших опытах было установлено, что *E. coli* превращает аденин в гипоксантин косвенным путем, многоступенно, с участием других ферментов, которые сначала рибозилируют или фосфорилируют аденин (Hochstadt-Ozer, Stadtman, 1971). Однако недавно

адениндезаминаза из *E. coli* получена в очищенном виде и изучены ее свойства (Соковнина и др., 1981). Установлено, что этот фермент, так же как адениндезаминаза дрожжей (Roush, 1954), индуцируется аденином. Гипоксантин репрессирует синтез и ингибирует активность адениндезаминазы *Saccharomyces cerevisiae* (Грибанов, 1974). Для дезаминазы *E. coli* субстратами служат (в порядке убывания скорости реакции) аденин, 2,6-диаминопурин, 6-иодпурин, азааденин, 6-хлорпурин, 6-метиламинопурин. Каталитическую реакцию ингибирует  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ . В очищенном виде изучена также и дезаминаза из *Pseudomonas vulgaris* (Такао, Нонг, 1978). Для ее активности необходимо присутствие  $Zn^{2+}$ , оптимальный pH 7,0–9,0 в зависимости от применяемого буфера.  $K_M$  для адениндезаминазной реакции  $1,1-2,5 \cdot 10^{-4}$  М.

### 1.2.2. Продукты аденозиндезаминазы (К.Ф.3.5.4.4)

Наиболее изученной является аденозиндезаминаза из микроскопического гриба *Aspergillus oryzae*, но, так как она по свойствам ближе к группе аденилатдезаминаз, то подробнее рассмотрим ее в следующем разделе.

Аденозиндезаминазы встречаются во всех основных группах микроорганизмов - в бактериях, актиномицетах и микроскопических грибах. Так из 48 проверенных случайно выбранных видов бактерий аденозиндезаминазной активностью обладали 36, из 39 видов актиномицетов - 37 (Sawa et al., 1967) и из 48 видов дрожжей - 18 (Вилкс, 1972). Установлено, что микроорганизмы разных групп, дезаминирующие аденозин, широко распространены в ризосфере и ризоплане растений (Вульфа и др., 1981). Данные о распространенности аденозиндезаминаз среди микроорганизмов обобщены в таблице I.

Таблица I

## Распространение аденозиндезаминаз у микроорганизмов

Род микро- организмов	Количество видов	Источники литературы
I	2	3
<u>Бактерии:</u>		
<i>Aerobacter</i>	2	Sawa et al., 1967
<i>Alcaligenes</i>	2	Sawa et al., 1967
<i>Azotobacter</i>	1	Alexander, Wilson, 1955; Tsukada, Yoshino, 1980; Yoshino et al., 1980
<i>Bacillus</i>	10	Koch, Vallee, 1959; Sawa et al., 1967; Molnar, Pragai, 1973; Mura et al., 1978; Sgarella et al., 1982
<i>Bacterium</i>	2	Williams, McInture, 1955; Sawa et al., 1967
<i>Beneckea</i>	1	Niven et al., 1977
<i>Brevibacterium</i>	6	Sawa et al., 1967
<i>Clostridium</i>	2	Дунцис, Витол, 1972
<i>Corynebacterium</i>	2	Sawa et al., 1967
<i>Escherichia</i>	1	Sawa et al., 1967
<i>Flavobacterium</i>	1	Шилов, 1978; Вилкс и др., 1980; Магат и др., 1981
<i>Halobacterium</i>	1	Bauer, Carlberg, 1973
<i>Lactobacillus</i>	1	Kalckar et al., 1952
<i>Klebsiella</i>	1	Sawa et al., 1967

## Продолжение таблицы I

I	2	3
Microbacterium	1	Sawa et al., 1967
Micrococcus	7	Sawa et al., 1967; Shobe, Campbell, 1973; Pickard, 1975
Mycobacterium	1	Gabrielle et al., 1962; Guha et al., 1962
Pseudomonas	2	Sawa et al., 1967; Sakai, Jun, 1978
Salmonella	1	Hoffmeyer, Neuhard, 1971
Sarcina	3	Sawa et al., 1967
Staphylococcus	1	Sawa et al., 1967
Vibrio	1	Arora et al., 1956
<u>Актиномицеты:</u>		
Actinoplanes	2	Sawa et al., 1967
Nocardia	4	Sawa et al., 1967
Streptomyces	26	Sawa et al., 1967
Streptosporangium	1	Sawa et al., 1967
<u>Микроскопические грибы:</u>		
Aspergillus	1	Mitchell, McElroy, 1946
Candida	5	Вилкс, 1972
Erothecium	1	Brown et al., 1958
Neurospora	1	McElroy, Mitchell, 1946

Катаболизм аденозина у микроорганизмов часто протекает по двум параллельным путям (дезаминирование и дерибозилирование), что показано, например, в работах с *E. coli* (Koch, Vallee, 1959), *Salmonella typhimurium* (Hoffmeyer, Neuhard, 1971), *Streptomyces aureofaciens* (Simuth, Zelinka, 1970) и *Neurospora crassa* (Magill et al., 1974). *E. coli* (Koch, Vallee, 1959), *Halobacterium cutirubrum* (Bauer, Carlberg, 1973) кроме аденозина дезаминируют и дезоксиаденозин, а, например, аденозиндезаминаза из *Lactobacillus helveticus* (Kalckar et al., 1952) — только аденозин.

Рассматриваемые в этом разделе дезаминазы, кроме аденозиндезаминазы *Streptomyces aureofaciens* (Rosinova et al., 1978<sup>a</sup>, 1978<sup>b</sup>), катализируют только реакции с участием нуклеозидов аденозина, но не нуклеотидов.  $K_M$  для аденозина лежит в пределах от порядка  $10^{-5}$  М для *Halobacterium* (Bauer, Carlberg, 1973) до  $10^{-3}$  М для *Mycobacterium* (Guha et al., 1962). Аденозиндезаминаза *Streptomyces aureofaciens* кроме аденозина дезаминирует и нуклеотиды — 5'-АМФ, 5'-АДФ, 2'-дезоксиАМФ, 5'-АТФ (Rosinova et al., 1978<sup>a</sup>). Оптимум рН у всех близок к нейтральному. Все ферменты этой группы относительно неустойчивы, что серьезно затрудняет их очистку. Например, по этой причине удалось только частично очистить аденозиндезаминазы из галофильных бактерий *Halobacterium cutirubrum* (Bauer, Carlberg, 1973) и *Micrococcus sodonensis* (Shobe, Campbell, 1973). После 10-и этапной очистки получена в 1800–2000 раз очищенная и кристаллизованная дезаминаза из *Pseudomonas iodinum* (Sakai, Jun, 1978), при этом в качестве стабилизатора был использован этанол. Установлено, что фермент *P. iodinum* с молекулярной массой 160 000 состоит из субъединиц, которые диссоциируют во время электро-

фореза. Этанол способствует их агрегации, о чем свидетельствует увеличение молекулярной массы до 240 000. Аденозиндезаминазы микроорганизмов значительно различаются по молекулярной массе. Так у деаминазы *Micrococcus sodonensis* она составляет 130 000 (Shobe, Campbell, 1973), у *Halobacterium cutirubrum* - 80 000 (Bauer, Carlberg, 1973), *Azotobacter vinelandii* - 66 000 (Tsukada, Yoshino, 1980), *Escherichia coli* - 29 000 (Nygaard, 1978). Фермент из *Streptomyces aureofaciens* является полиморфным, он разделяется на 3 изофермента с молекулярными массами 163 000, 57 000 и 14 500 (Rosinova et al., 1978<sup>a</sup>).

1.2.3. Продукты аденозинмонофосфатдезаминазы  
(К.Ф.3.5.4.6) и аденозиндифосфатдезаминазы  
(К.Ф.3.5.4.7)

Деаминазы адениловых нуклеотидов микроорганизмов по ферментной классификации разделяют на две группы: аденозинмонофосфат - или аденилатдезаминазы (К.Ф.3.5.4.6) и аденозиндифосфатдезаминазы (К.Ф.3.5.4.7). Высказывалось мнение о целесообразности присвоить отдельный номер также и аденозинтрифосфатдезаминазе (Chung et al., 1967). Однако такое разделение ферментов только по небольшой разнице в субстратной специфичности в данном случае вряд ли оправдывается, поскольку деаминазы адениловых нуклеотидов микроорганизмов, за исключением некоторых АМФ-специфичных деаминаз дрожжей (Yoshino et al., 1979; Yoshino, Murakami, 1981<sup>a</sup>), обладают широким спектром субстратов, деаминируют как АМФ, так и АДФ, АТФ и аденозин.

Субстратная специфичность известных деаминаз адениловых нуклеотидов обобщена в таблице 2, в которую включен и фермент

Таблица 2

Субстратная специфичность дезаминаз адениловых нуклеотидов  
микроорганизмов

Продуценты	Наименование дезаминазы	Субстраты (в порядке убывания скорости реакции)	Источник литературы
1	2	3	4
<u>Бактерии:</u>			
<i>Beneckea patriogen</i>	аденозинмонофосфат-дезаминаза	АМФ	Niven et al., 1977
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	аденозинмонофосфат-дезаминаза	АМФ, АТФ, АДФ, аденозин, дезоксиАМФ, дезоксиАДФ, дезоксиАТФ, дезоксиаденозин, кофермент А, НАД, 3',5'-цАМФ, ФАД	Yates, 1969
<u>Актиномицеты:</u>			
<i>Actinomyces antibioticus</i>	аденозинтрифосфат-дезаминаза	АТФ, АДФ, АМФ, аденозин	Максимова и др., 1974; Максимова, 1975
<u>Микроскопические грибы:</u>			
<i>Aspergillus glaucus</i>	аденозинтрифосфат-дезаминаза	АТФ, АДФ, АМФ	Chung et al., 1967

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
<i>A. niger</i>	аденозиндифосфат-дезаминаза	АДФ, АТФ, АМФ, аденозинтетрафосфат, дезоксиАМФ, аденозин, 3', 5'-цАМФ, 3'-АМФ	Chung et al., 1967; Fujishima, Yoshino, 1967
<i>A. ochraceus</i>	аденозиндифосфат-дезаминаза	АДФ, АТФ, аденозинтетрафосфат, АМФ, дезокси АМФ, 3', 5'-цАМФ, аденозин, 3'-АМФ	Chung et al., 1967
<i>Aspergillus oryzae</i>	аденозиндезаминаза	аденозин, АМФ, 3'-АМФ, АДФ, АТФ, НАД, ФАД, кофермент А, дезоксиаденозин, дезокси АМФ, дезокси АТФ, 2', 3'-цАМФ, АрА, АрАр, АрУр, 3', 5'-дифосфатаденозин, 3-изоаденозин, 3-изоАМФ, АрАрА, АрАрАрА	Mitchell, McElroy, 1946; Kaplan et al., 1952; Kaplan, 1955 <sup>6</sup> ; Minato et al., 1965, 1966; Wolfenden et al., 1966, 1967; Minato, 1968
<i>A. terreus</i>	аденозинтрифосфат-дезаминаза	АТФ, АДФ, АМФ, аденозин	Chung et al., 1967
<i>Candida tropicalis</i>	аденозинмонофосфатдезаминаза	АМФ	Yoshino, Murakami, 1981 <sup>6</sup>

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
<i>Microsporium audouini</i>	аденозинтрифосфат- дезаминаза	АТФ, аденозинтетрафосфат, АДФ, АМФ, дезоксиАТФ, дезоксиАДФ, 3',5'-цАМФ, аденозин, 3'-АМФ, НАД, ФАД, кофермент А, 3-изоАМФ	Aida et al., 1965; Chung, Aida, 1967; Chung et al., 1967, 1968
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	аденозинмонофосфат- дезаминаза	АМФ	Грибанов, 1974; Murakami, 1979; Yoshino et al., 1979

из *Aspergillus oryzae*, называемый неспецифической аденозин-дезаминазой. Из таблицы видно, что деаминазы адениловых нуклеотидов обнаружены у многих микроскопических грибов и только у некоторых бактерий и актиномицетов. При том сообщение о деаминазе *Beuversia natriegens* (Niven et al., 1977) теми же авторами позже было поставлено под сомнением (Pickard et al., 1980). Много продуцентов найдено среди микроорганизмов рода *Aspergillus*. При проверке 30 штаммов микроскопических грибов в 18 из них обнаружена аденилатдезаминазная активность. Наличие деаминаз адениловых нуклеотидов свойственно не отдельным штаммам, а обычно целому виду. Среди 3 видов *Penicillium*, 3 видов *Mucor* и 3 видов *Rhizopus* теми же авторами продуценты деаминаз не были найдены (Chung et al., 1967).

Большинство деаминаз адениловых нуклеотидов микроорганизмов отличаются от аденилатдеаминаз высших организмов более широким спектром субстратов. Низкоспецифичные ферменты деаминаруют как рибозо-, так и дезоксирибозопроизводные аденозина, но с меньшей скоростью. Например, скорость реакции деаминарования дезоксирибозопроизводных деаминазой *Microsporium audouinii* составляет 30% по сравнению со скоростью деаминарования рибозо-производных (Chung et al., 1967), а деаминазой из *Aspergillus oryzae* - 50% (Minato et al., 1966). Для ферментов этой группы характерно и то, что они намного быстрее деаминаруют 5'-нуклеотиды чем 3'-нуклеотиды и вовсе не деаминаруют 2'-нуклеотиды. Ни один из них не расщепляет аденин. Относительно мало пригодными субстратами являются циклические нуклеотиды. Проверена способность фермента из *Aspergillus oryzae* деаминировать олигомеры АМФ и полиадениловую кислоту (Wolfenden et al., 1967), и выяснено, что с удлинением цепи олигонуклеотидов убывает

скорость дезаминирования концевой адениловой остатка, например, скорость реакции с динуклеотидом составляет 15% от скорости реакции с субстратом аденозином, с тринуклеотидом — только 7,7%, а с тетра-нуклеотидом — 3,0%. Фермент полностью неактивен по отношению к полиадениловой и полидезоксирибозоадениловой кислоте (Sehgal, Siegel, 1964; Wolfenden et al., 1967), хотя дезаминирует 3',5'-дифосфоаденозин (Kaplan, 1955<sup>6</sup>), структура которого похожа на структуру остатка полинуклеотидов. Дезаминазы адениловых нуклеотидов микроорганизмов также как специфичные дезаминазы высших организмов катализируют не только замену аминогруппы гидроксилгруппой, но и замену метил-, метокси-, гидрозин- и галогенгрупп, если они расположены у 6 атома углерода пуринового кольца (Wolfenden, 1966; Chung et al., 1967, 1968). Наименьшие значения  $K_M$  для субстратов разных дезаминаз довольно близки, обычно они имеют порядок  $10^{-4}$  М. Так  $K_M$  фермента *Aspergillus glaucus* равен  $1,7 \cdot 10^{-4}$  М, *Microsporium audouinii* —  $3,3 \cdot 10^{-4}$  М, *Aspergillus oryzae* —  $6,0 \cdot 10^{-4}$  М (Chung et al., 1967).

В литературе многократно отмечено, что дезаминазы адениловых нуклеотидов не требуют присутствия катионов или других кофакторов для проявления каталитической активности (Minato et al., 1965; Wolfenden et al., 1967). Активаторы найдены только у дезаминазы *Actinomyces antibioticus* (Максимова и др., 1974). Ингибирующее действие оказывают многие ионы металлов (Aida et al., 1965; Minato et al., 1965; Chung et al., 1967; Chung, Aida, 1967; Yates, 1969; Максимова и др., 1974; Yoshino, Murakami, 1981<sup>2</sup>). Высказаны предположения, что некоторые катионы ингибируют образование фермент-субстратного комплекса путем присоединения к фосфатным группам субстрата (Chung et al.,

1967; Максимова, 1975) или изменяют заряд на поверхности фермента (Максимова, 1975) или его конформацию (Chung, Aida, 1967).

Дезаминазы адениловых нуклеотидов микроорганизмов работают в широком диапазоне концентраций водородных ионов с оптимумом в слабо кислой или кислой среде от pH 3,4 для дезаминаз из *Aspergillus melleus* и *A. ochraceus* (Chung et al., 1967) до pH 7,0 для дезаминаз из *A. oryzae* (Mitchell, McElroy, 1946), *Desulfovibrio desulfuricans* (Yates, 1969) и *Saccharomyces cerevisiae* (Yoshino et al., 1979). Несколько оптимумов pH найдено только у дезаминазы из *Actinomyces antibioticus* (Максимова, 1975) - при pH 5,4, 6,8 и 8,7.

Все изученные ферменты этой группы относительно термостабильны. Например, дезаминаза из *Aspergillus oryzae* при выдерживании при 80°C в течение 10 мин. теряет только 50% активности, но сохраняет ее в течение нескольких месяцев при 8°C и неделю - при 25°C (Mitchell, McElroy, 1946). Дезаминаза из *A. melleus* стабильна в течение часа при 60°C и pH 6,0 и при 45°C и pH 7,0, что использовалось для ее очистки от фосфатаз (Fujishima, Yoshino, 1967). Оптимальная температура для катализа ферментом из *Actinomyces antibioticus* равна 37 °C (Максимова и др., 1974), *Microsporium audouini* (Chung et al., 1968) и *Aspergillus oryzae* (Mitchell, McElroy, 1946) - 40 °C, *A. melleus* (Fujishima, Yoshino, 1967) - 52 °C.

Сложная молекулярная структура установлена только у аденозиндезаминазы *Aspergillus oryzae* (Minato, 1968). Этот фермент имеет молекулярную массу 214 000-221 000, диссоциирует на 8 субъединиц и состоит из белка - 75% и углеводов - 25 %.

### 1.3. Получение ферментных препаратов, обладающих аденозин- и аденилатдезаминазной (аденозинмонофосфатдезаминазной) активностью, в микробиологической и биохимической промышленности

Продуценты аденозин- и аденилатдезаминаз в настоящее время находят применение в биохимической и микробиологической промышленности, где они используются для получения ферментных препаратов, которые в свою очередь необходимы в качестве биохимических реагентов в научных исследованиях и в очищенном или неочищенном виде для производства производных гипоксантина путем дезаминирования соответствующих производных аденина (Скрябин, Головлева, 1976). ИМФ находит применение в качестве вкусовой добавки к пище (Киносита, 1968). Инозин как стимулятор синтеза нуклеотидов и активатор некоторых путей аэробного обмена веществ применяется в медицине как средство для лечения ишемической болезни (Гнеушев и др., 1978).

В очищенном виде промышленностью выпускается аденозиндезаминаза из тонкой кишки телят, используемая и для производства инозина [Пат. 2928773 (США)]. В научных исследованиях используют препараты этого фермента с удельной активностью около 200 международных единиц (МЕ)/мг белка, которые выпускают фирмы *Boehringer Mannheim* (*Biochemicals catalogue*, 1982), *Sigma* (*Sigma Price List*, 1982) и *Calbiochem* (Pollara et al., 1975), а также препараты из мышц кролика с удельной активностью 30-60 МЕ/мг белка и из селезенки крупного рогатого скота - 30-90 МЕ/мг белка, выпускаемые фирмой *Sigma* (*Sigma Price List*, 1982). Но несомненно, что более перспективным является получение ферментных препаратов из микроорганизмов (Шпрунка, 1978). Японскими фирмами *Yamasa Shoy* и *Toyobo* разработаны способы получения аденилатдезаминаз из микроскопических грибов *Aspergillus oryzae*

IFO 4176 [Вылож. заявка 50-52273 (Япония)], *A. sojae* IFO 4252 [Pat. 52-31032 (Япония); Вылож. заявка 50-88283 (Япония)], *A. tamari* IAM 2137 [Pat. 52-31948 (Япония)], дрожжей *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Candida*, *Torulopsis*, *Endomycopsis* [Вылож. заявка 55-120788 (Япония)]. Дрожжевую аденилатдезаминазу получают из клеток в очищенном, лиофилизированном виде с активностью 5 единиц на мг препарата. Остальные упомянутые продуценты используют для получения ферментов из культуральной жидкости после выращивания грибов в течение 4 суток при 28-30°C в жидкой питательной среде, содержащей углеводные эфиры ненасыщенных жирных кислот, пептон и минеральные соли.

Возможности получения **иммобилизованных** препаратов деаминаз исследуются фирмами *Yamasa Shoy (Rokugawa et al., 1980)* и *Amano Pharmaceutical Co.* Уже в 1968 году изучены каталитические свойства и стабильность связанной с ДЭАЭ-целлюлозой АТФ-деаминазы из *Microsporium audouini (Chung et al., 1968)*. Установлено, что при связывании не меняется её субстратная специфичность и термоустойчивость, оптимум pH передвигается в кислую сторону (от 5,0 до 3,0) и сохраняется около 25% каталитической активности по сравнению со свободным ферментом. Запатентован способ получения **иммобилизованной** в сополимере глицидил-метакрилат-акриламида аденилатдеаминазы с активностью 2053 единиц на грамм [Вылож. заявка 54-20192 (Япония)]. Предложена также иммобилизация деаминаз на ионообменных смолах, например, *Duolite A-4*, с применением комплекса титана [Вылож. заявка 52-87293 (Япония)]. Связывание со смолой увеличивает термоустойчивость фермента и дает возможность использовать один и тот же препарат по крайней мере 20 раз (*Rokugawa et al., 1980*). В качестве фиксированного ферментного препарата

предложены конидии ряда микроскопических грибов, принадлежащих к роду *Aspergillus* [Вылож. заявка 53-88391 (Япония)]. Конидии содержат целый комплекс ферментов, которые гидролитически расщепляют нуклеиновые кислоты и нуклеотиды до нуклеозидов.

Для определения концентрации аденозина, что часто необходимо в медицинской практике, предложен комплекс щелочной фосфатазы и дезаминазы, **иммобилизованных** на активированных глутаральдегидом производных полиэтилиминнейлона (Sundaram, 1978).

Фирмами Yamasa Shoy, Kyowa Hakko Kogyo, Marukin Shoy и Ohki Pharmaceutical Co. запатентованы способы получения инозина и ИМФ с применением растворов дезаминаз *Microsporium audouinii* [Пат. 43-11759 (Япония)], *Penicillium breneuo-stoloniferum* IAM 7312 [Пат. 43-24478 (Япония)], *Aspergillus melleus* [Пат. 46-20038, 47-04511 (Япония)], *A. sojae*, *A. oryzae*, *A. niger* и *A. awamori* [Пат. 50-22115 (Япония)]. Большой частью дезаминазы используются в комплексе с другими ферментами катаболизма нуклеиновых кислот для расщепления дрожжевой РНК до нуклеотидов, из которых особой ценностью обладают ИМФ и ГМФ (Noguchi et al., 1976), применяемые в пищевой промышленности в качестве вкусовых добавок (Киносита, 1968).

## Глава 2. Ферменты, дезаминирующие производные аденина, – регуляторы и индикаторы изменений физиологических процессов в организме

### 2.1. Участие дезаминаз в спорообразовании у микроорганизмов

Процессы спорообразования у прокариотов (бактерий и актиномицетов) и эукариотов (микроскопических грибов) рассмотрены многими авторами (Leuchtenberger, 1973; Билай, 1974; Лория и др., 1976; Калакуцкий, Агре, 1977; Сторк, 1977). Споруляцию бацилл считают удобной моделью для изучения клеточной дифференциации, хотя в последние годы всё больше подчеркивается её сложность (Szulmajster, 1979).

Процесс спорообразования у бактерий разные авторы разделяют на 6 (Leuchtenberger, 1973) или 7 (Лория и др., 1976) стадий. Для каждой стадии характерно изменение ряда биохимических показателей, в том числе активности ферментов. К таким ферментам принадлежат, например, экзопротеаза, аланиндегидрогеназа, щелочная фосфатаза, глюкозодегидрогеназа, аконитаза, термостойчивая каталаза, рибозидаза, аланинрацемаза, аденозиндезаминаза (Leuchtenberger, 1973). Повышенная аденозиндезаминазная активность свойственна 4-й стадии споруляции, когда происходит образование кортекса, т.е., заполнение пространства между внутренней и внешней оболочкой споры полимерами глюкнопептидной природы. Однако аденозиндезаминаза не является собственно споровым ферментом, как рибозидаза, активность которой отсутствует в вегетативных клетках и появляется во время спорообразования. Аденозиндезаминазная активность при этом повышается только в 4–5 раза (Leuchtenberger, 1973). Во время образования спор,

именно в 4-ой стадии, быстро повышается активность также и *N*-ацетилмурамил-*L*-аланин-амидазы и  $\gamma$ -*D*-глутамил-(*L*)мезодиаминопимелилен-эндопептидазы, имеющих значение для синтеза кортекс-специфичного пептидогликана (Guinand et al., 1975). Щелочная фосфатаза в это время ассоциирована с цитоплазматической мембраной развивающейся споры (Glenn, Coote, 1975). Некоторые ферменты цикла трикарбоновых кислот, например, изоцитратдегидрогеназа, дерепрессируются только при споруляции (Banger, 1969), другие, напротив, именно на этой стадии развития подвергаются инактивации, например, треониндегидратаза, аспартаткиназа, пируваткиназа (Bernlohr, Gray, 1969). Одновременно с инактивацией происходит и протеолитическая деградация ферментов, что показано иммунохимическими методами на примере аспартаттранс-карбамилазы и глутаминфосфорибозилпирофосфатамидотрансферазы, которые инактивируются перед споруляцией в голодающих клетках (Switzer et al., 1979). Некоторые другие ферменты (альдолаза, аденилаткиназа) подвергаются изменениям под действием протеолитических ферментов (Spudich, Kornberg, 1969). Характерно то, что в стационарной фазе роста бактерии заканчивается синтез нуклеиновых кислот и инактивируются ферменты начальных этапов биосинтеза *de novo* нуклеотидов (Switzer et al., 1975).

Установлено, что во время споруляции *Bacillus subtilis* вновь синтезируются 75-95% белков, входящих в состав новообразовавшейся споры (Spudich, Kornberg, 1968).

Споры бактерий характеризуются также и повышенной фосфодиэстеразной и нуклеозидфосфомоноэстеразной активностью (Feliccioli et al., 1973). Эти ферменты необходимы для расщепления нуклеиновых кислот и их производных. Известно, что перед спорообразованием повышается содержание кислоторастворимых нуклеоти-

дов, а понижение уровня пуринов, особенно гуаниловых нуклеотидов, инициирует споруляцию (Lopez et al., 1979). Известно также, что в конце экспоненциальной фазы роста уменьшается энергетический уровень, и даже значения энергетического заряда 0,30–0,35 в условиях споруляции не приводят к гибели клеток (Hutchison, Hanson, 1974). У микроскопических грибов тоже наблюдается сходная закономерность (Астапович, 1979). В то же время происходит синтез высокофосфорилированных адениловых нуклеотидов, являющихся инициаторами спорообразования (Rhaese, Groscurth, 1977; Hecker, 1978).

Установлено, что споруляцию бактерии индуцирует также и инозин, ранее описанный как эндогенный фактор спорогенеза (Sekar et al., 1981). Другие авторы указывают на аналогичную активность аденозина (Powell, 1951; Hyeon et al., 1967). У грибов со спорообразованием связан также и 5'-АМФ, 3'-АМФ и 3',5'-цАМФ (Хион, 1977). Имеются сведения о роли инозина в активации прорастания спор (Shibata et al., 1978). Инозин накапливается в них уже во время споруляции, и большинство его расходуется при прорастании путем превращения в ИМФ для синтеза нуклеиновых кислот. А инозин образуется из аденозина в процессе аденозиндезаминазной реакции (Pendyala, Wellman, 1975). Высказано мнение, что понижение уровня инозина можно считать признаком прорастания. Со споруляцией и развитием связан также и гипоксантин, который образуется в свободных спорах из инозина (Lawrence, 1955). Существенное повышение аденозиндезаминазной активности наблюдается в спорулирующих культурах *Bacillus* с максимумом в свободных спорах (Powell, Strange, 1956), поэтому можно предполагать, что дезаминаза связана со способностью спор к прорастанию. Известно также, что фермент в покоящихся спорах более термостабилен, чем в экстракте и в прорастающих

спорах (Powell, Hunter, 1956).

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что аденозиндезаминаза, изменяя соотношение аденозина и инозина, участвует в развитии бактерий, но из-за недостатка и противоречивости литературных данных остается невыясненным, в чем именно заключается её физиологическая роль. О значении дезаминаз производных аденина в развитии других микроорганизмов, кроме бактерий, литературные источники нами не были обнаружены.

## 2.2. Участие дезаминаз в обеспечивании нормального протекания физиологических процессов у высших организмов

Дезаминазы производных аденина участвуют в регуляции разнообразных физиологических процессов организмов. Так как регуляция определяется их каталитической активностью, а не просто белковой или гликопротеидной структурой, то обратим внимание и на биологическую активность аденозина, его производных и продуктов реакций дезаминирования - аммиака и производных гипоксантина.

Адениловый остаток входит в состав высокомолекулярных соединений клеток - нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, некоторые адениловые олигонуклеотиды участвуют в регуляции клеточного метаболизма (Severin et al., 1982; Ogilvie, Antl, 1982), адениловые нуклеотиды в составе нуклеотидного пула определяют энергетический заряд (Atkinson, 1972), другие низкомолекулярные производные аденина необходимы для синтеза витаминов и коферментов (Lutwak-Mann, 1939), важным регулятором метаболизма является цАМФ (Циклические нуклеотиды, 1979; Ткачук, 1981).

Производные гипоксантина, а именно ИМФ, являются предшественниками биосинтеза *de novo* пуриновых нуклеотидов (Moat, Friedman, 1960; Blakley, Vitols, 1968) и входят в пуриновый цикл (Magasanik, Karibian, 1960; Hartman, 1970). Инозиловый остаток расположен в антикодонных участках транспортных РНК как минорное соединение (Радио, Соколов, 1978).

Образование аммиака в реакциях дезаминирования влечет за собой изменение pH среды - существенно подщелачивает её (Lowenstein, Tornheim, 1971; Нечипоренко и др., 1980). Так при дезаминировании АМФ в саркоплазматическом ретикулуме изменяется pH от 6,5 до 8,0 (Курский и др., 1979). Существует мнение, согласно которому функцией аденилатдезаминазы в мышцах является устранение ацидоза (Zolano, Coffee, 1979). А подщелачивание в свою очередь служит предпосылкой для высвобождения ионов кальция (Курский и др., 1979; Нечипоренко и др., 1980), являющихся наряду с цАМФ важным регулятором клеточного метаболизма и межклеточных взаимодействий (Мецлер, 1980). Выяснено, что в условиях физической нагрузки или электродной стимуляции повышается содержание аммиака в мышцах (Rajendra et al., 1980). Аденилатдезаминаза участвует в регуляции мышечного сокращения в составе ферментной системы вместе с аденилаткиназой, креатинкиназой, АТФ-азой и ферментами, регенерирующими АМФ из ИМФ - аденилсукцинатсинтетазой и аденилсукциназой (Lowenstein, Tornheim, 1971; Четверикова, 1975; Zubaidah et al., 1979). Установлено, что при недостатке аденилатдезаминазы в мышцах медленно протекает восстановление адениловых нуклеотидов, что является причиной болезни (Fishbeim et al., 1978), при которой работа мышц не сопровождается образованием аммиака, более чем на 9% понижается уровень адениловых нуклеотидов, не накапливается ИМФ

и общее количество пуринов снижается до 21% по сравнению с контролем (Sabina et al., 1980). Недостаток мышечной аденилатдезаминазы вызывает также и нарушения в контроле гликогенолиза, так как АМФ стимулирует фосфоорилазу (Devuluri et al., 1981).

Аденозиндезаминаза играет значительную роль в регуляции снабжения мышц кислородом и питательными веществами (Arch, Newsholme, 1978). При низких концентрациях аденозина (меньше 5 мкМ) происходит его фосфорилирование, а при высоких - деаминарование (Green, Ishii, 1972).

В нескольких обзорах подробно рассмотрена роль аденозина в качестве вазодиллятора (Verne, 1964; Mustafa, 1980). Установлено, что аденозин легко проникает из клеток в тканевую жидкость и расширяет сосуды, а его образование при расщеплении адениловых нуклеотидов стимулируется недостатком кислорода. При устранении гипоксии заканчивается и гиперпродукция аденозина, который быстро инактивируется аденозиндезаминазой. Однако поступление в сосуды аденозина зависит и от аденилатдезаминазной активности, поскольку он образуется из АМФ, который также подвергается деаминарованию (Фетисова, Соколова, 1979). Кроме того, сообщено об аллостерической трансформации очищенной аденилатдезаминазы, приобретающей под активацией  $K^+$  способность деаминировать аденозин (Пеккель, Киркель, 1978). Выяснено, что аденозин регулирует тонус коронарных сосудов венозной крови и во время гиперемии (Olsson et al., 1978), а добавление экзогенной аденозиндезаминазы уменьшает компенсаторное усиление циркуляции крови после миокардиальной гиперемии (Zaito et al., 1981).

Аденозин и адениловые нуклеотиды имеют важное значение в нейротрансмиссии, выступая в качестве медиаторов. Во многих

органах, особенно в пищеварительном тракте, находятся пуриnergические нервы (Бунятян, 1977; Ribeiro, 1978). Из клеток центральной нервной системы выделен инозин и гипоксантин, которых также причисляют к эндогенным нейромодуляторам (Skolnick et al., 1978). Возможно, что аденозин действует на нейротрансмиссию через посредники — ионы кальция и ЦАФМ (Kuroda, 1981).

Установлено, что в мозговой ткани происходит дезаминирование аденозина, АМФ, АДФ и НАД, в результате чего образуется аммиак, который в высоких концентрациях ингибирует аденозиндезаминазную реакцию. Аденозин и его нуклеотиды оказывают угнетающее действие на постсинаптические потенциалы и депрессируют нейромускульный перенос (Бунятян, 1977). Противоположным действием обладают теofilлин и другие метилксантины. Подтверждается гипотеза, что в основе их стимулирующего влияния на центральную нервную систему лежит блокада пуриnergического ингибирования синаптических выходов (Harna et al., 1978).

Увеличенная аденилатдезаминазная активность, согласно проведенным опытам, связана с повышенной нейральной активностью (Sadavisudu et al., 1980). Более того, добавление экзогенной аденозиндезаминазы гетерологического происхождения (препарат из тонкой кишки телят) усиливает освобождение допамина из синаптосом. В параллельно поставленном опыте, ингибируя эндогенную аденозиндезаминазу дезоксиоформицином, наблюдали противоположный эффект (Michaelis et al., 1979).

Выяснено, что аденилатдезаминазной активностью обладает сократительный актомиозинподобный белок нервной ткани — нейростенин, роль которого заключается в осуществлении экзоцитоза, сопровождающегося высвобождением нейротрансмиттеров из синаптических пузырьков (Ниязян, Арутюнян, 1980).

Аденозин и аденозиндезаминаза оказывают противоположные эффекты и на регуляцию липолиза (Fredholm, 1978). Как известно, аденозин, образующийся в процессе расщепления АТФ, выделяется из жировых клеток в среду инкубации в количествах, которые ингибируют накопление цАМФ и липолиз (Schwabe et al., 1973). Аденозин имеет свойство связываться с участками мембран жировых клеток. Это является основой его ингибирующего действия на активность аденилатциклазы (Fain, Wieser, 1975). Роль аденозиндезаминазы в процессе липолиза, по-видимому, заключается в превращении аденозина в биологически менее активный инозин (Schwabe, Ebert, 1974). Добавление аденозиндезаминазы усиливает липолиз жировых клеток (Fain, Wieser, 1975). Вызванный ей липолитический эффект сравним с действием норадреналина и теофиллина (Schwabe, Ebert, 1974). Так как нуклеозиды влияют и на глюкогенез (Haeskel, 1977), то объяснимо и одновременное изменение дезаминазой метаболизма глюкозы (Fernandez, Saggerwon, 1978).

Изучение роли пуриновых соединений и дезаминирующих их ферментов в настоящее время привлекает особое внимание в связи с тем, что обнаружена взаимосвязь между врожденной комбинированной иммунонедостаточностью и дефицитом аденозиндезаминазы (Giblett et al., 1972). Однако параллельно с накоплением всё новых доказательств этого (Dissing, Knudsen, 1972; Parkman et al., 1975) появились и статьи, в которых указывалось, что недостаток дезаминазы не всегда сопровождается иммунодефицитом (Burrige, Paetkau, 1977; Tassi et al., 1978; Hirschhorn et al., 1979). И в 1978 году Всемирная Организация Здравоохранения рекомендовала считать недостаток аденозиндезаминазы одной из форм тяжелого комбинированного иммунодефицита, которая пере-

дается по аутосомно-рецессивному типу наследования (Иммунология, 1979). Болезнь характеризуется многократными тяжелыми инфекционными заболеваниями, вызываемыми грибами, протозоями, бактериями и вирусами (Valentine, Paglia, 1980). Средняя продолжительность жизни детей - около 9 месяцев. Около 50% таких детей наряду с недостаточностью аденозиндезаминазы имеют аномалии хрящей с дефектами хондроцитов, костные поражения типа дизостоза (Иммунология, 1979).

Синтез и деградация пуриновых соединений занимает значительное место в метаболизме лимфоцитов, особенно при их активации в ответе на стимуляцию антигенами или митогенами (Seegmiller et al., 1977; Raivio, Novi, 1977; Magnuson, Perryman, 1979). Наибольшее внимание уделяется метаболизму аденозина и дезоксиаденозина (Marone et al., 1980). Это вполне оправдано, потому что недостаток ферментов обмена пуриновых нуклеозидов - аденозиндезаминазы, пуриннуклеозидфосфорилазы и 5'-нуклеотидазы (Johnson et al., 1977) - вызывает нарушение функциональной активности лимфоцитов. Первые два из вышеупомянутых ферментов предотвращают накопление аденозина. При низких концентрациях он превращается в АМФ, а при высоких - подвергается быстрому дезаминированию под действием аденозиндезаминазы, обладающей относительно низкой аффинностью к субстрату (высокая  $K_M$ ) и большой скоростью реакции (Seegmiller et al., 1977). В нормальных клетках большинство аденозина превращается в инозин и гипоксантин, а в клетках, где специфическими ингибиторами блокирована аденозиндезаминаза, накапливаются адениловые нуклеотиды (Magnuson, Perryman, 1979).

Концентрация аденозина в крови в норме находится в пределах от  $3 \cdot 10^{-7}$  до  $3 \cdot 10^{-6}$  М (Marone et al., 1980). Низкие кон-

центрации аденозина стимулируют развитие нормальных лимфоцитов, а высокие ( $\geq 10^{-4}M$ ) - сильно ингибируют. Во время стимуляции клеток фитогемагглютинином (ФГА) повышается аденозиндезаминазная активность на клетку с максимумом во второй день, нестимулированные клетки активность теряют. При стимуляции наблюдается повышенная утилизация пуриновых оснований. Инкубация эритроцитов в присутствии аденозина снижает его содержание (Raivio, Novi, 1977). Аденозин или ингибиторы аденозиндезаминазы понижают уровень включения  $^3H$ -тимидина в лимфоциты, стимулированные ФГА и др., особенно в первые 24 часа после начала стимулирования (Carson, Seegmiller, 1976; Magnuson, Perryman, 1979).

У детей, страдающих от дефицита аденозиндезаминазы, наблюдается только 25% от нормального пролиферативного ответа на стимулирование ФГА. А добавление аденозиндезаминазы в 2-6 раз повышает включение  $^3H$ -тимидина или  $^3H$ -лейцина в случае митотической стимуляции (Seegmiller et al., 1977). Нормальные человеческие лимфоциты периферической крови содержат около  $1,43 \cdot 10^{-3}$  ME аденозиндезаминазы на  $10^6$  клеток (Bremar et al., 1982). Несколько повышенную дезаминазную активность в Т-клетках по сравнению с В-лимфоцитами обеспечивают более высокая скорость синтеза фермента и более длинный период его существования (Daddona, 1981). Высокая аденозиндезаминазная активность свойственна также и макрофагам (MacDermott et al., 1980).

Имеются данные, указывающие на то, что дезаминазная активность меняется в зависимости от стадии дифференциации лимфоцитов, в частности - тимоцитов (Shore et al., 1981). При стимулировании липополисахаридом аденозиндезаминазная активность повышается в 1,9, 2,7 и 3,0 раза соответственно через 24, 48 и 72 часов (Bremar et al., 1982). Аденилатдезаминазная актив-

ность в лимфоцитах примерно в 13-16 раз ниже, чем аденозиндезаминазная (Scholar, Calabresi, 1973). Человеческие эритроциты в норме содержат 35-36 МЕ аденозиндезаминазы на 1 г гемоглобина, а при иммунодефиците дезаминаза в них полностью отсутствует (Chen et al., 1979).

T- и B-клетки отличаются по чувствительности к дефициту ферментов обмена аденозина. Более чувствительными являются T-лимфоциты (Seegmiller et al., 1977), хотя дефицит аденозиндезаминазы влияет и на функционирование B-клеток, например, синтез антител (Adams et al., 1978). Как известно, во время образования антител в нормальных лимфоидных клетках увеличивается аденозиндезаминазная активность (Hall, 1963).

Установлено, что аденозиндезаминаза связана с мембранами и как компонент внешней поверхности клеточной мембраны участвует в транспорте нуклеозидов (Pfleger et al., 1969).

Дефицит аденозиндезаминазы как болезнь характеризуется несколькими биохимическими показателями: увеличенной экскрецией дезоксиаденозина и 7-метилгуанина и уменьшенной - мочевой кислоты (Donofrio et al., 1978; Simmonds et al., 1978), повышенным уровнем дезоксиАТФ (Cohen et al., 1978), ингибированием  $\beta$ -аденозилгомоцистеингидролазы (Ratetsch et al., 1981). Вследствие этого уменьшается ответ лимфоцитов на стимуляцию митогенами, уменьшается образование антител, увеличивается время до отторжения кожных трансплантатов, наблюдается повышенная чувствительность замедленного типа и лимфопения (Tedde et al., 1980). Отмечено также ингибирование образования кэпов иммуноглобулинов (Braun et al., 1980) и высвобождения из базофилов гистамина (Marone, Lichtenstein, 1979), увеличение содержания гемоглобина в моче из-за лизиса эритроцитов (Smith

et al., 1980), отмечается и ненормальная агрегация тромбоцитов (Schwartz et al., 1978) и ингибирование функционирования макрофагов (Yagawa, Okamura, 1981).

Изучение отдельных путей метаболизма аденозина (рис. 1) привело к возникновению несколько гипотез предполагаемого механизма токсичности аденозина: 1) недостаток пиримидинов (Green, Chan, 1973; Novi et al., 1976); 2) стимуляция аденилатциклазы (Marone et al., 1980); 3) ингибирование S-аденозилметионин-зависимого метилирования (Kredich, Morshfield, 1979).

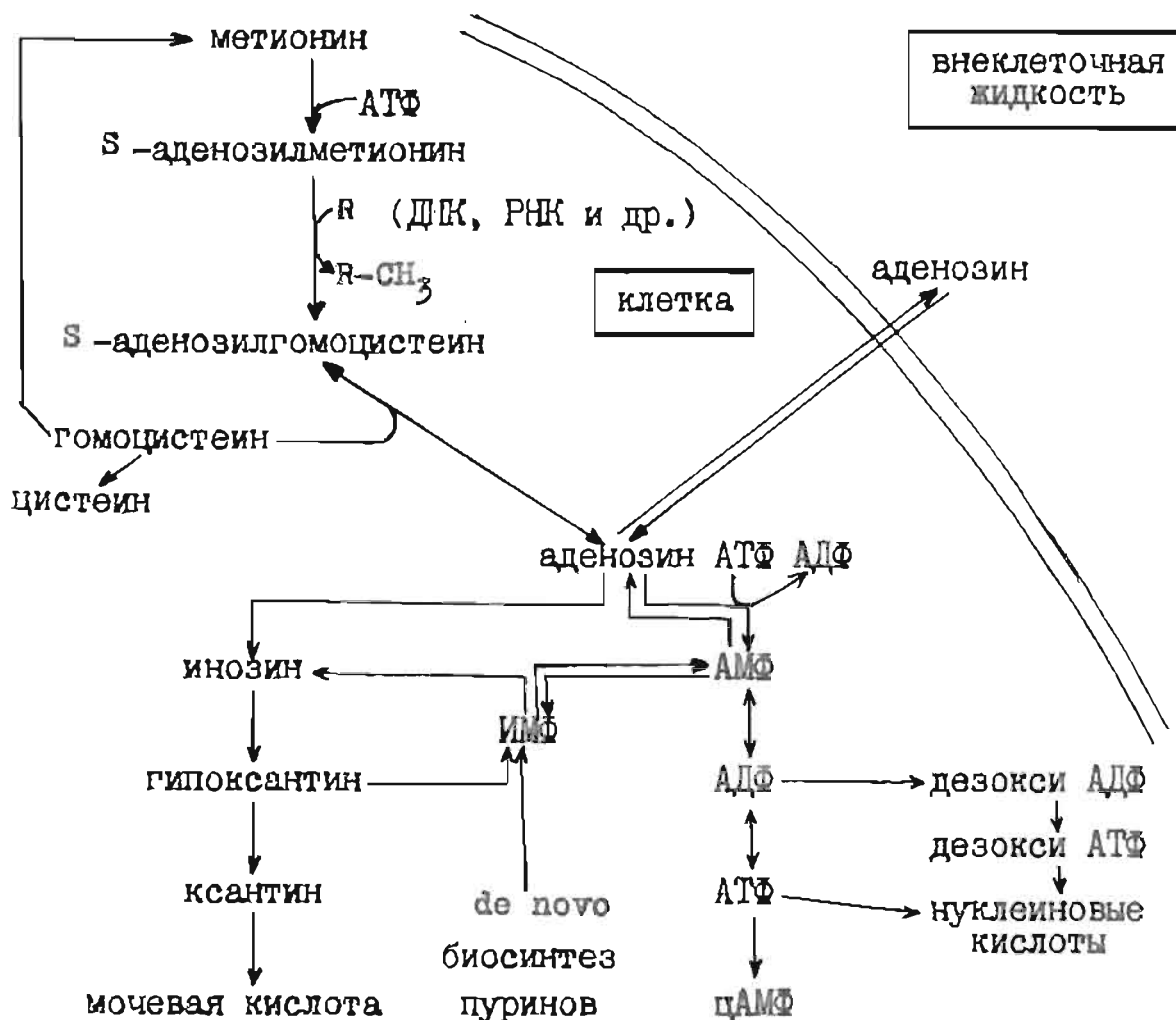


Рис. 1. Схема метаболизма аденозина (Marone et al., 1980)

Первая гипотеза не пользуется популярностью, так как установлено, что добавление пиримидинов лишь незначительно уменьшает токсичность аденозина, и совсем не уменьшает в клетках, дефицитных по аденозинкиназе (Kredich, Hershfield, 1979). Суммируя литературные данные, можно предположить, что наиболее правильное мнение высказано Марон с соавторами (Marone et al., 1980): аденозин действует в качестве эндогенного модулятора иммунных функций двумя путями - взаимодействуя с рецептором на поверхности клетки и стимулируя аденилатциклазу и/или влияя на внутриклеточное метилирование. А эти оба процесса участвуют в регуляции самых важнейших физиологических функций клеток. Кроме того, стало известно, что цАМФ-связывающий белок обладает S-аденозилгомоцистеиназной активностью (Ueland, Saeb, 1979) и образует комплекс с аденозином (Jakubowski, Guranowski, 1978). Может быть, это является звеном, связывающим две вышеупомянутые гипотезы.

Имеются данные, указывающие на то, что токсичность дезоксиаденозина обуславливает другой механизм, отличающийся от механизма действия аденозина. Высказана гипотеза, что дезоксиаденозин ингибирует синтез ДНК вследствие накопления дезоксиАТФ, являющегося отрицательным эффектором рибонуклеотидредуктазы (Cohen et al., 1978). Однако другие опыты показывают, что ингибиторное действие дезоксиаденозина наблюдается уже перед началом синтеза ДНК и, следовательно, имеет другой механизм (Uberti et al., 1979). Возможно, что и он инактивирует S-аденозилгомоцистеингидролазу (Hershfield et al., 1979).

В последние годы установлена ещё одна закономерность - прямо пропорциональная зависимость между активностью внутриклеточной аденозиндезаминазы и образованию супероксидов во

время фагоцитоза, что служит мерой определения активации макрофагов (Tritsch, Niswander, 1980; Yagawa, Okamura, 1981).

Аденозиндезаминаза контролирует уровень субстрата для ксантиноксидазы, которая катализирует реакцию образования супероксидов. А в случае недостатка аденозиндезаминазы макрофаги выделяют аденозин и дезоксиаденозин, которые ингибируют иммунные функции (Chan, 1979).

При некоторых заболеваниях отмечена повышенная аденозиндезаминазная активность, например, в В-лимфоцитах - при макроглобулинемии Вальденстрема (Sioli et al., 1979), в эритроцитах - при гемолитической анемии (Fujii et al., 1980) и др. (Miwa et al., 1978; Chen et al., 1979), в лимфоцитах - в случаях гиперчувствительности кожи (Formeister et al., 1978).

После установления дефицита аденозиндезаминазной активности у больных с тяжелой комплексной иммунонедостаточностью были предприняты попытки введения больным облученных донорных эритроцитов, содержащих аденозиндезаминазу (Polmar et al., 1976<sup>a</sup>, 1976<sup>b</sup>; Cohen et al., 1978; Schmalstieg et al., 1978; Rees et al., 1979). Отмечались обнадеживающие результаты - на некоторое время уменьшился уровень аденозина, дезоксиаденозина и 7-метилгуанина в моче, уровень АТФ в эритроцитах и лимфоцитах, а также возросло количество лимфоцитов и повысилась их реактивность. Очевидно, аденозин выводится из лимфоцитов, проникает в эритроциты, где происходит его дезаминирование (Giblett, 1976). Частичное улучшение больных достигается также после трансплантации костного мозга (Hirschhorn et al., 1981). Э.Джиблет (Giblett, 1976) указывает на возможность лечения иммунонедостатка, вызванного дефицитом аденозиндезаминазы, тремя способами: трансплантацией костного мозга или лимфоид-

ных тканей, ферментзамещающей терапией путем введения нормальных обработанных эритроцитов или применением таких сравнительно низкомолекулярных соединений как тимозин, уридин и гипоксантин. Здесь упомянуты способы, ставшие уже традиционными для медицинской практики. На наш взгляд, очень перспективными терапевтическими средствами в ближайшее время станут ферментные препараты, в том числе, а может быть - и особенно, микробного происхождения. Насчет аденозиндезаминазы уже выяснено, что ее модифицированная форма - конъюгат с полиэтиленгликолем - теряет иммуногенность и имеет удлиненный период циркуляции в крови (Davis et al., 1981). Именно такого типа препараты могут быть успешно применены в медицине.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что дезаминазы производных аденина принимают участие в обеспечивании нормального протекания различных физиологических процессов высших организмов - в регуляции мышечного сокращения, кровообращения, нейротрансмиссии, метаболизма жирных кислот и в регуляции иммунного ответа.

### 2.3. Деаминазная активность в различных тканях организма при злокачественных новообразованиях

Так как недостаточность иммунных реакций в определенной степени благодетельствует возникновению опухолевых заболеваний, то вызывает интерес уровень деаминаз адениловых соединений при злокачественных новообразованиях, особенно лейкозах. Можно было ожидать, что в лейкозных клетках будет обнаружена низкая аденозиндезаминазная активность, в противоположность нормально функционирующим клеткам иммунной системы (Meier et al., 1976). Однако в большинстве случаев хронического лимфо-

цитарного лейкоза в лимфоцитах отмечен нормальный или несколько пониженный уровень аденилат- и аденозиндезаминазной активности, что не коррелирует с активностью в гранулоцитах и эритроцитах (Scholar, Calabresi, 1973; Smyth, Marrap, 1975; Meier et al., 1976). Хронический лимфоцитарный лейкоз является преимущественно болезнью В-клеток. И при других заболеваниях, затрагивающих ненормальное развитие В-клеток, также наблюдается понижение аденозиндезаминазной активности (Meier et al., 1976).

Имеются противоречивые данные об уровне дезаминазной активности при остром лимфоцитарном лейкозе - известны как случаи пониженной (Zimmer et al., 1975), так и нормальной (Scholar, Calabresi, 1973) или повышенной (Smyth, Marrap, 1975; Meier et al., 1976; Ho et al., 1980) аденозиндезаминазной активности. Наблюдаются различия в зависимости от стадии развития болезни - во время кризиса дезаминазная активность значительно повышается, а во время ремиссии - нормализуется (Nirose et al., 1979). Высказано мнение, что высокий уровень аденозиндезаминазной активности в лейкозных клетках может явиться механизмом детоксикации, предотвращающим накопление аденозина и адениловых нуклеотидов до токсичного уровня, что могло бы произойти из-за усиленной метаболической активности злокачественных клеток (Smyth, Marrap, 1975). С другой стороны, высокая дезаминазная активность может быть необходимой для обеспечения отдельных этапов метаболизма опухолевых клеток, например, понижение уровня ЦАМФ (Симхович и др., 1978), регуляции энергетического заряда и реакций метилирования (Chapman, Atkinson, 1973; Chapman et al., 1976).

Уровень ферментативной активности, по-видимому, сильно зависит от типа лейкоза. Многими авторами отмечается, что лейкозы Т-клеток характеризуются более высокой аденозиндезаминазной активностью, чем соответствующие болезни В-клеток (Smyth et al., 1978). Недавно выяснено, что один из антигенов, связанных с лимфобластным лейкозом Т-клеточного происхождения, представляет собой низкомолекулярную форму аденозиндезаминазы. Она является первым антигеном, участвующим в дифференциации гемопоэтических клеток, у которого выявлена функциональная активность (Cheshik et al., 1980).

Уровень деаминазной активности установлен также и у некоторых злокачественных клеток других типов. Например, во время развития карциномы Флекснера-Джоблинга сохраняется неизменная аденилатдезаминазная активность, а аденозиндезаминазная повышается (Fodor et al., 1958). Быстрорастущие клетки гепатом имеют повышенный уровень аденозиндезаминазной активности, а медленно растущие - нормальный (Jackson et al., 1978). В клетках аденокарциномы деаминазная активность повышена (Sufrin et al., 1979), а в клетках, трансформированных вирусом саркомы Рауса - понижена или отсутствует аденозиндезаминазная (Shipman, Drach, 1978), и наблюдается повышенная аденилатдезаминазная активность (Иванов, 1977). Возможно, что это является характерным свойством сарком (Hall et al., 1979). При заболеваниях солидными опухолями клетки периферических лимфоцитов характеризуются пониженным уровнем аденозиндезаминазной активности, что, возможно, влияет на их функциональное состояние (Ogawa et al., 1978; Russo et al., 1981).

В опытах с животными исследовано влияние ингибиторов аденозин- и аденилатдезаминаз на развитие опухолевых клеток.

Установлено, что противоопухолевым действием по отношению к некоторым перерываемым асцитным опухолям мышей обладают коформин (Lomax, Henderson, 1971), 2'-дезоксикоформин (Agarwall, 1979, 1980), изокоформин [Вылож. заявка 53-34796 (Япония)], 9- $\beta$ -арабинофуранозиладенин-5'-монофосфат (Müller et al., 1978), эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил) аденин (EINA) (Plunkett et al., 1979) и N<sup>1</sup>-метилкордицепин [Вылож. заявка 55-160796 (Япония)]. Однако клетки, к примеру, L 1210, быстро восстанавливают аденозиндезаминазную активность - через 45 часов она восстановлена уже на 80%, а в эритроцитах в то же время возобновлено только 13% активности (Agarwall, 1979). Такие ингибиторы как пентостатин (Baker, Putt, 1979) и 9- $\beta$ -D-арабинофуранозиладенин-5'-валеринат (Lipper et al., 1978) применяются в качестве противовирусных средств, а N<sup>6</sup>-замещенные производные кордицепина рекомендованы в качестве противоопухолевых и антибактериальных средств [Вылож. заявка 55-160794 (Япония)]. На мембрансвязанные дезаминазы эритроцитов их воздействие весьма незначительное.

Ингибиторы аденилат- и аденозиндезаминаз одновременно являются и низко токсичными иммунодепрессантами (Lum et al., 1977).

#### 2.4. Заключение по литературному обзору

В настоящее время выделены и описаны многие дезаминазы производных аденина как из микроорганизмов, так и из высших организмов, в том числе - человека. Ферменты разного происхождения имеют некоторое сходство по каталитическим свойствам, но различаются по молекулярной структуре и способам регуляции.

Дезаминазы производных аденина обладают многосторонней физиологической активностью, затрагивающей жизненно важные функции отдельных клеток и организма в целом, включая процессы дифференциации. Поэтому, исходя из литературных данных, можно прогнозировать их широкое применение во многих отраслях народного хозяйства и в медицине.

Однако не хватает конкретных исследований по биологической активности очищенных ферментных препаратов. Также не найдены достаточно высокоактивные продуценты дезаминаз и методы эффективного и экономически выгодного получения ферментных препаратов с различной степенью очистки. Наша работа направлена на устранение этих недостатков.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 3. Объекты и методы исследований

#### 3.1. Культивирование *P. lanoso-viride* 8D

В качестве объекта исследований выбрана культура микроскопического гриба *Penicillium lanoso-viride* 8D, выделенная из почвы на питательной среде, содержащей АМФ в качестве единственного источника азотного питания (Муйжниец, 1980), и клонированная после мутагенеза ультрафиолетовыми лучами [А. с. 782392 (СССР)]. Штамм *P. lanoso-viride* 8D - продуцент аденилатдеаминазы - хранится в коллекции культур кафедры физиологии растений и микробиологии ЛГУ им. П.Стучки и депонирован во ВНИИ Антибиотиков под номером 294 А.

Штамм *P. lanoso-viride* 8D поддерживали на косяках сусло-агара [водный раствор солода ( $\zeta = 1,024-1,028$ ), 2% агар-агара, pH 5,3-5,5] и пересеивали раз в месяц. Среду стерилизовали 3-кратно в течение 30 мин. при 0,5 атм. (112 °С) с интервалами 12 часов.

Гриб выращивали на плотной питательной среде № 1, содержащей на одну чашку Петри: отруби пшеницы - 2 г, воду крановую - 3-5 мл. Стерилизацию проводили при 1 атм. (121 °С) в течение 20 мин. Среду засеивали суспензией конидий 5-10 суточного возраста в стерильной водопроводной воде. Для получения однородной суспензии к воде добавляли детергент Твин-20 до 0,001% концентрации. На одну чашку Петри наносили 0,5-1,0 мл суспензии, содержащей около  $2 \cdot 10^6$  конидий. Количество конидий определяли по калибровочной кривой (рис. 2) - зависимости оп-

тической плотности, измеренной на ФЭК-56М в 5-ти мм кюветах при 540 нм длины волны (6-й фильтр), от концентрации конидий. Культивирование проводили в термостате при  $28 \pm 2$  °С в течение 3-4 суток.

При выращивании гриба на жидких питательных средах культивирование проводили в колбах Эрленмейера (20 мл среды в 100 мл колбе) на лабораторных качалках (режим 100 об./мин.) при  $28 \pm 2$  °С.

Среда № 2 представляет собой измененную среду № 1, в которой вместо крановой воды добавлен 0,1М калий-фосфатный буфер (рН 6,0).

Среда № 3 - среда Чапека-Докса (Литвинов, 1969): сахароза - 30,0 г,  $\text{NaNO}_3$  - 3,0 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,5 г,  $\text{KCl}$  - 0,5 г,  $\text{FeSO}_4$  - 0,01 г, агар - 20,0 г, дист. вода - 1000 мл, рН 5,0-5,5. Среду стерилизовали 3-кратно в течение 30 мин. при 112 °С с интервалами 12 часов.

Среда № 4: янтарная кислота - 1,0 г/л, глицерин - 3 мл/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,3 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 3 г/л,  $\text{KCl}$  - 2,5 г/л,  $\text{MgSO}_4$  - 0,1 г/л, смесь микроэлементов - 1 мл/л, рН 5,0-5,5. Состав смеси микроэлементов:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 8,8 г/л,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 1 г/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,4 г/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,15 г/л, бура - 0,1 г/л, молибдат аммония - 0,05 г/л. Среду стерилизовали при 1,0 атм. (121 °С) 20 мин.

Среда № 5 отличается от среды № 4 тем, что не содержит источник азота -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , а среда № 6 - не содержит источник фосфора -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . В соответствующих плотных средах добавлен агар - 20 г/л. Пуриновые и пириимидиновые соединения добавлялись после стерилизации до конечной концентрации 2,6 мМ, затем среду кипятили в течение 10 мин.

Среда № 7 (Luckner, 1977): глюкоза - 50 г/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 7,6 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,45 г/л, агар - 20 г/л, pH 5,0-5,5. Среду стерилизовали 3-кратно при 112 °С в течение 30 мин. с интервалами 12 часов.

Среда № 8: янтарная кислота - 1 г/л, глицерин - 3 мл/л,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2,7 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,3 г/л,  $\text{MgSO}_4$  - 0,1 г/л,  $\text{NaCl}$  - 1 г/л, смесь микроэлементов - 1 мл/л, агар - 20 г/л, pH 5,0-5,5. Состав смеси микроэлементов:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 5 г/л, молибдат аммония - 5 г/л,  $\text{CoSO}_4$  - 5 г/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 6 г/л,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,4 г/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,04 г/л. Среду стерилизовали при 121 °С 20 мин.

Среда № 9: триптон - 35 г/л,  $\text{NaCl}$  - 6 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 2 г/л, агар - 20 г/л, pH 5,0-5,5. Среду стерилизовали при 121 °С 20 мин.

Среда № 10: глюкоза - 50 г/л, пептон - 5 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,5 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,5 г/л,  $\text{CaCl}_2$  - 0,4 г/л,  $\text{MgSO}_4$  - 0,4 г/л, агар - 20 г/л, pH 5,0-5,5. Среду стерилизовали при 121 °С 20 мин.

Среда № 11: отвар фасоли - 50 мл/л, пептон - 2,5 г/л, сахароза - 10 г/л. Отвар фасоли получали обливанием фасоли 4 объемами воды и варением с последующей фильтрацией. Среду стерилизовали 3-кратно по 30 мин. при 112 °С с интервалами 12 часов.

Среда № 12: отвар капусты - 100 мл/л, сусло ( $\rho = 1,024$ ) - 60 мл/л, кукурузный экстракт - 2,5 г/л. Отвар капусты получали варением 100 г порезанной капусты в 1 л воды 10 мин. с последующей фильтрацией. Среду стерилизовали 3-кратно при 112 °С в течение 30 мин. с интервалами 12 часов.

Среда № 13: 400 г пшеничных отрубей, 600 г коричневого сока люцерны, представляющего собой безбелковую фракцию сока растений, полученную путем отделения кормовой хлоропластной фракции белка от зеленого сока люцерны (Селга и др., 1982). Смесь стерилизовали при 1,2 атм. (123 °С) в течение одного часа. Культивирование проводили при  $28 \pm 2$  °С и влажности 55-70% в течение 5 суток.

Среда № 14: солома - 200 г, зеленый сок люцерны - 800 г. Смесь стерилизовали при 123 °С в течение одного часа. Гриб культивировали при  $28 \pm 2$  °С и влажности 55-70% в течение 4 суток.

Среда № 15: солома - 100 г, сенная мука - 300 г, коричневый сок люцерны - 600 г. Стерилизовали при 123 °С 1 час. Культивирование гриба проводили при  $28 \pm 2$  °С и влажности 45-60% в течение 4 суток.

В качестве посевного материала *P. lanoso-viride* 8D для сред № 13-15 использовали биомассу, выращенную на среде № 1 в течение 3-5 суток.

Для совместного культивирования с *P. lanoso-viride* 8D на отходных продуктах сельского хозяйства (среды № 16-19) использовали продуцент целлюлазы *Trichoderma viride* LA-531, хранившийся в коллекции Института микробиологии им. А.Кирхенштейна АН Латв.ССР и депонированный в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Для получения посевного материала культуру *T. viride* LA-531 размножали на агаровых косяках, а затем в 3-х колбах емкостью 750 мл на среде следующего состава:  $(NH_2)_2SO_4$  - 0,6 г,  $K_2HPO_4$  - 0,3 г, KCl - 0,15 г,  $MgSO_4$  - 0,15 г, солома перемолотая - 6,0 г, коричневый сок люцерны - 60 мл, водопроводная вода - до 300 мл, pH 5,0. В каждую колбу

забивали по 100 мл питательной среды и после стерилизации (40 мин. при 121 °С) вносили 10 мл суспензии клеток (около 1 миллиона конидий в мл) с одного косяка. Колбы вставляли на качалку с 180–200 об./мин. и проводили культивирование при  $28 \pm 2$  °С в течение 24 часов.

Среды № 16–19 содержали в разных соотношениях (табл. 3) солому, обработанную паром при 145–170 °С в течение 30 мин. и потом механически размельченную, пшеничные отруби и питательную среду. Состав питательной среды:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 21 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,2 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,2 г, коричневый сок люцерны –

Таблица 3

Характеристика способов совместного культивирования  
*Trichoderma viride* LA-531 и *Penicillium lanoso-viride* 8D

Характеристика способов культивирования	№ среды			
	16	17	18	19
Состав среды:				
а) солома (г)	450	375	250	125
б) отруби (г)	50	125	250	375
в) питательная среда (мл)	700	700	700	700
Время засеивания				
<i>P. lanoso-viride</i> 8D	24-й час	18-й час	24-й час	6-й час
Время добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$				
	48-й час	36-й час	24-й час	24-й час
Количество добавленного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (г)	15,0	22,0	22,0	7,5
Время культивирования (сутки)	5	6	4	5

140 мл, водопроводная вода – до 700 мл, pH среды 6,0. Все компоненты перемешивали и подвергали стерилизации паром при 123 °С 1 час. Среду засеивали 300 мл посевного материала культуры *Trichoderma viride* LA-531, и проводили поверхностное культивирование при  $28 \pm 2$  °С.

На 6–24 часу культивирования (табл. 3) к ферментационной массе добавляли посевной материал культуры *P. lanoso-viride* 8D, выращенной на одной чашке Петри. Массу перемешивали и проводили совместное культивирование мицелиальных грибов. На 24–48 часу (от начала процесса) культивирования добавляли 7,5–22,0 г растворенный в воде сульфат аммония. Культивирование продолжали 4–6 суток при влажности 35–65%.

### 3.2. Методы выделения и очистки аденилатдезаминазы

Для получения сырого экстракта фермента четырехсуточную культуру гриба *P. lanoso-viride* 8D, выращенную на плотной питательной среде № 1, дезинтегрировали в шаровой мельнице (Unilab, Нидерланды) в 0,05M KCl-буфере, pH 6,0 (0,05M  $KH_2PO_4$ , оттитрован раствором KOH до pH 6,0). Все этапы выделения и очистки проводили при 0–5 °С. Гомогенат центрифугировали при 40 000 g 60 мин. на центрифуге VAC-60 (ГДР), и супернатант использовали для дальнейшей очистки фермента.

Разрушенный мицелий подвергали дополнительному экстрагированию двойным объемом 0,05M KCl-буфера, pH 6,0, содержащего 0,01% Тритона X-100, в течение 30 мин. на магнитной мешалке. Снова центрифугировали, и полученный супернатант объединяли с предыдущим.

Сырой экстракт обрабатывали добавлением 10% раствора стрептомицинсульфата в 0,05M KФ-буфере, pH 6,0, из расчета 0,1 мл на 1 мл экстракта в течение 1,5 часа при перемешивании на магнитной мешалке и выдерживали в течение 1 часа. Осадок отделяли центрифугированием на ЦФ-1 при 6 000 об./мин. Обработку продолжали, пока соотношение абсорбций УФ-лучей при 230 и 260 нм длинах волны не превышала 2.

Гранулированный активный уголь марки AR-3, промытый 0,05M KФ-буфером, pH 6,0, добавляли в экстракт из расчета 10 г угля на 100 мл экстракта. Раствор перемешивали с помощью магнитной мешалки 20 мин., отстаивали 1 час, центрифугировали при 6000 об./мин., и осадок отбрасывали.

Ступенчатое высаливание белков проводили сухим  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , раздробленным в ступке до получения мелкодисперсного порошка. Количество сульфата аммония вычисляли по таблице З.С.Броновицкой и В.П.Горетова (Броновицкая, Горетов, 1967). Соль постепенно добавляли в экстракт в течение 1,5–2,0 часов, непрерывно перемешивая на магнитной мешалке. Осадок отделяли центрифугированием при 18 000 об./мин. 60 мин. и ресуспендировали в 0,05M KФ-буфере, pH 6,0. Ресуспендированные белковые фракции диализовали против 200 объемов того же буфера в течение 24 часов.

Гельфильтрацию проводили на хроматографической колонке 2,5x110 см, заполненной сефадексом Г-200 (Pharmacia, Швеция) и уравновешенной 0,05M KФ-буфером, pH 6,0. Колонку стабилизировали 24 часа, затем наносили 22 мл экстракта после предыдущего этапа очистки и элюировали тем же буфером со скоростью 15 мл/час. Фракции объемом по 3 мл собирали с помощью коллектора "Ультрорак" (ЛКВ, Швеция). Фракции элюата, имеющие аденилатдеаминазную активность более чем 1,8 ME/мл, объединяли и использовали для следующего этапа очистки.

Хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе (Whatman, DE-52) проводили на колонке 1x24 см, уравновешенной 0,05М КФ-буфером, pH 6,0. На колонку наносили 50 мл фракционируемого раствора и промывали 150 мл того же буфера. Сорбированный белок элюировали с колонки 100 мл линейного градиента NaCl (0,0-0,4М) в 0,05М КФ-буфере, pH 6,0, со скоростью 15 мл/час. Собирали фракции объемом по 2 мл. Фракции, имеющие аденилатдезаминазную активность выше 1,5 МЕ/мл, объединяли и диализовали против 500 объемов 0,05М КФ-буфера, pH 6,0, в течение 24 часов.

За концентрацией белка в процессе хроматографирования следили, измеряя абсорбцию при 280 нм на приборе "Спекорд UV Vis" (ГДР).

Анионообменные смолы ДЭАЭ-целлюлозу и ЭДЭ-10П (Реаким, Олайне) промывали и активировали по известной методике (Кочетов, 1980). В экстракт гриба добавляли 0,5 объема приготовленной смолы, смесь перемешивали на магнитной мешалке 20 мин., дали отстояться 30 мин. и центрифугировали при 6000 об./мин. 15 мин. при использовании ДЭАЭ-целлюлозы и при 1000 об./мин. 10 мин. в случае применения смолы ЭДЭ-10П. Сорбированные белки элюировали обработкой смолы на магнитной мешалке равным объемом 0,05М КФ-буфера, pH 6,0, содержащим 0,8М NaCl, в течение 15 мин., затем смесь центрифугировали.

В работе использовали экспериментальные партии макропористых аминосилохромов и аминосиликагеля, изготовленные на опытном производстве в Олайнском НПО "Биохимреактив" путем химического присоединения аминопропильных групп к определенным фракциям различных типов кремнезема. В экстракт гриба добавляли кремнеземный материал, уравновешенный 0,05М КФ-буфером, pH 6,0 (3 г на 5 мл буфера), смесь перемешивали на магнитной ме-

шалке 20 мин. и центрифугировали при 3000 об./мин. 10 мин. Супернатант отбрасывали, а кремнезем обрабатывали перемешиванием на магнитной мешалке 20 мин. равным объемом КФ-буфера, содержащего 0,8 или 1,0M NaCl. Потом центрифугировали при 3000 об./мин. 10 мин. В случае элюирования сорбированных белков линейным градиентом NaCl сорбцию проводили вышеописанным способом, а сидохромом или силикагелем заполняли хроматографическую колонку (1x24 см) и осуществляли элюцию в 0,0-1,5M градиенте NaCl в 0,05M КФ-буфере, pH 6,0. Использованный аминосидохром помещали на мелкое сито, механически перемешивали под струей крановой воды 15 мин., потом ресуспендировали в двукратном объеме КФ-буфера и повторно применяли для сорбирования белков.

Термоденатурацию белков проводили следующим образом. В 100 мл экстракта гриба добавляли 3 г глицина. Раствор быстро нагревали до 50 °C на кипящей водяной бане и выдерживали 5 мин. при температуре 50-55 °C, непрерывно перемешивая. Потом на льду быстро охлаждали и оставляли 1 час при 0-5 °C. Коагулированный белок отделяли центрифугированием при 6000 об./мин. 30 мин. При термокислотной денатурации в стабилизированный глицином раствор мелкими каплями, перемешивая добавляли 6N HCl до pH 4,8-5,3. После отделения выпавших в осадок белков в супернатанте восстанавливали pH 6,0 добавлением 0,1M КФ-буфера, pH 6,5.

Для фракционирования белков полиэтиленгликолем в экстракт гриба при перемешивании добавляли 60% раствор полиэтиленгликоля до конечной концентрации 30%, оставляли на 3 часа при 0-5 °C, затем центрифугировали при 6000 об./мин. 20 мин. В супернатант добавляли раствор полиэтиленгликоля до конечной

концентрации 45%, оставляли на 3 часа и центрифугировали. Осадок растворяли в минимальном объеме КФ-буфера. Фракционирование проводили полиэтиленгликолями с молекулярными массами 1500 и 3000 (Loba Chemie, Швейцария), а также 2-метилпентандиолом-2,4. Последний добавляли сначала до конечной концентрации 33%, затем - до 60%.

### 3.3. Определение ферментативных активностей, белка и углеводов

Для определения аденилатдеаминазной активности применяли разработанный Х.Митчелом и У.Мак-Элройем (Mitchell, McElroy, 1946) и Х.Калькаром (Kalckar, 1947) спектрофотометрический метод, основанный на разности экстинкций аденозина и инозина (а также АМФ и ИМФ) при длинах волны 240 и 265 нм. С целью повышения точности и уменьшения возможных ошибок, дезаминирование определяли не только по уменьшению абсорбции при 265 нм, как в исходном методе, но высчитывали отношение экстинкций при 265 и 240 нм (рис. 3).

Реакционную смесь объемом 0,4 мл, содержащую 20 мкмоль 0,05М КФ-буфера, рН 6,0, 1 мкмоль субстрата (АМФ) и раствор фермента, инкубировали при  $37 \pm 1$  °С. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл холодной 25%  $\text{HClO}_4$  и выдерживали 10 мин. при 0 °С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 3000 об./мин. 20 мин. К 0,2 мл супернатанта добавляли 5 мл дист. воды и измеряли абсорбцию на приборе "Спекорд UV Vis". За единицу активности (МЕ) принимали такое количество фермента, которое дезаминирует 1 мкмоль АМФ за 1 мин. при  $37 \pm 1$  °С в 0,05М КФ-буфере, рН 6,0.

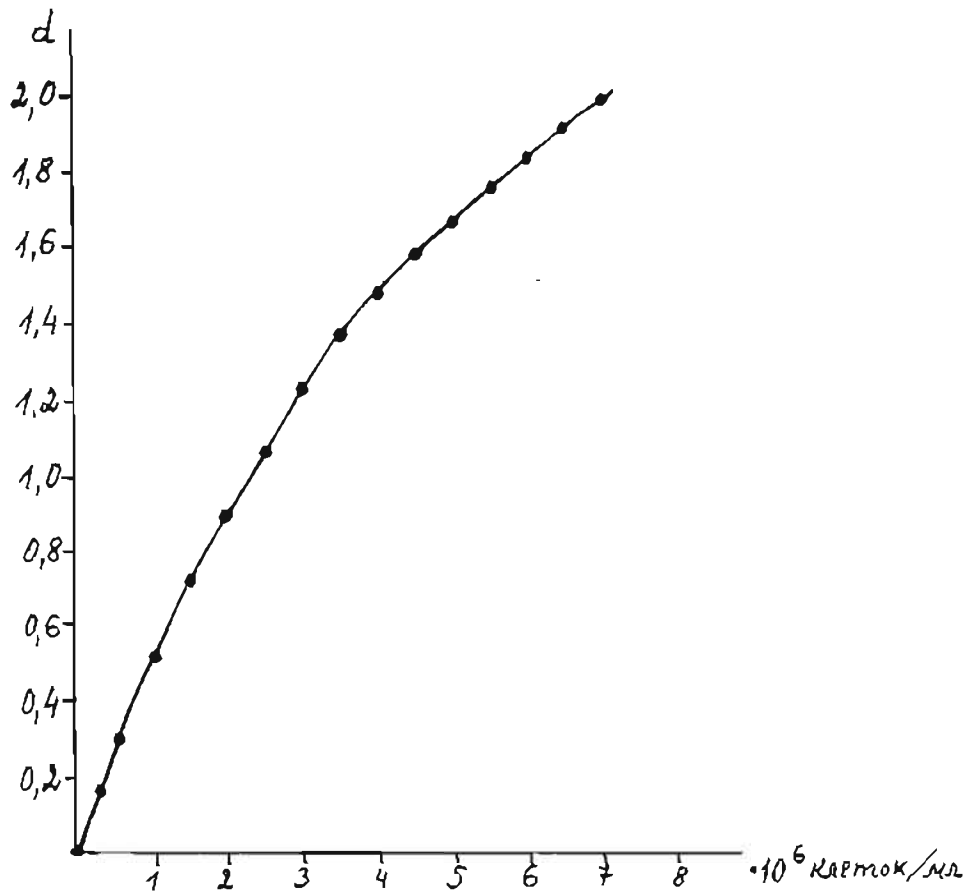


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения количества конидий в мл суспензии

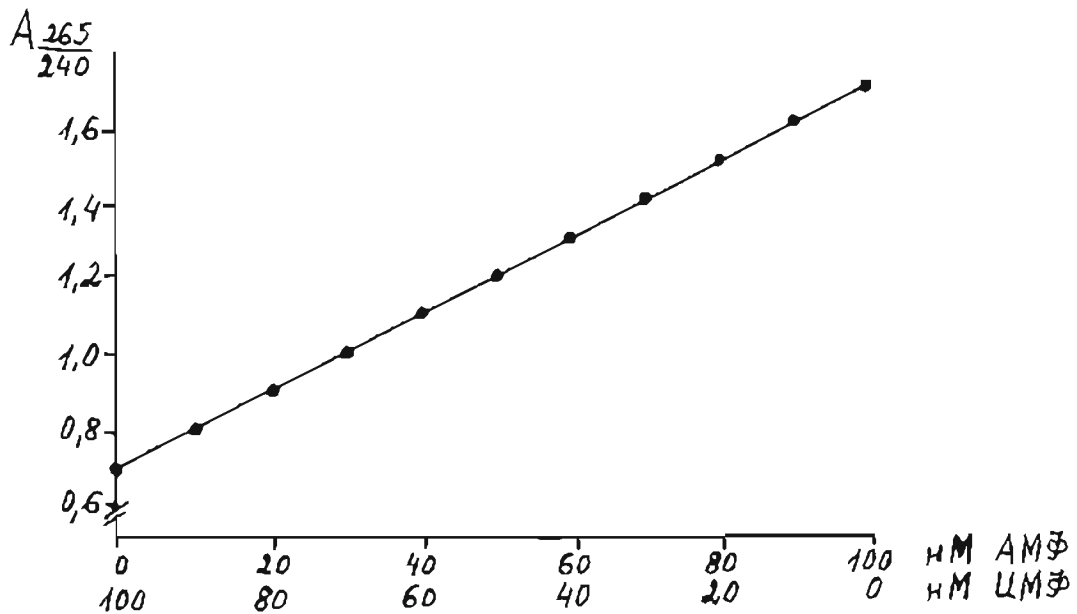


Рис. 3. Калибровочная кривая для определения количества АМФ и ИМФ в их смеси

Фосфоэстеразную активность определяли по модифицированной методике Х.Вайтли и М.Ойши (Whitely, Oisny, 1963). Реакционная смесь в 0,5 мл содержала 2 мкмоль Na-соли паранитрофенилфосфата, 50 мкмоль 0,05M KФ-буфера, pH 6,0, и анализируемый раствор. Инкубацию проводили при  $37 \pm 1$  °C 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,1 N NaOH. О присутствии фосфоэстеразной активности судили по увеличению оптической плотности раствора по сравнению с контролем при длине волны 410 нм.

Рибонуклеазную (РНказную) активность определяли спектрофотометрическим методом (Бенинг, 1964). Реакционная смесь объемом 0,4 мл содержала 0,1 мл суммарной дрожжевой РНК (Новосибирск, СКТВ ВАР), 50 мкмоль 0,05M KФ-буфера, pH 6,0, и анализируемый раствор. Смесь инкубировали при  $37 \pm 1$  °C 60 мин. Реакцию останавливали прибавлением 0,1 мл холодной 25%  $\text{HClO}_4$  при 0 °C. О присутствии РНказной активности судили по увеличению количества кислоторастворимых продуктов (по сравнению с контролем) в надосадочной фракции после центрифугирования, что определяли измерением поглощения супернатанта при 260 нм.

Протеолитическую активность определяли по модифицированному методу Ансона (Лабораторный практикум, 1982), основанному на гидролизе казеината натрия ферментом. Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 20 мг казеината натрия, 50 мкмоль 0,1M KФ-буфера, pH 6,0, и анализируемый раствор. Смесь инкубировали при  $30 \pm 1$  °C 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 0,3M трихлоруксусной кислоты (ТХУ), выдерживали 20 мин., затем центрифугировали при 3000 об./мин. 20 мин. Отбирали 0,5 мл супернатанта, добавляли 2,5 мл 0,5M раствора карбоната натрия, перемешивали и добавляли 0,5 мл в 2 раза разбавленный реактив

Фоллина. Через 20 мин. измеряли оптическую плотность при 656 нм. Затем по калибровочной кривой вычисляли тирозиновый эквивалент, т.е., ту оптическую плотность, которую бы дал 1 мкмоль тирозина. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое за 1 мин. при  $30 \pm 1$  °С превращает в неосаждаемое ТХУ состояние казеинат натрия в количестве, соответствующем 1 мкмоллю тирозина.

Глюкоамилазную активность определяли по содержанию в анализе глюкозы, которая образуется при гидролизе растворенного крахмала ферментом (Лабораторный практикум, 1982). Реакционная смесь объемом 15 мл содержала 0,1 г крахмала, 10 ммоль ацетатного буфера, pH 4,7, и анализируемый раствор. Инкубировали при  $30 \pm 1$  °С 10 мин. Отбирали 1 мл раствора, переносили его в пробирку, помещенную в кипящую водяную баню, инактивировали фермент в течение 2 мин. и затем охлаждали на ледяной бане. Для количественного определения глюкозы в пробирку вносили 1,5 мл рабочего раствора: 0,1% раствор гексациано-(II)-феррата калия плюс равный объем растворенной в 1М КФ-буфере, pH 7,5, глюкозооксидазы 0,6 единиц/мл и 0,02% пероксидазы. Через 45 мин. измеряли абсорбцию при 400 нм. По градуировочной кривой, для построения которой использовали стандартные растворы глюкозы, определяли содержание в анализе глюкозы. За единицу глюкоамилазной активности принимали такое количество фермента, которое, гидролизуя растворенный крахмал при  $30 \pm 1$  °С и pH 4,7, в течение 1 мин. освобождает 1 ммоль глюкозы.

В препаратах аденилатдезаминазы определяли белок по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

В препаратах кормовых добавок определяли белковый азот по методу Барнштейна (Лабораторный практикум, 1982), основан-

ному на денатурировании и осаждении белков из водных растворов с последующим определением выделенного азота по Кьельдалю.

Концентрацию углеводов в ферментных препаратах определяли по методике О.А.Максименко и др. (1975) с применением водного раствора фенола и серной кислоты.

### 3.4. Изучение свойств аденилатдезаминазы

#### 3.4.1. Каталитические свойства

Использованные в работе пуриновые и пиримидиновые соединения указаны в табл. 4.

Применяли 0,1M буферные растворы с различными значениями pH: калий-фосфатный (pH 5,0-8,0), цитратный (pH 3,0-6,5), трис-HCl (pH 7,0-9,0), боратный (pH 7,5-9,2).

Влияние катионов на аденилатдезаминазную активность определяли, добавляя их в реакционную смесь в виде хлоридов до конечной 4mM концентрации.

При определении кинетических констант препарат аденилатдезаминазы инкубировали 1 мин. при  $37 \pm 1$  °C в 0,05M КФ-буфере, pH 6,0, с АМФ или аденозином от 2,5 до 25,0 mM конечной концентрацией.  $K_m$  определяли графическим методом в координатах обратных величин Лайнувера-Берка (Корниш-Боуден, 1979).

Разделение и идентификацию продуктов катаболизма АМФ проводили методом восходящей хроматографии на бумаге Miltrak FN-11 (ГДР) в системах растворителей: изопропанол:  $\text{NH}_4\text{OH}$ :  $\text{H}_2\text{O}$  (14:1:5), этилацетат: ледяная уксусная кислота:  $\text{H}_2\text{O}$  (3:1:1) и УФ-спектрофотометрией.

Таблица 4

Использованные в работе пуриновые и пиримидиновые соединения

Название	Сокращенное обозначение	Фирма-изготовитель	Квалификация
аденин	-	Chemapol	ч
аденозин	-	Reanal	
аденозин-5'-монофосфорная кислота (адениловая кислота)	АМФ	Reanal	ч
аденозин-2',3'-циклофосфорная кислота	2',3'-цАМФ	Reanal	ч
аденозин-5'-дифосфорная кислота	АДФ	Reanal	ч
аденозин-5'-трифосфорная кислота	АТФ	Reanal	ч
дезоксаденозин	-	СКТБ ВАВ (Новосибирск)	-
дезоксаденозин-5'-монофосфорная кислота	дезоксиАМФ	СКТБ ВАВ (Новосибирск)	-
К-соль полиадениловой кислоты	поли А	Reanal	ч
инозин	-	Reanal	ч
инозин-5'-монофосфорная кислота (инозиловая кислота)	ИМФ	Reanal	ч
гипоксантин	-	Reanal	ч
цитозин	-	Реахим	ч
цитидин	-	Реахим	ч
цитидин-5'-монофосфорная кислота (цитидиловая кислота)	ЦМФ	Reanal	ч
урацил	-	Реахим	ч
уридин	-	Reanal	ч
уридин-5'-монофосфорная кислота (уридиловая кислота)	УМФ	Reanal	ч
гуанин	-	Реахим	ч
гуанозин	-	Реахим	ч
гуанозин-5'-монофосфорная кислота (гуаниловая кислота)	ГМФ	Reanal	ч
никотинамидадениндинуклеотид	НАД	Reanal	ч

Продолжение таблицы 4

Название	Сокращенное обозначение	Фирма-изготовитель	Квалификация
никотинамидадениндинуклеотидфосфат	НАДФ	Reanal	ч
восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат	НАДФН	Boehringer Mannheim	ч

### 3.4.2. Определение молекулярной массы

Молекулярную массу фермента определяли, сопоставляя результаты хроматографии препарата аденилатдезаминазы на СL-сефарозе 4В и электрофореза в полиакриламидном геле.

Хроматографию на колонке (1x40 см) с СL-сефарозой 4В (Pharmacia, Швеция) проводили в 0,05 М КФ-буфере, рН 6,0. На колонку наносили 1 мл анализа, элюировали со скоростью 10 мл/час. Собирали фракции объемом по 2 мл. В качестве стандартов использовали следующие белки-маркеры: гемоглобин - 67 000, каталазу редьки - 232 000, ферритин - 440 000, тиреоглобулин - 669 000, которые входят в набор белков-маркеров молекулярной массы фирмы "Био-Рад" (США). Для анализа они использовались в концентрации 1 мг/мл.

Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле (гелевый буфер - трис-НСl, рН 8,9, электродный буфер - трис-глицин, рН 8,3) по известной методике (Маурер, 1971) без использования концентрирующего геля. Анализ наносили в 5% сахарозе, в качестве индикатора добавляли бромфеноловый синий. Проводили вертикальный электрофорез в трубках 0,4x10,0 см на приборе "Реанала" (Венгрия) и на пластинках размером 180x180x3 мм. Гели окрашивали раствором, содержащим 0,02% кумаси бриллиантового синего

R-250 ("Био-Рад", США), 50% изопропанола и 7% ледяной уксусной кислоты (Diezel et al., 1972) или 0,05% раствором кумаси в 10% ТХУ (Остерман, 1981). Приготовление образцов и электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС) проводили по известной методике (Кочетов, 1980). Активность аденилатдезаминазы определяли в разрезанных по 0,5 см и размельченных сегментах геля, добавляя 0,1М КФ-буфер, pH 6,0, и субстрат, по выше описанной методике.

### 3.4.3. Термоинактивация аденилатдезаминазы

Термоинактивацию очищенной аденилатдезаминазы проводили путем нагревания раствора фермента на водяной бане в течение различного времени (до 40 мин.) и при разной температуре (от 37 до 75 °С). Ферментный раствор быстро охлаждали до 37 °С и определяли аденилатдезаминазную активность вышеописанным методом. Контролем служил ферментный раствор, не подвергнутый нагреванию.

Испытывали влияние на термоинактивацию аденилатдезаминазы субстратов аденозина и АМФ (в конечной концентрации 2,5 и 10,0 мМ), а также аденина (2,5 мМ), глицина (3%) и препарата антители с титром 1:64 (1/8 от объема инкубационной смеси). Термообработку проводили при 60 °С 5 мин., затем быстро охлаждали, добавляли 0,01 мл  $2^{14}\text{C}$ -аденозина (0,005 мкКи; Институт радиоизотопов ЧССР) и инкубировали при 37 °С. После остановки реакции добавлением раствора  $\text{HClO}_4$  и выдерживанием при 4 °С 10 мин. раствор осторожно нейтрализовали 5М раствором КОН, центрифугировали и осадок отбрасывали. Супернатант подвергали выпариванию при комнатной температуре, ресуспендировали в минимальном объеме дист. воды, наносили на хроматографическую бума-

гу и разделяли в системе изопропанол:  $\text{NH}_4\text{OH}$ :  $\text{H}_2\text{O}$  (14:1:5). Потом вырезали зоны, соответствующие маркерам - аденозину и инозину, выявленные с помощью ультрамикроскопа, бумагу помещали в сцинтилляционные кюветы, добавляли по 7 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-107 (Харьковский химзавод) и считали радиоактивность на счетчике SI-200 (Intertechnique, Франция). При работе с изотопами были учтены требования к санитарным условиям и технике безопасности, выдвигаемые "Основными санитарными правилами по работе с радиоизотопами ОСП-72/80".

Препарат антител получали иммунизацией кролика сульфатной фракцией белков, осажденной при насыщении сульфата аммония 55-80% и диализованной против 0,9% раствора  $\text{NaCl}$ . Кролику вводили 0,3 мл раствора, содержащего 20 МЕ аденилатдезаминазы (2,3 мг белка), в 4-х повторностях: первые две - через неделю, следующие - через месяц. Первые два раза кроликов иммунизировали с добавлением равного объема неполного адьюванта Фрейнда, состоящего из 1 части ланолина и 2 частей вазелинового масла (Иммунохимический анализ, 1968). Пробы крови брали из краевой вены уха кролика, кровь помещали в центрифужные пробирки, промытые стерильным 5% раствором цитрата натрия. После центрифугирования при 3000 об./мин. 10 мин. отделяли сыворотку. Титр антител определяли с помощью метода двойной радиальной иммунодиффузии (Бем, 1979) в пластинках 1,5% агарового (Difco, США) геля, приготовленного в дист. воде.

#### 3.4.4. Определение места локализации аденилатдезаминазы в мицелии гриба

Место локализации аденилатдезаминазы в мицелии *P. lanosoviride* 8D определяли с применением флуоресцирующего аналога

аденозина - 3'-0- [ 5-(диметиламино)нафтаген-I-сульфонил ]  
 аденозина (дансиладенозина) (Skorka et al., 1981). Использо-  
 вали микроскоп "Люмам-PI". Для возбуждения люминесценции УФ-  
 лучами применяли светофильтр УФС6, в качестве "запирающих"  
 светофильтров использовали ЖСЗ+БС8.

Отделение конидий от культуры *P. lanoso-viride* 8D, вы-  
 ращенной на косяках сусло-агара, проводили, добавляя в косяки  
 по 3 мл 0,05М КФ-буфера, содержащего 0,001% Твина-20, и осто-  
 рожно встряхивая. Суспензию конидий центрифугировали при  
 6000 об./мин. 20 мин., осаденные конидии ресуспендировали и  
 промывали 4 раза тем же буфером.

Суспензии конидий дезинтегрировали ультразвуком с помощью  
 аппарата УЗДН-1, обрабатывая по 10 мл суспензии 7-кратно по  
 2 мин. в режиме 22 кГц, 0,5 А.

### 3.5. Изучение биологической активности аденилатдезаминазы

Для изучения биологической активности использовали очи-  
 щенный препарат аденилатдезаминазы с удельной активностью  
 20,5 МЕ/мг белка.

#### 3.5.1. Культуры клеток крови

Опыты проводили с кровью практически здоровых людей, а  
 также с кровью больных почечной недостаточностью, которым вво-  
 дили иммунодепрессанты, с кровью животных - гнотобиологических  
 морских свинок двухнедельного возраста, полученных в гнотобио-  
 логической лаборатории биологического факультета ЛГУ им.П.Стуч-  
 ки, и с клетками селезенки мышей 2-х месячного возраста. Для

определения гемагглютинирующей активности использовали кровь кролика.

В опытах по стимуляции лимфоцитов брали свежую гепаринизированную кровь в пробирку, стенки которой смочены гепарином (1 мг/мл), взятым из расчета 0,1 мл на 1,0 мл крови. Кровь выдерживали в течение 1–2 часов при  $37 \pm 1$  °С для осаждения эритроцитов. Супернатант отсасывали и центрифугировали 10 мин. при 2000 об./мин. Клетки суспендировали в 0,83% растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$  для лизиса оставшихся эритроцитов (Yadomae et al., 1979). Снова центрифугировали, клетки ресуспендировали в среде Игла и 2-кратно промывали этой же средой. Полученную сыворотку выдерживали 1 час при 56 °С. Готовили инкубационную среду – в среде Игла, содержащую 20% сыворотки крови, добавляли бензилпенициллин 100 мкг/мл, сульфат стрептомицина 100 мкг/мл и глутамин до 2 мМ конечной концентрации (Waithe, Hirschhorn, 1973). Инкубационная смесь содержала 0,8 мл инкубационной среды и 0,2 мл суспензии, содержащей  $2 \cdot 10^5$  клеток. Добавляли раствор ФГА ("Реахим", марка "ч") до конечной концентрации 15 или 30 мкг/мл или раствор препарата аденилатдезаминазы, содержащий в различных опытах 1,0–3,0 МЕ активности, или аденозин до 0,1 мМ конечной концентрации. Все растворы были предварительно отдиализованы против среды Игла. Инкубировали в пробирках, закрытых резиновыми пробками, 48 часов при 37 °С, потом добавляли 0,02 мл  $^3\text{H}$ -тимидина (0,2 мкКи; 10 мКи/мМ) и инкубацию продолжали ещё 20 часов.

Суспензию фильтровали через мембранные фильтры (Smemarol) с диаметром пор 0,4 мкм с помощью вакуумного насоса. Фильтры промывали 3 мл дист. воды и 5 мл 5% ТХУ, помещали в сцинтилляционные кюветы и измеряли радиоактивность по вышеописанной методике.

Морфологический учет бласттрансформации проводили в окрашенных смеси азур с эозином препаратов 48- и 72-часовых культур лейкоцитов без добавления тимидина (Голубева, 1977). Подсчитывали количество малых (диаметр 4,5–6,5 мкм), средних (6,5–10 мкм) и больших (10–18 мкм) лимфоцитов на 300 лимфоидных клеток.

Гемагглютинирующую активность аденилатдезаминазы определяли по описанной методике (Карманский, 1977), используя 2% суспензию (по объему) эритроцитов кролика в 0,15 М растворе NaCl и добавляя к ней равный объем ферментного препарата в 0,15 М NaCl различной кратностью разведения. Пробы инкубировали 1 час при  $37 \pm 1$  °С, после этого визуально оценивали титр агглютинации, т.е., наименьшую концентрацию аденилатдезаминазы, вызывающую склеивание эритроцитов.

### 3.5.2. Асцитные опухоли мышей

В опытах *in vitro* использовали клетки, полученные из мышей с асцитным лимфолейкозом L 5178Y, L 1210, P 388 и асцитом Эрлиха. Асциты перевивали на самцов весом  $20 \pm 2$  г, вводя внутривентриально по 0,2 мл асцитной жидкости в среде Игла, содержащей  $1 \cdot 10^6$  клеток. Карциному Эрлиха перевивали на беспородных белых мышей, а лимфолейкозы – на гибридных мышей VDF-1. Экспериментальных мышей забивали на 7-й день цервикальной дислокацией спинного мозга. После этого разрезали кожу живота и брюшину и собирали асцитную жидкость в центрифужные пробирки с 30 мл холодной среды Игла (рН 7,3), центрифугировали при 600 об./мин. 10 мин. и асцитные клетки отмывали от эритроцитов двукратным центрифугированием, меняя среду Игла. Потом сливали среду и взвешивали клетки. Из полученного материала готовили

10% суспензию клеток в среде Игла. Инкубационная смесь содержала 0,1 мл раствора ферментного препарата, 0,7 мл среды Игла, 1 мл 10% суспензии клеток и 0,2 мл раствора  $2^{14}\text{C}$ -урацила (0,08 мкКи, 40 мкКи/мл). Инкубировали при  $37 \pm 1$  °C в течение 1 часа.

Злокачественные клетки разрушали и макромолекулы осаждали добавлением 2 мл холодной 10% ТХУ. Содержимое пробирок фильтровали через микропористые мембранные фильтры (Сhemarol) с диаметром пор 0,4 мкм при помощи вакуумного насоса. Фильтры двукратно отмывали от неключившихся радиоактивных предшественников клеток 5 мл холодной 5% ТХУ, затем промывали 5 мл толуола и сушили при комнатной температуре. Радиоактивность полученных образцов измеряли по вышеописанной методике.

Опыты *in vivo* проводили с самцами мышей ВDP-1, которым переливали лимфолейкоз L 5178Y. После прививки асцитных клеток 3 группам мышей по 5 раз (на 3-й и 7-й день) вводили очищенный препарат аденилатдезаминазы - по 50, 100 и 200 ME на кг массы животных, а 4-й группе - 1 раз (на 3-й день) 300 ME/кг. Трём параллельным группам животных вводили препарат L-аспарагиназы (Рижский завод медпрепаратов ИОС АН УССР) в таких же дозах, кроме дозы 300 ME/кг. В каждую группу входило 6 мышей. Контрольной группе, состоявшей из 10 мышей, вводили физиологический раствор. О действии введенных препаратов судили по времени жизни опухолевых мышей, сравнивая его с контролем.

Проводили математическую обработку результатов с применением критерия Стьюдента и дисперсионного анализа (Цера, 1974).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 4. Влияние условий культивирования  
на продуцирование аденилатдезаминазы  
культурой *P. lanoso-viride* 8D

Известно, что проявление аденилатдезаминазной активности у *P. lanoso-viride* 8 связано со способностью гриба образовывать конидии (Муйжниекс, 1980). Такая же закономерность образования аденилатдезаминазной активности характерна и для штамма 8D - производного *P. lanoso viride* 8 [А.с. 782392 (СССР)].

Штамм *P. lanoso-viride* 8D при росте на плотной питательной среде в своем развитии проходит следующие стадии: прорастание конидий (рис. 4), рост гиф (рис. 5), начало конидиеобразования (рис. 6), обильное конидионошение (рис. 7). Накопление аденилатдезаминазной активности параллельно конидиеобразованию подтверждается в опытах по ее определению в разных зонах колонии *P. lanoso-viride* 8D, диаметром 4,5 см, выращенной на среде № 7 на целлофановой пленке (табл. 5), а также в биомассе

Таблица 5

Аденилатдезаминазная активность в разных зонах  
колонии *P. lanoso-viride* 8D

Зоны колонии	Сырая биомасса (мг)	Аденилатдезаминазная активность (МЕ на г сырой биомассы)
наружная белая конидиеобразующая	12	0,0
конидиеносящая	28	1,2
середина колонии	35	2,0
	33	2,4



Рис. 4. Прорастающая конидия *P. lanoso-viride* 8D



Рис. 5. Гифы *P. lanoso-viride* 8D



Рис. 6. Конидиообразование *P. lanoso-viride* 8D

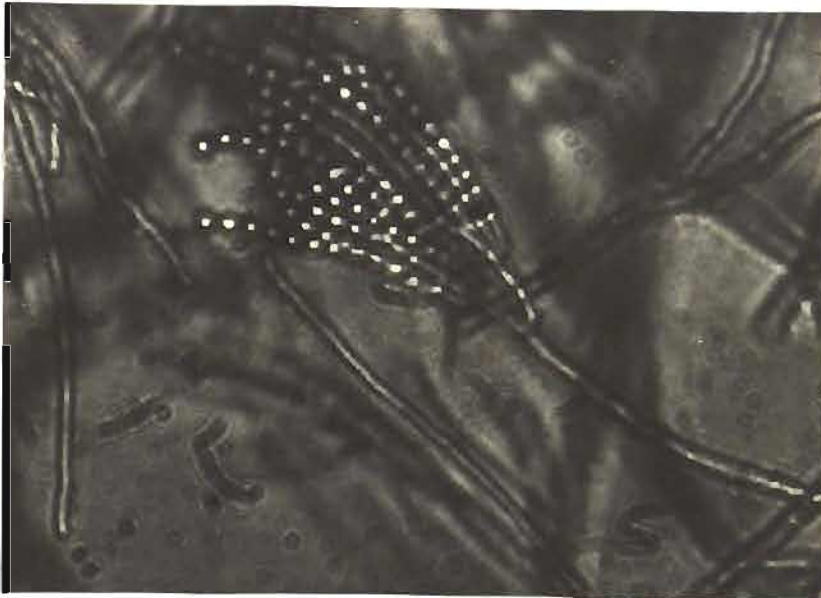


Рис. 7. Конидиеносец с конидиями *P. lanoso-viride* 8D

гриба, культивированного на плотных питательных средах разного состава (табл. 6). В наружной зоне колонии, состоящей только из растущих гиф, аденилатдезаминазная активность не была обнаружена, она появилась в конидиеобразующей зоне и повышалась по мере усиления образования и созревания конидий. При росте на плотных питательных средах разного состава (табл. 6) аденилатдезаминазная активность колеблется от 0,3 до 104,0 ME на чашку Петри. Наименьшая активность обнаруживается в культуре, состоящей только из клеток гиф (среда № 9), а наибольшая - в культуре, которой свойственно обильное конидиеносение, например, при росте на средах, содержащих отруби пшеницы (среды № 1 и 2).

Таблица 6

Аденилатдезаминазная активность при культивировании  
*P. lanoso-viride* 8D на плотных питательных средах  
разного состава

№ среды	Аденилатдезаминазная активность (ME на чашку Петри)	Морфологические особенности развития культуры
1	100	Обильное конидиеносение
2	104	Обильное конидиеносение
3	1,8	Образует конидии и коремии
4	1,2	Образует конидии
8	1,2	Образует конидии
9	0,3	Только гифы
10	5,6	Образует конидии и коремии
11	6,8	Образует конидии
12	2,0	Образует конидии

Поскольку очищенная аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D, как показано в 6-й главе, дезаминирует как АМФ, так и аденозин, то были предприняты попытки выявить местонахождение аденилатдезаминазы в мицелии гриба с помощью флуоресцирующего аналога аденозина - дансиладенозина. Результаты показали, что изменение света флуоресценции дансиладенозина, что происходит при его связывании с дезаминазой (Skorba et al., 1981), происходит в гифах, но только начиная с середины фазы экспоненциального роста культуры, что примерно соответствует началу конидиеобразования. С возрастом гиф, примерно до середины стационарной фазы роста, интенсивность флуоресценции в них связанного с ферментом дансил-аденозина увеличивается. В молодых гифах и в конидиях активность аденилатдезаминазы этим методом не была обнаружена. Результаты аналогичных опытов об изучении местонахождения в мицелии грибов дезаминаз производных аденина в литературе нами не были найдены.

Хотя в конидиях не было обнаружено изменение света флуоресценции дансиладенозина, опыты с отделенными от гиф конидиями показали, что значительная активность аденилатдезаминазы всё-таки присутствует в конидиях (рис. 8). Здесь надо учесть и то, что у *P. lanoso-viride* 8D в течение недели продолжается процесс конидиеобразования, поэтому полученные данные отражают средние величины аденилатдезаминазной активности, а в отдельных конидиях она может быть как выше, так и ниже определенных нами средних значений. С возрастом конидий активность фермента

ME /  $1 \cdot 10^8$  конидий

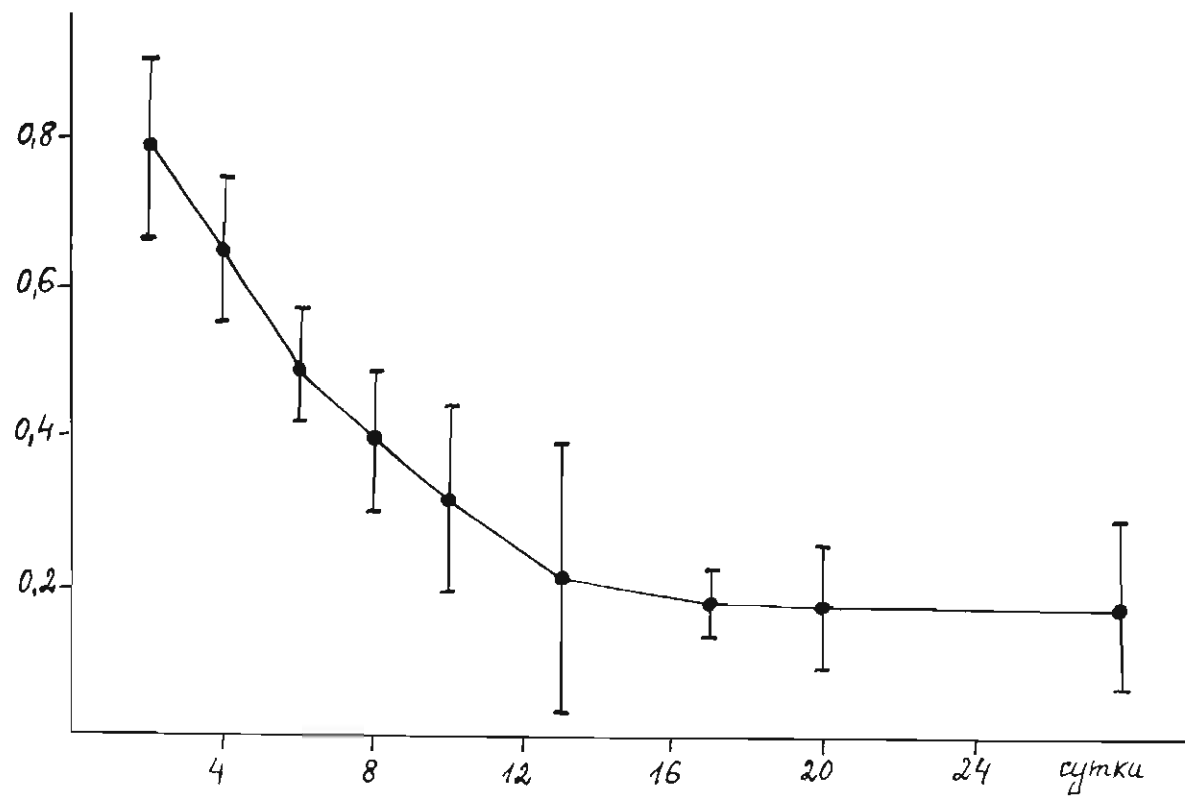


Рис. 8. Аденилатдезаминазная активность в конидиях разного возраста *P. lanoso-viride* 8D

в них понижается, но сохраняет определенный уровень - 0,15-0,20 ME на  $1 \cdot 10^8$  конидий. Аденилатдезаминазная активность одинакова как при ее измерении в интактных, так и в разрушенных ультразвуком конидиях. Применение дансиладенозина не дало возможность обнаружить активность в конидиях, возможно, потому, что там ее уровень относительно **низкий**, или из-за препятствий, обусловленных наличием у конидий плотных оболочек. У бактерий аденозиндезаминаза также обнаруживается как в вегетативных клетках, так и в спорах, но в спорах ее активность в 4-5 раз выше (Лория и др., 1976).

Эти опыты показали связь аденилатдезаминазной активности с дифференциацией её продуцента *P. lanoso-viride* 8D. Кроме того, нами были проведены опыты по определению влияния присутствия в питательной среде субстрата аденилатдезаминазы - АМФ - и других пуриновых и пиримидиновых соединений на проявление и уровень дезаминазной активности *P. lanoso-viride* 8D.

Как отмечалось выше, штамм *P. lanoso-viride* 8D был отобран на элективной плотной питательной среде, содержащей АМФ в качестве единственного источника азотного питания, по накоплению в среде культивирования ИМФ. Оказалось, что качественный состав продуктов катаболизма АМФ при росте *P. lanoso-viride* 8D на плотной и жидкой питательной средах значительно отличается (табл. 7). Видно, что деаминарование АМФ происходит сравнительно рано при выращивании гриба на плотных средах и зависит также от состава среды. При культивировании *P. lanoso-viride* 8D на жидких питательных средах аденилатдезаминазная активность проявляется раньше по времени в условиях, в которых культура использует АМФ в качестве единственного источника азотного питания.

Таблица 7

Продукты катаболизма АМФ культурой *P. lanoso-viride* 8D

№ среды	АМФ и продукты её катаболизма в среде культивирования	
	инкубация 24 часа	инкубация 96 часов
плотные: 4+АМФ	ИМФ	-
5+АМФ	ИМФ	аденозин, ИМФ
6+АМФ	ИМФ	-
жидкие: 4+АМФ	АМФ	аденозин, инозин
5+АМФ	АМФ, инозин	ИМФ, инозин, гипоксантин
6+АМФ	АМФ	аденозин, инозин, гипоксантин

Количественное определение аденилатдезаминазной активности было проведено в биомассе гриба, выращенного в погруженной культуре с добавлением некоторых пуриновых соединений в качестве единственных источников азотного питания (среда № 5) и в качестве дополнительных источников питания (табл. 8) - среда № 4.

Таблица 8

Аденилатдезаминазная активность в погруженной культуре *P. lanoso-viride* 8D при добавлении экзогенных пуриновых соединений в различных условиях питания

Субстраты	Среда № 4			Среда № 5		
	сырая био-масса (мг)	аденилатдезаминазная активность		сырая био-масса (мг)	аденилатдезаминазная активность	
		МЕ на г биомассы	в %*		МЕ на г биомассы	в %*
АМФ	240	0,11	110	300	0,08	80
аденозин	280	0,07	70	270	0,11	110
аденин	170	0,26	260	215	0,12	120
инозин	365	0,06	60	180	0,17	170
гипоксантин	420	0,05	50	60	0,73	730
контроль	220	0,10	100	7	2,22	2220

\* За 100% принята активность в МЕ на г сырой биомассы в среде № 4 (без добавления пуриновых соединений - контроль).

Аденилатдезаминазная активность определялась в культуре 3-суточного возраста. Результаты аналогичных опытов с добавлением пуриновых и пиримидиновых соединений к плотной среде № I обобщены в табл. 9.

Таблица 9

Аденилатдезаминазная активность при культивировании *P. lanoso-viride* 8D на плотной среде с добавлением пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве дополнительных источников питания

Субстраты	Сырая биомасса на чашку Петри (г)	Аденилатдезаминазная активность	
		МЕ на г сырой биомассы	в %*
контроль	6,5	25,2	100
УМФ	7,5	18,7	74
урацил	6,9	19,7	76
цитидин	7,0	20,0	79
аденозин	6,6	22,3	85
ЦМФ	6,7	24,5	97
гуанин	6,5	25,2	100
аденин	6,0	27,3	108
уридин	6,0	27,3	108
ГМФ	5,9	27,8	110
АМФ	6,5	28,3	112
ИМФ	6,2	28,3	112
цитозин	5,5	29,8	118
инозин	5,5	29,8	118
гуанозин	5,6	32,9	131
гипоксантин	5,4	34,1	135

\* См. примечание к табл. 8.

Данные таблиц 8 и 9 показывают, что пуриновые и пиримидиновые соединения в различной степени влияют на уровень аденилатдезаминазной активности в зависимости от условий культивирования. Активность варьирует на плотной среде в пределах 19–34 ME на г сырой биомассы (большой частью около 26 ME), на жидкой полной питательной среде (среда № 4) – 0,05–0,26 ME (большой частью около 0,10), а на жидкой среде с пуриновыми соединениями в качестве единственных источников азотного питания (среда № 5) – 0,08–0,73 ME на г биомассы. Голодание, вызванное недостатком доступных источников азотного питания в жидкой среде, коррелирует с повышенным уровнем аденилатдезаминазной активности. В несколько другом аспекте данные табл. 9 представлены на рис. 9. Наблюдается негативная корреляция между биомассой и аденилатдезаминазной активностью, т.е., можно предположить, что пониженная скорость роста сопровождается повышенным удельным весом дезаминазной активности в биомассе. Аналогичную зависимость, только в другом масштабе, можно наблюдать из данных, приведенных в табл. 8.

Как известно, недостаток источников питания, особенно азота, приводит к образованию конидий у грибов (Билай, 1874). Так как аденилатдезаминазная активность *P. lanoso-viride* BD каким-то образом связана с конидиеобразованием, то, по-видимому, её повышение в медленно растущих культурах можно объяснить их склонностью к дифференциации. Более глубоко это явление можно рассматривать, исходя из литературных данных по энергетическому заряду и содержанию неорганического фосфата в период спорогенеза у микроорганизмов (Астапович, 1979). Существует точка зрения, согласно которой скорость роста определяется уровнем адениловых нуклеотидов. А перед споруляцией, как пра-

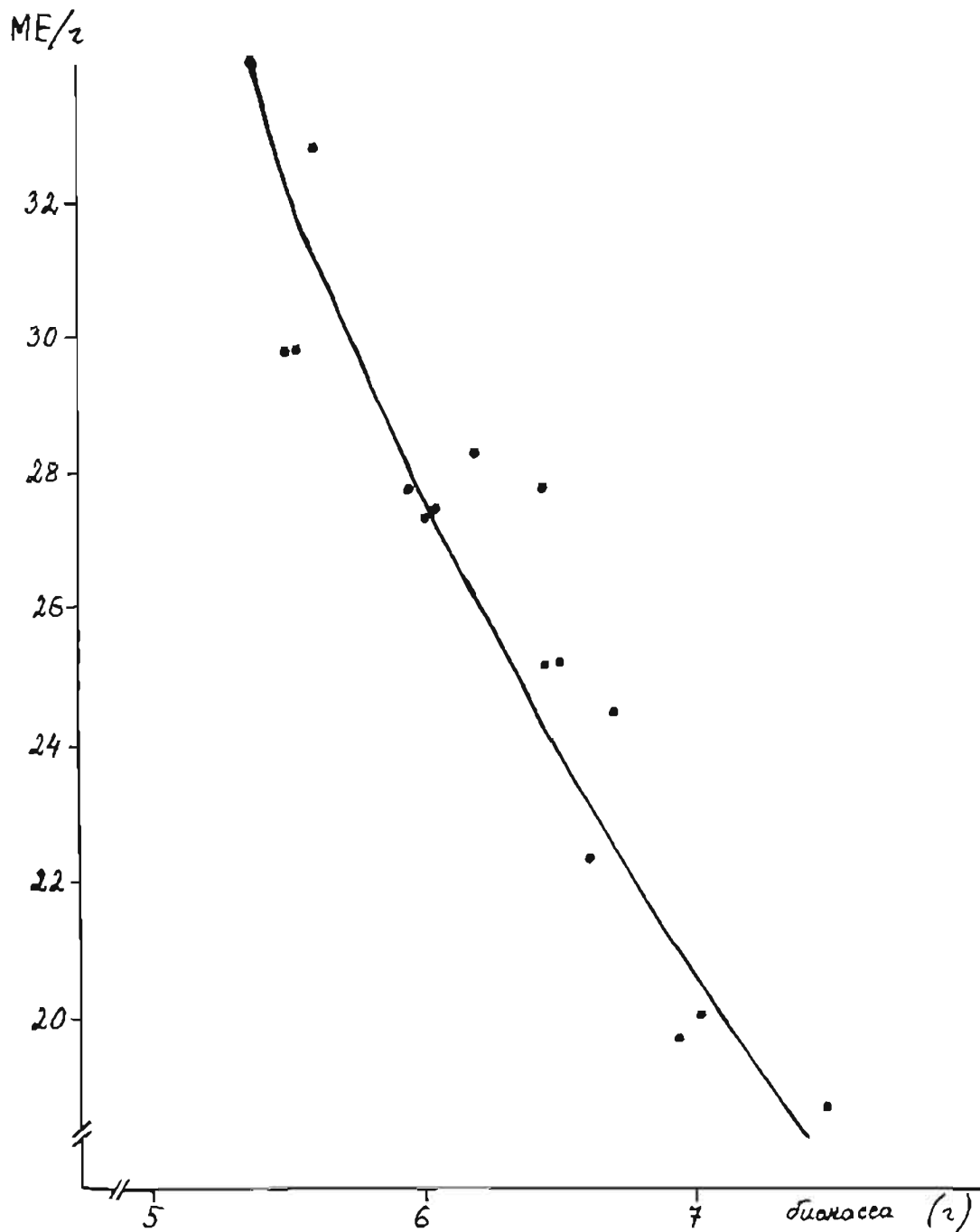


Рис. 9. Зависимость аденилатдезаминазной активности от биомассы при культивировании *P. lanoso-viride* 8D на плотной питательной среде с добавлением различных пуриновых и пиримидиновых соединений

вило, происходит снижение концентрации нуклеиновых кислот, энергетического заряда и АМФ, в этот период снижается также и уровень неорганического фосфата (Smith, Valenzuela-Perez, 1971; Hutchison, Hanson, 1974). Эти компоненты являются регуляторами метаболизма АМФ, который изучен на примере опухолевых клеток животных (Lomax et al., 1975; Zauer, 1978) и в котором участвуют дезаминазы производных аденина (Chapman, Atkinson, 1973; Chapman et al., 1976). Может быть, аденилатдезаминазы микроскопических грибов, отличаясь от дезаминаз высших организмов более низкой субстратной специфичностью, всё-же выполняют сходные функции, связанные с балансированием содержания адениловых соединений.

## Глава 5. Выделение и очистка аденилатдезаминазы

### *P. lanoso-viride* 8D

Нами разработаны 4 схемы очистки аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, рекомендованные и для внедрения в производство.

Во всех способах очистки (кроме ускоренного варианта с применением ДЭА-целлюлозы и смолы ЭДЭ-ЮП) использовали сырой экстракт фермента, полученный после механического дезинтегрирования выращенного на питательной среде № I мицелия культуры *P. lanoso-viride* 8D и отделения центрифугированием остатков клеток.

### 5.1. Очистка с применением гельфильтрации и хроматографии на анионообменных смолах

Процесс очистки включает в себя 6 этапов (табл. 10). Исходный экстракт биомассы гриба сначала обрабатывали стрептомицисульфатом и активированным углем. Эти этапы очистки дали невысокую степень очистки фермента, однако они были сохранены, так как высаливание сульфатом стрептомицина освобождает экстракт от основного количества нуклеиновых кислот, а активированный уголь позволяет не только избавиться от постороннего белка на самых первых стадиях очистки, но и увеличивает активность аденилатдезаминазы, а также адсорбирует значительную часть пигментов. Высаливание сульфатом аммония является наиболее эффективным из первых четырех этапов, однако именно здесь происходит основная потеря белка, обладающего аденилатдезаминазной активностью.

Дальнейшая очистка фермента гельфильтрацией и ионообменной хроматографией позволяет получить аденилатдезаминазу с высокой степенью очистки. На рис. 10 представлена кривая выхода общего белка с элюирующим раствором при гельфильтрации и распределение аденилатдезаминазной активности в фракциях элюата. Максимум активности совпадает с началом выхода общего белка, что дает основание думать о высокой молекулярной массе фермента. Пик аденилатдезаминазной активности после гельфильтрации симметричный, свидетельствующий об отсутствии ферментов со значительными различиями в молекулярной массе.

Аденилатдезаминаза сорбируется на ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,05М КФ-буфером, pH 6,0, и элюируется со смолы в виде одного пика тем же буфером, содержащим 0,15-0,30М NaCl (рис. 11).

Таблица 10

Очистка аденилатдезаминазы *P. lanoso-viridis* 8D

№ п. п.	Этап очистки	общая актив-ность (МЕ)	общий белок (мг)	удельная актив-ность (МЕ на мг белка)	выход актив-ности (%)	степень очистки	удельная актив-ность (МЕ на мг углеводов)	выход угле-водов (%)	% содержание углеводов в общей массе белков и углеводов
1.	Экстракт	2156,1	3591,0	0,6	100	1,0	35	100	17
2.	Обработка стрептомицин-сульфатом	2092,2	2789,2	0,7	97	1,2	-	-	-
3.	Обработка активированным углем	2316,2	2128,4	1,1	107	1,8	-	-	-
4.	Осаждение сульфатом аммония 0,55-0,80 насыщения	1403,1	170,8	8,6	68	14,4	262	9	3
5.	Хроматография на сефадексе Г-200	948,7	22,4	40,7	44	67,9	169	9	22
6.	Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	452,8	0,9	790,3	21	1317,2	-	-	-

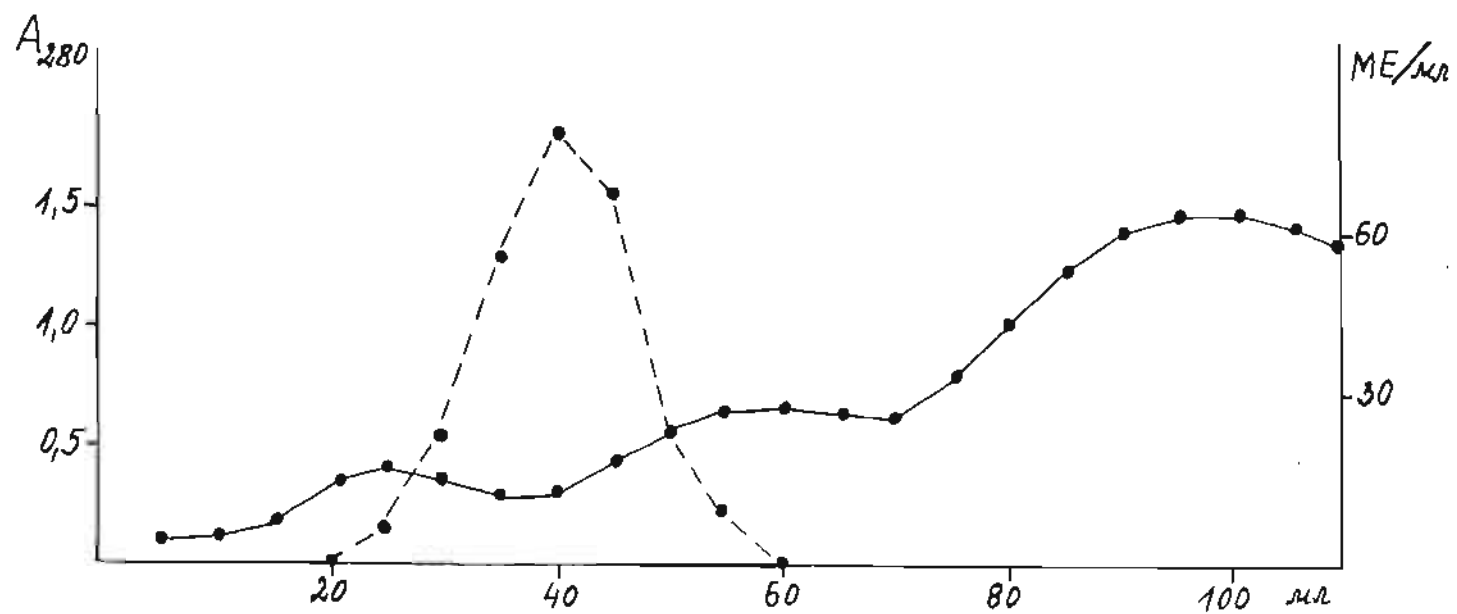


Рис. 10. Разделение аденилатдеаминазы гельфильтрацией через колонку с сефадексом Г-200

— белок,  $A_{280}$

- - - аденилатдеаминаза, ME/мл

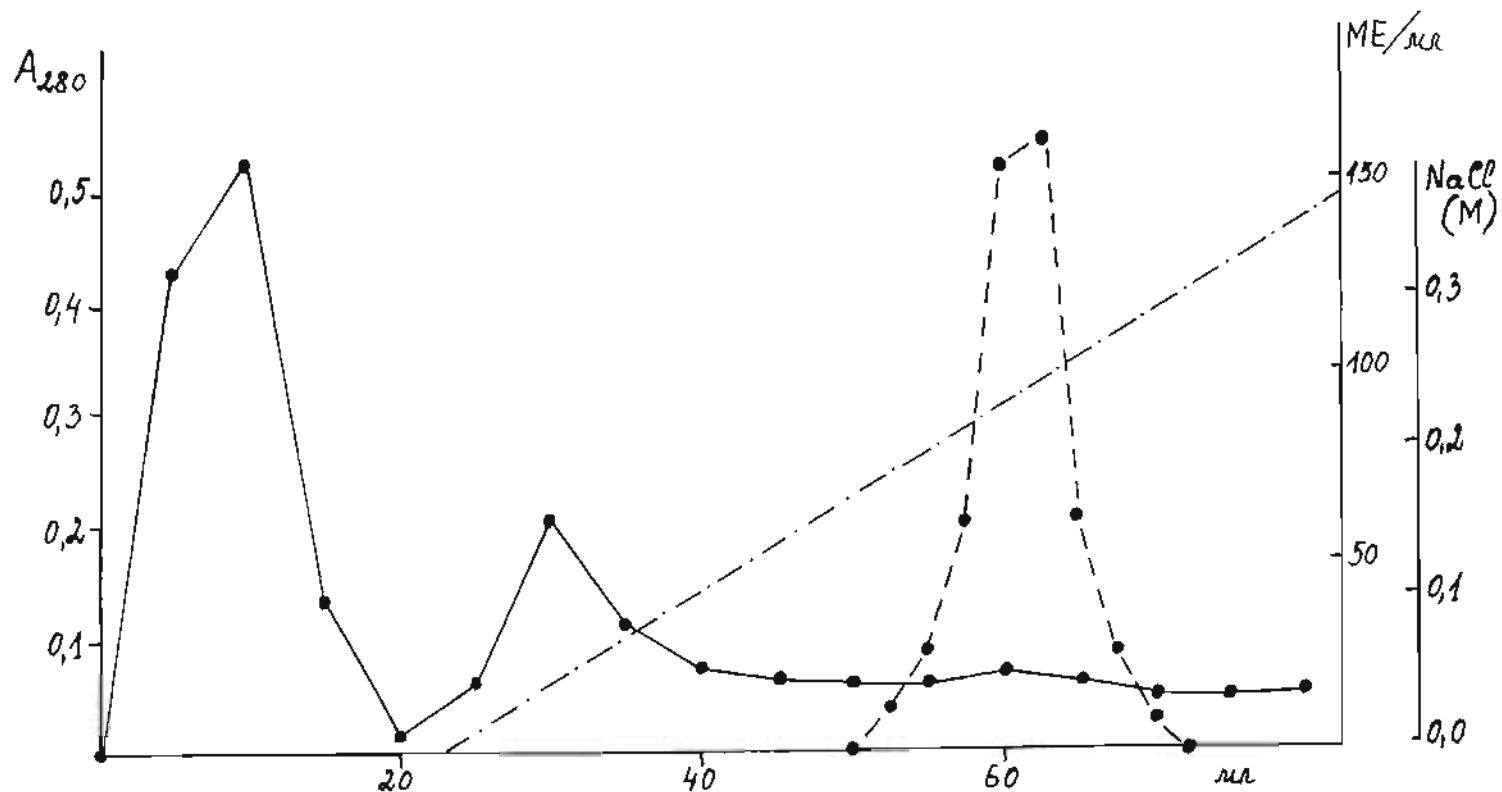


Рис. II. Хроматографическое разделение аденилатдеаминазы на ДЭАЭ-целлюлозе

- белок,  $A_{280}$
- - - аденилатдеаминаза, ME/мл
- · - · NaCl

В результате 6-этапной очистки получали препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, удельная активность которого в I3I7 раз превышала таковую в грубом экстракте, а выход активности составлял 2I%. Очищенный препарат не содержал РНКазной и фосфоэстеразной активности.

Для быстрого получения частично очищенного препарата аденилатдезаминазы из *P. lanoso-viride* 8D разработали экспресс-метод выделения. По этому методу фермент выделяли из суспензии клеток гриба без центрифугирования и обработки стрептомицисульфатом. Непосредственно к суспензии мицелия добавляли активированный уголь и обрабатывали как по 3-му этапу вышеописанного выделения, только после этого смесь центрифугировали, и в полученный экстракт добавляли смолы ДЭАЭ-целлюлозу или ЭДЭ-ЮП. На эти смолы сорбируется около 90% аденилатдезаминазной активности, находящейся в экстракте мицелия, и фермент десорбируется буфером, содержащим 0,8M NaCl. Аденилатдезаминаза очищается в I4 и I9 раз по сравнению с обработанным углем экстрактом мицелия в случаях использования соответственно ДЭАЭ-целлюлозы и смолы ЭДЭ-ЮП (табл. II). Фермент в адсорбированном на

Таблица II

Частичная очистка аденилатдезаминазы  
*P. lanoso-viride* 8D ускоренным способом

Этап очистки	общая активность (МЕ)	общий белок (мг)	удельная активность (МЕ/мг белка)	выход активности (%)	степень очистки
Экстракт, обработанный углем	450	500	0,9	100	I
Хроматография на анионообменной смоле:					
а) ДЭАЭ-целлюлозе;	420	35	12,0	93	I4
б) ЭДЭ-ЮП	405	22	18,4	90	I9

смоле виде сохраняет активность и может быть использован для получения инозиловых нуклеотидов и инозина путем дезаминирования адениловых соединений.

## 5.2. Очистка хроматографией на анионообменных материалах на основе кремнезема

Очистка аденилатдезаминазы из экстракта гриба с применением анионообменных материалов на основе макропористого кремнезема позволяет быстро получать в 25–83 раза очищенный ферментный препарат (табл. 12). Материалы на основе кремнезема имеют ряд преимуществ по сравнению с анионообменными смолами, которые являются продуктами полимеризации органических молекул, содержащих катионные группы. В кремнеземных материалах эти группы (в случае аминсилохрома – аминопропильные) пришиты к неорганическому носителю. Это делает их более устойчивыми, чем смолы по отношению к различным факторам химической, механической, термической и биологической природы. Кремнеземные анионообменники легче и быстрее приготовить к работе, регенерировать в циклических процессах, они быстрее оседают при центрифугировании, что необходимо для получения фермента в процессах, проводимых в объеме. При колоночной хроматографии на этих носителях можно использовать большие скорости и давления, чем для смол. Поэтому хроматографические материалы на основе макропористого кремнезема являются технологически более выгодными для применения в промышленности. Нами отработан режим обработки сырого экстракта грибных клеток аминсилохромами и аминсилликагелем, в котором можно достичь сравнительно высокой очистки фермента одноэтапным, быстрым процессом. Результаты, полученные с использованием различных типов носителей, даны в табл. 12.

Таблица 12

Очистка аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D на анионообменных материалах  
на основе макропористого кремнезема

№ п. п.	Тип анионообменника	Характеристика анионообменника			Характеристика очистки			
		диаметр пор (А)	удельная поверхность (м <sup>2</sup> /г)	концентрация активных групп / $\text{mm}^2$ / (ммоль/г)	степень очистки		выход активности (%) <sup>*</sup>	
					в объеме	на колонке	в объеме	на колонке
1.	Аминосилохром	250	120	0,39	25-30	76-83	70	85-90
2.	- " -	350	80	0,21	11-15	25-32	70	85-95
3.	- " -	350	80	0,39	13-19	37-42	75	95
4.	- " -	250	120	0,45	22-26	57-60	70	85-90
5.	- " -	250	120	0,58	18-23	42-45	65	80
6.	Аминосиликагель	250	250	0,70	12-16	25-30	65	75

\* Выход активности рассчитывался в % от общей активности фермента в необработанном экстракте.

Наиболее высокая очистка аденилатдезаминазы получалась при использовании носителя с удельной поверхностью  $120 \text{ м}^2/\text{г}$ , диаметром пор 250 ангстрем, концентрацией  $-\text{NH}_2$  групп  $0,39 \text{ ммоль}/\text{г}$ . Различная эффективность очистки при использовании аминосилохромов с одинаковой концентрацией активных групп, но разным диаметром пор (№ 1 и 3 в табл. 12) свидетельствует о комбинированном эффекте ионного обмена и молекулярного сита, что повышает степень очистки.

### 5.3. Очистка с применением термо- и термокислотной денатурации и фракционирования полиолами

В качестве агентов, приводящих к денатурации белков, испытывали термическое воздействие в присутствии 3% глицина как стабилизатора при pH 6,0 и 4,8–5,3. Применяли также и обратимую денатурацию определенных фракций белка экстракта ступенчатым добавлением двух видов полиэтиленгликоля – с молекулярными массами 1500 и 3000, а также 2-метилпентандиоля–2,4. Результаты этих опытов показаны в табл. 13.

Термокислотная обработка грубых экстрактов *P. lanosoviride* 8D очень полезна на первом этапе очистки, так как при этом удаляется до 50% балластных белков, в том числе и белки из среды, попадающие в экстракт при сборе биомассы гриба с поверхности питательной среды.

После термокислотной обработки выгодно концентрировать фермент. Это достигается обратимой денатурацией аденилатдезаминазы в присутствии диола или полиолов. После центрифугирования белковый осадок, содержащий аденилатдезаминазную активность, может быть переведен в любой буферный раствор, в минимальном объеме. Таким образом можно получать ферментный препарат с ак-

Таблица 13

Применение различных денатурирующих агентов для очистки  
аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

№ п. п.	Денатурирующие агенты	Характеристика воздействия	Добавочные факторы	Степень очистки	Выход фермента (%)
<u>Воздействие одним агентом</u>					
1.	Температура	5 мин. при 50-53 °С	3% глицин, рН 6,0	1,6	100
2.	Температура	5 мин. при 50-53 °С	3% глицин, рН 5,0	2,0	100
3.	Полиэтиленгликоль, мол.масса- 1500	осадок при концентрации 30-45%	-	94,0	60
4.	Полиэтиленгликоль, мол.масса- 3000	осадок при концентрации 30-45%	-	35,0	40
5.	2-метилпентандиоль-2,4	осадок при концентрации 33-60%	-	11,5	100
<u>Воздействие двумя агентами</u>					
6.	Температура, полиэтиленгликоль - 1500	5 мин. при 50-53 °С осадок при конц. 0-30%	3% глицин, рН 6,0 -	9,4	16
7.	Температура, полиэтиленгликоль - 1500	5 мин. при 50-53 °С осадок при конц. 0-30%	3% глицин, рН 5,0 -	18	23
8.	Температура, 2-метилпентандиоль-2,4	5 мин. при 50-53 °С осадок при конц. 33-60%	3% глицин, рН 6,0 -	15	100
9.	Температура, 2-метилпентандиоль-2,4	5 мин. при 50-53 °С осадок при конц. 33-60%	3% глицин, рН 5,0 -	20	100

тивностью 400 ME/мл и больше. При использовании 2-метилпентандиоля-2,4 выход активности составляет 100%, а в случае применения полиэтиленгликоля сохраняется только 40-60% активности. Интересно, что при последовательном использовании термообработки и фракционирования растворами полиэтиленгликоля белок, обладающий аденилатдезаминазной активностью, выпадает в осадок уже в пределах концентраций полиоля 0-33% (№ 6 и 7 в табл. I3). При этом теряется около 80% активности. По-видимому, термо- и термокислотная обработка вызывает какие-то структурные или конформационные изменения в молекулах фермента, вследствие чего они становятся менее стабильными.

При использовании денатурирующих агентов наивысшая степень очистки достигается путем осаждения фермента полиэтиленгликолем с молекулярной массой 1500 (очистка в 94 раза). Это сравнимо и даже несколько превышает результаты, полученные с применением двухэтапной очистки - обработки суспензии клеток активированным углем и хроматографией на ионообменных смолах ДЭАЭ-целлюлозе и ЭДЭ-ЮП или разделении на материалах на основе макропористого кремнезема.

Вышеописанные способы очистки аденилатдезаминазы отличаются друг от друга по применяемым методам, численностью этапов работы, выходом деаминазной активности и степенью очистки целевого продукта, а также по времени, которое занимает проведение очистки (табл. I4).

Таблица 14

Сравнение различных способов очистки аденилатдезаминазы  
*P. lanoso-viride* 8D

Характеристика способов	Способ			
	с гельфильтрацией и хроматографией на анионообменных смолах		с хроматографией на материалах на основе кремнезема	с термо- и термокислотной денатурацией и фракционированием полиолями
	6-этапный	ускоренный		
Количество этапов	6	2	2	2-3
Степень очистки аденилатдезаминазы	I3I7	I4-I9	II-83	2-94
Выход аденилатдезаминазной активности (%)	2I	90-93	65-95	40-100
Время проведения очистки (сутки)	5	2-3	2	I

Глава 6. Каталитические и физикально-химические свойства аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

У очищенного препарата аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D с удельной активностью 790 ME на мг белка были определены каталитические и физико-химические свойства.

Проверяли субстратную специфичность аденилатдезаминазы по отношению к 14 субстратам (табл. 15) - адениловых, гуаниловых и цитидиловых соединений.

Как видно из таблицы 15, наиболее высокая каталитическая активность проявляется по отношению к АМФ, в меньшей степени к АДФ, АТФ и аденозину. Таким образом, аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D также как другие аденозин- и аденилатдезаминазы микроскопических грибов (Wolfenden et al., 1967; Chung et al., 1967) активно дезаминирует адениловые нуклеотиды и

Таблица 15

Субстратная специфичность очищенной  
аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

Субстраты	Деаминазная активность	
	МЕ/мг белка	в %*
АМФ	790	100
АДФ	751	95
АТФ	695	88
аденозин	656	83
НАД	395	50
дезоксид АМФ	211	27
дезоксиаденозин	205	26
НАДФ	134	17
2',3'-цАМФ	111	14
НАДФН	0	0
аденин	0	0
поли А	0	0
ГМФ	0	0
ЦМФ	0	0

\* За 100% принята активность деаминарования АМФ.

аденозин, менее активно - их дезоксирибозопроизводные, НАД и НАДФ и также как аденозиндеаминаза *Aspergillus oryzae* (Wolfenden et al., 1967) не деаминирует аденин и полиадениловую кислоту. Деаминарование аденозина происходит в 3 раза быстрее, чем деаминарование дезоксиаденозина. Эти данные говорят о том, что для аденилатдеаминазы решающую роль в "узнавании" субстрата играет не только конформация пуринового кольца,

но и наличие группировки, присоединенной к второму атому углерода в рибозе. Наиболее быстро протекают реакции, в которых участвуют соединения, имеющие свободные гидроксильные группы во 2-м и 3-м положениях рибозного кольца. Неспособность дезаминировать полиадениловую кислоту может быть обусловлена полимерной природой субстрата.

$K_M$  для дезаминирования АМФ составляет  $7,4 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 12). Однако при концентрациях, превышающих 10 мкМ, аденилатдезаминазная реакция не подчиняется уравнению Михаэлиса - наблюдается ингибирование субстратом. Определенная нами  $K_M$  примерно на порядок выше, чем у аденозиндезаминазы *A. oryzae* (Minato et al., 1966) и *Streptomyces aureofaciens* (Rosinova et al., 1978<sup>b</sup>), и на два порядка выше, чем у *Microsporium audouinii* (Chung et al., 1967). Оптимальной является  $5,2 \cdot 10^{-3}$  М концентрация АМФ (табл. 16). При ней достигается максимальная скорость реакции и ещё не наблюдается ингибиторный эффект избытка субстрата.

Таблица 16

Некоторые кинетические константы  
аденилатдезаминазы *F. lanoso-viride* 3D

Субстраты	Константа Михаэлиса	Константа ингибирования субстратом	Оптимальная концентрация субстрата
аденозин	$5,7 \cdot 10^{-3}$ М	-	-
АМФ	$7,4 \cdot 10^{-3}$ М	$4,0 \cdot 10^{-3}$ М	$5,2 \cdot 10^{-3}$ М

Нами разработан способ [А. с. 764385 (СССР)] получения различных производных гипоксантина путем микробиологического дезаминирования соответствующих соединений аденина, используя

цельные клетки *P. lanoso-viride* 8D, обладающие высокой аденилатдезаминазной активностью. Биомассу гриба, полученную из одной чашки Петри со средой № I, перемешивают с 5 мл 0,2M водного раствора АМФ, инкубируют при  $25 \pm 2$  °C в течение 10 мин., и из супернатанта получают целевой продукт - ИМФ. Выход ИМФ составляет около 70%. Продукты выделяют из реакционной смеси выпариванием в вакууме при  $30 \pm 1$  °C. Биомассу гриба можно повторно использовать для дезаминирования, его снова суспендируя в растворе производного аденина. Биомасса сохраняет дезаминазную способность без существенного спада в течение 10-15 циклов работы. Получение разных производных аденина в эквивалентных количествах осуществляется аналогичным способом, только с изменением времени инкубирования (табл. I7).

Таблица I7

Время инкубирования биомассы *P. lanoso-viride* 8D с различными производными аденина и выход продуктов их микробиологического дезаминирования

Субстраты	Целевые продукты	Время инкубации (мин.)	Выход целевых продуктов (%)
АМФ	ИМФ	10	70
АДФ	ИДФ	10	70
АТФ	ИТФ	11	85
аденозин	инозин	12	100
НАД	никотинамидгипоксантидинуклеотид	20	85
дезоксидеокси АМФ	дезоксидеокси ИМФ	45	80
дезоксидеокси аденозин	дезоксидеокси инозин	47	100
НАДФ	никотинамидгипоксантидинуклеотидфосфат	50	75
2',3'-цАМФ	2',3'-цИМФ	52	90

Ту же реакцию проводили и в колонке (0,8x2,2 см), заполненной биомассой. С целью уменьшения уплотненности колонки, биомассу перемешивали с равным объемом нейтрального носителя - кусочками поролон (размер около 2x2 мм), гранулированным пенопластом или мелкими стеклянными шариками. Повышение выхода целевых продуктов достигалось добавлением в раствор адениловых нуклеотидов вольфрамовой кислоты до конечной концентрации 0,005M. В таком случае выход продуктов дезаминирования при равном времени инкубации составлял 95-100%. Как известно, химические способы получения производных гипоксантина из соответствующих производных аденина, которые применяются в отечественной промышленности, дают только 60-70% выход дезаминированных продуктов [А. с. 207907 (СССР)].

Применение вольфрамата для ингибирования сопутствующей аденилатдезаминазе фосфатазной активности у продуцентов рода *Aspergillus* было уже ранее предложено японскими авторами [Пат. 46-20038 (Япония)]. Аналогичный эффект наблюдался и у *P. lanoso-viride* 8D. В таблице 18 представлены данные о влиянии присутствия двух- и трёхвалентных катионов в инкубационной среде на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D.

Как видно, ни один из проверенных катионов не служит активатором аденилатдезаминазы в испытанных концентрациях. Напротив, некоторые катионы являются ингибиторами -  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ . Аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D не требует присутствия диализуемых кофакторов, что подтверждает диализ против 500 объемов 0,05M КФ-буфера pH 6,0 в течение 24 часов, после чего активность фермента не уменьшается. Отсутствие необходимости в диализуемых кофакторах отмечено и у других дезаминаз (Zielke, Suelter, 1971).

Влияние катионов на активность  
аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

Катионы (4 мМ)	Аденилатдезаминазная активность	
	МЕ/мг белка	в % к
-	780	100
$\text{Li}^{2+}$	780	100
$\text{Ba}^{2+}$	780	100
$\text{Ca}^{2+}$	780	100
$\text{K}^+$	780	100
$\text{Na}^+$	741	95
$\text{Cr}^{3+}$	710	91
$\text{Mg}^{2+}$	702	90
$\text{Ni}^{2+}$	664	88
$\text{NH}_4^+$	644	80
$\text{Mn}^{2+}$	608	78
$\text{Co}^{2+}$	608	78
$\text{Fe}^{2+}$	481	63
$\text{Zn}^{2+}$	296	38
$\text{Cu}^{2+}$	296	38
$\text{Al}^{3+}$	101	13

\* За 100% принята активность в 0,05М КФ-буфере, рН 6,0.

Зависимость активности аденилатдезаминазы от концентрации  $\text{NaCl}$  изображена на рисунке 13. Видно, что отклонение молярности от оптимальной (0,04-0,10 М  $\text{NaCl}$ ) вызывает снижение активности фермента.

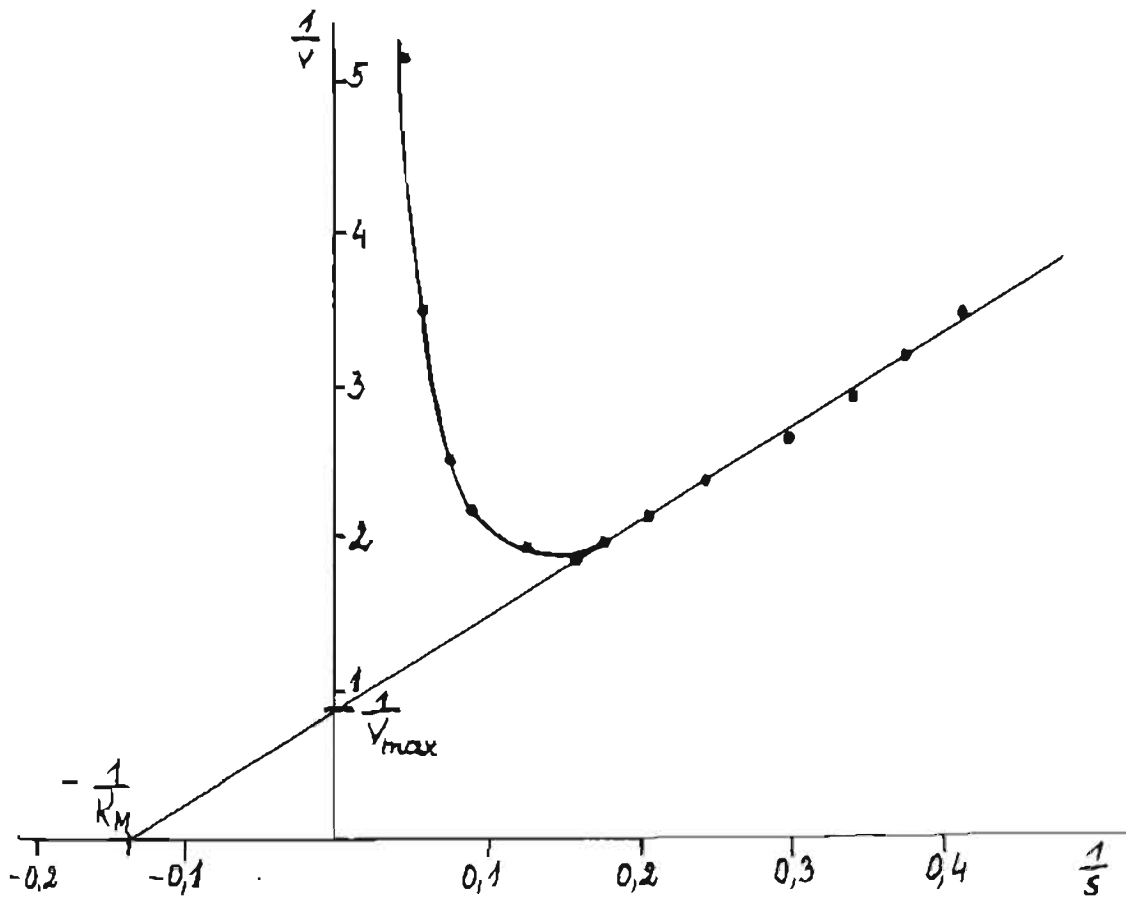


Рис. 12. Определение  $K_M$  для аденилатдезаминазной реакции

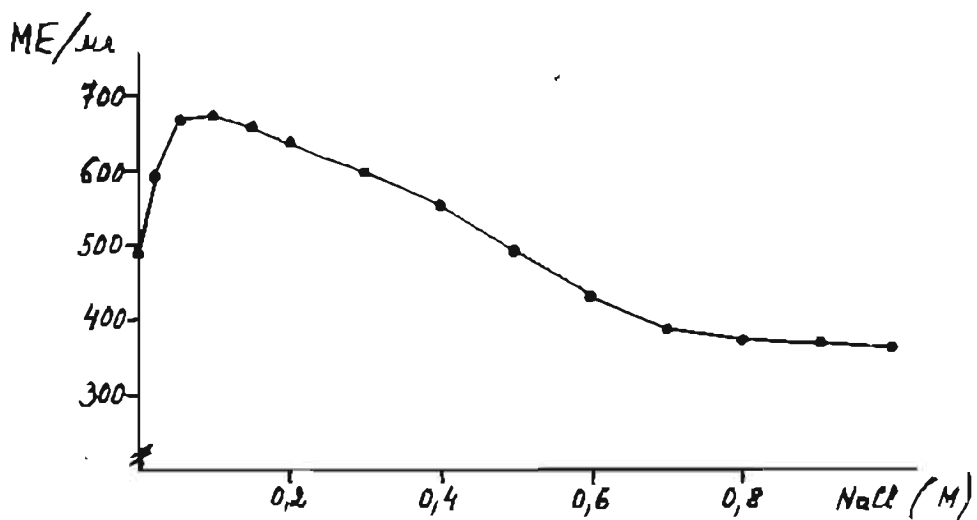


Рис. 13. Зависимость активности аденилатдезаминазы *P. lanosoviride* 8D от концентрации NaCl

Все известные дезаминазы производных аденина имеют оптимум активности при физиологически нормальных значениях pH, близких к нейтральным - обычно в пределах от 5,0 до 7,5 (Zielke, Suelter, 1971), за исключением АДФ-дезаминаз грибов рода *Aspergillus* - pH около 3,4 (Chung et al., 1967). Дезаминаза *P. lanoso-viride* 8D сохраняет активность в интервале pH 3,0-9,0, а максимальную активность проявляет при pH  $6,0 \pm 0,3$  (рис. 14). Наиболее высокая аденилатдезаминазная активность обнаруживается в КФ-буфере, примерно на 30% ниже - в цитратном буфере. Активность несколько ниже также и в трис-HCl и боратном буфере.

Температурный оптимум каталитического действия аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D равен  $37 \pm 3$  °C (рис. 15), что близко к оптимальным температурам дезаминаз других грибов (Mitchell, McElroy, 1946; Chung et al., 1968). Соотношение скорости реакции при 37 °C и 20 °C равно 3. Но, например, аденозиндезаминаза из *Flavobacterium breve* имеет ещё более высокий температурный коэффициент катализируемой реакции - примерно 5 (Жагат и др., 1981).

Работу с дезаминазой *P. lanoso-viride* 8D облегчает ее относительная стабильность во время хранения при пониженной температуре в 0,05M КФ-буфере, pH 6,0 (табл. 19). Фермент практически полностью инактивируется за неделю хранения при температуре 18 °C, но сохраняет активность в течение нескольких месяцев при пониженной до 2 °C температуре.

На рис. 16 приведены результаты определения активности аденилатдезаминазы после предварительного нагревания ферментного раствора при разных температурах и при двух pH - 3,0 и 6,0 в течение 10 мин. Нагревание ферментного раствора при 45 °C

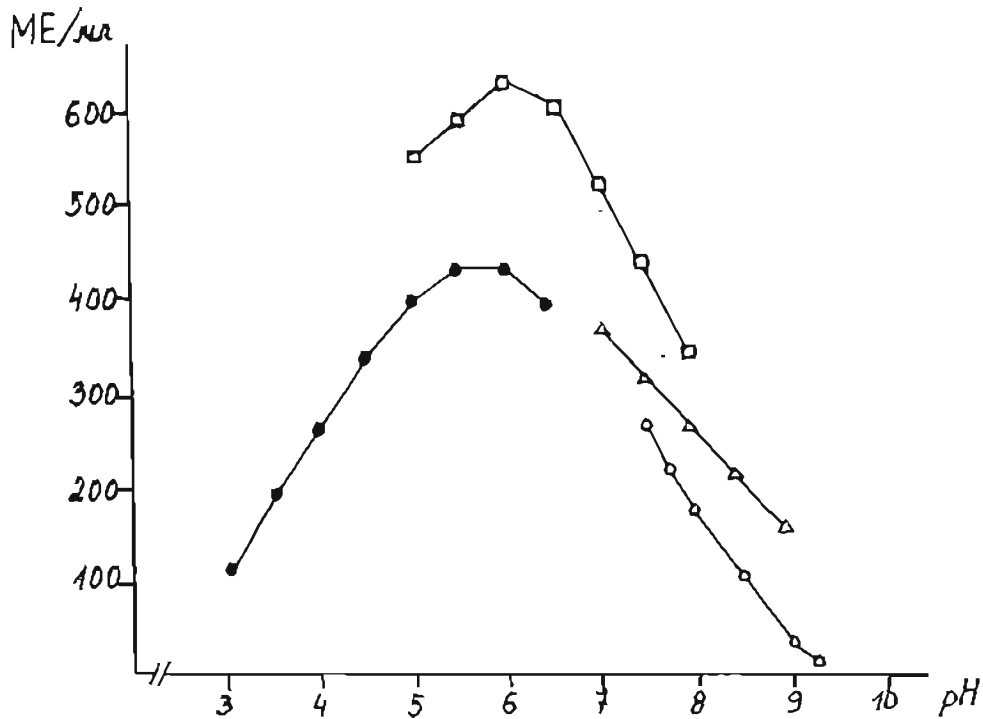


Рис. 14. Влияние pH инкубационной смеси на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

- калий-фосфатный буфер
- цитратный буфер
- △—△ трис-HCl буфер
- боратный буфер

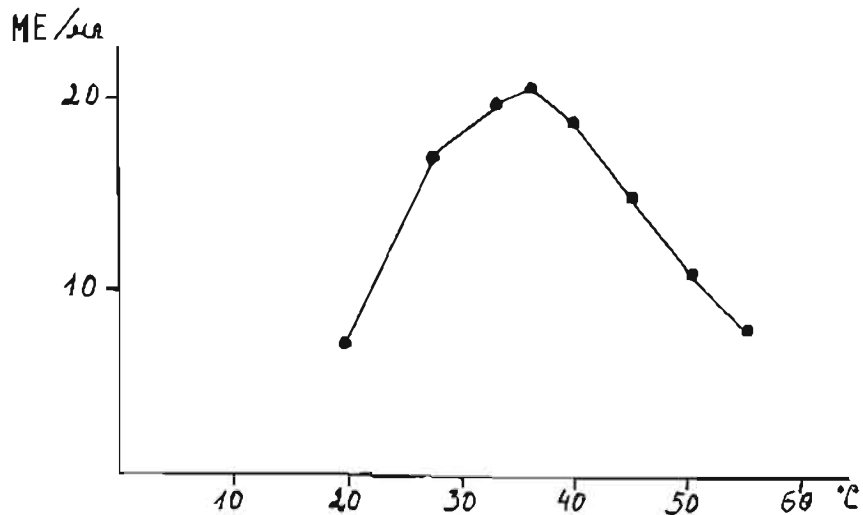


Рис. 15. Влияние температуры инкубационной смеси на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

Таблица 19

Стабильность очищенной аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D во время хранения в 0,05M KCl-буфере при pH 6,0

Температура (°C)	Время хранения	Аденилатдезаминазная активность	
		ME/мг белка	% *
2	7 дней	790	100
	2 месяца	727	92
18	2 дня	727	92
	6 дней	16	2
40	30 мин.	727	92
	60 мин.	55	7

практически не инактивирует фермент, при 55 °C и pH 6,0 инактивируется 10% аденилатдезаминазы, а при 50 °C и pH 3,0 - 25%. Быстрая потеря активности наступает при повышении температуры выше 55 °C. При 65 °C теряется практически вся активность деаминазы почти независимо от pH инкубационной среды.

На рис. 17 представлены данные определения активности аденилатдезаминазы, подвергнутой нагреванию в течение различного времени при pH 6,0 и температурах 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70 и 75 °C. Кратковременное нагревание выше 55 °C вызывает резкое падение активности. Так через 5 мин. инкубации при 60 °C сохраняется 50%, при 65 °C - 34%, при 70 °C - 13% активности. Нагревание, не превышающее 45 °C, в течение 10 мин. не инактивирует аденилатдезаминазу.

Опыты по выявлению некоторых потенциальных стабилизаторов аденилатдезаминазной активности во время ее термообработки (табл. 20) показывают, что аденин, а также субстраты - аденозин и АМФ - не только не являются стабилизаторами, но способствуют

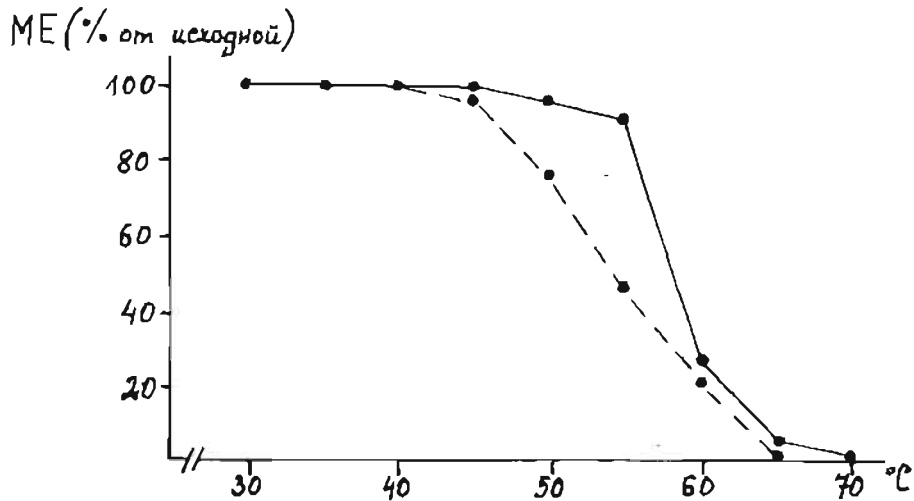


Рис. 16. Влияние нагревания ферментного раствора в течение 10 мин. при различной температуре на активность аденилат-дезаминазы *P. lanoso-viride* 8D: — pH 6,0; - - - - pH 3,0

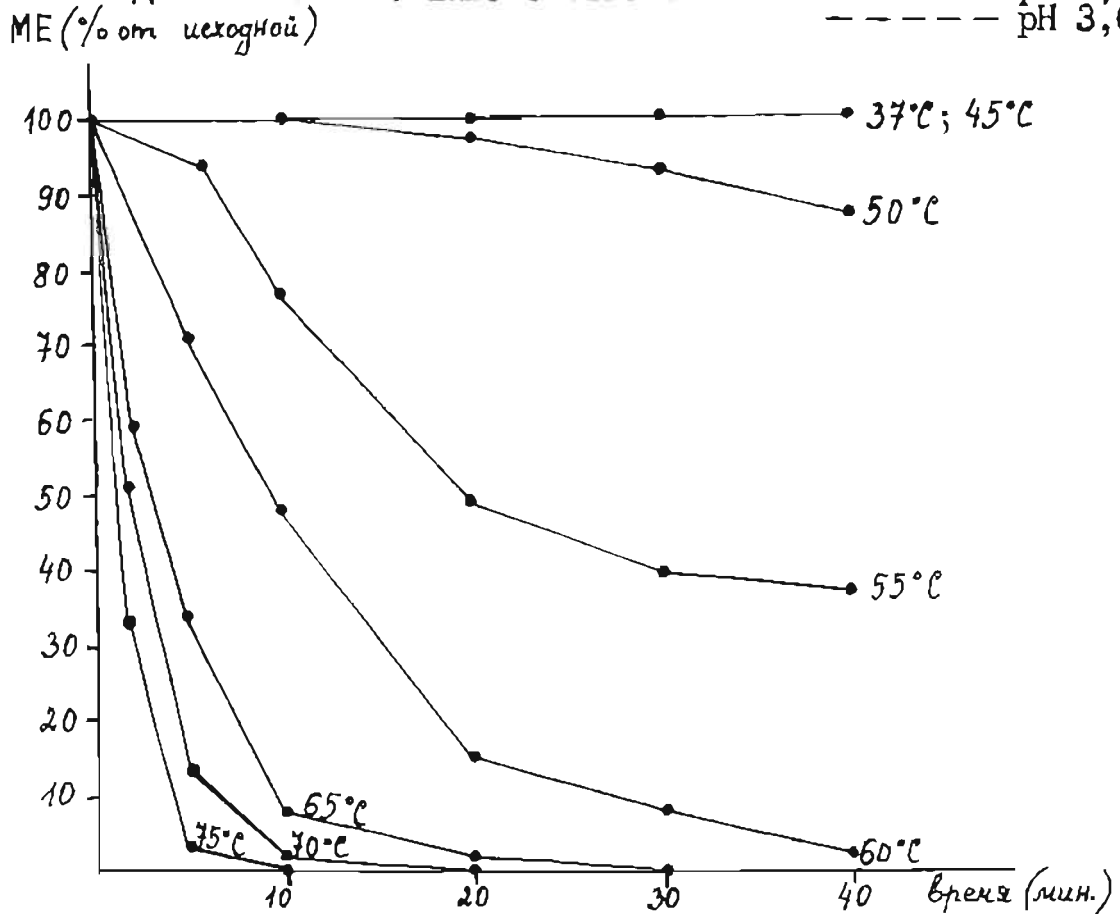


Рис. 17. Влияние времени нагревания ферментного раствора при pH 6,0 и различной температуре на активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

Таблица 20

Выявление некоторых стабилизаторов активности аденилатдезаминазы во время её термообработки

Потенциальные стабилизаторы	Аденилатдезаминазная активность	
	МЕ/мл	в % от исходной, без термообработки
-	53	71
АМО	12	16
аденозин	21	28
аденин	45	60
глицин	75	100
антитела	73	97

термоинактивации фермента. Наиболее неблагоприятно действует АМО, причем одинаково в 2,5 мМ и 10,0 мМ конечной концентрации. Для многих ферментов (но не для всех) субстраты служат в качестве стабилизаторов активности (Наградова, Гроздова, 1977). Но именно по этому показателю насчет дезаминаз нами не были найдены никакие литературные данные. Добавление глицина до 3% конечной концентрации полностью предотвращает термоинактивацию аденилатдезаминазы во время её нагревания при 60 °С в течение 5 мин. Сыворотка против аденилатдезаминазы с титром антител 1:64 также значительно стабилизирует дезаминазную активность.

Уже в процессе очистки были получены предварительные данные о высокой молекулярной массе аденилатдезаминазы *P. lanosoviride* 8D, так как активность обнаруживалась в ранних фракциях элюата с колонки с сефадексом Г-200 (рис. 10). Для более точного определения молекулярной массы были сопоставлены данные,

полученные двумя методами - гельфильтрацией на СL-сефарозе 4В и электрофорезом в гелях 7,5% полиакриламида.

При гельфильтрации аденилатдезаминазной активностью обладали фракции, соответствующие молекулярной массе 210 тыс. дальтон (рис. 18). Но, хотя для анализов использовалась высокоочищенная аденилатдезаминаза, препарат не был электрофоретически гомогенным - при многократных повторностях проявилось 3-7 зон, в том числе и зона, соответствующая белкам с молекулярной массой около 210 000 (рис. 19). Аденилатдезаминазная активность в разрезанных после электрофореза зонах геля в большинстве случаев не была обнаружена. Имели место некоторые исключения - так, например, мы обнаружили ферментативную активность в зонах с  $R_f$  0,05-0,10; 0,05-0,20, а также с  $R_f$  0,45-0,50 и  $R_f$  0,85-0,90. Преэлектрофорез не влиял на появление аденилатдезаминазной активности. Деаминазная активность не восстанавливалась и при объединении всех зон, т.е., при инкубировании вместе всего столбика геля. Активные формы фермента, упомянутые выше, соответствовали белкам с молекулярной массой 210 000, ниже 90 000 и больше 700 000.

При очистке фермента термоденатурацией с последующим фракционированием белков раствором полиэтиленгликоля были получены два ферментных препарата, отличающихся по электрофоретической подвижности и хроматографическому поведению при гельфильтрации на сефадексе Г-200. Проходящий термоденатурацию ферментный препарат обладал низкой электрофоретической подвижностью ( $R_f \leq 0,30$ ), а препарат, проходящий как термоденатурацию, так и фракционирование полиэтиленгликолем, дал на электрофореграмме 7 зон с  $R_f$  0,08-0,70. Сравнительно низкомолекулярная масса этого препарата подтвердилась и гельфильтрацией,

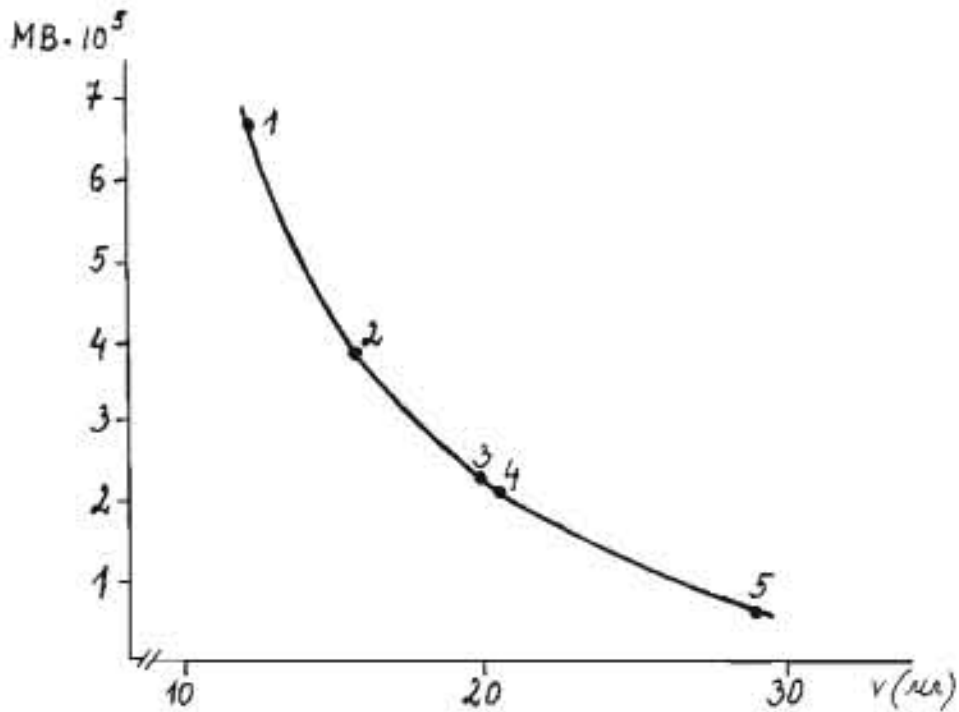


Рис. 18. Определение молекулярной массы аденилатдеаминазы *P. lapovo-viride* 8D методом хроматографии на колонке с СL-сефарозой 4В:

1 - тиреоглобулин; 2 - ферритин; 3 - каталаза;  
4 - аденилатдеаминаза; 5 - гемоглобин

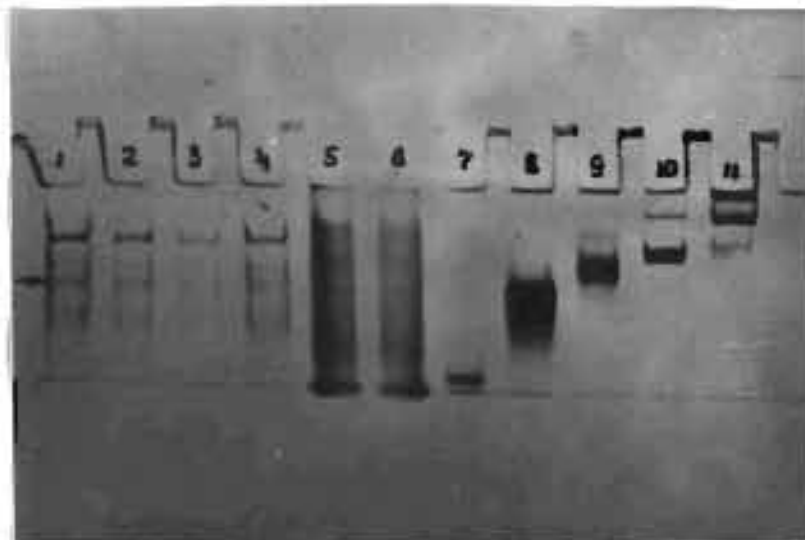


Рис. 19. Определение молекулярной массы аденилатдеаминазы

*P. lapovo-viride* 8D методом электрофореза:

1-4- очищенный препарат аденилатдеаминазы;  
5,6- неочищенный экстракт клеток гриба;  
7- пепсин; 8- гемоглобин; 9- каталаза;  
10- ферритин; 11- тиреоглобулин

дающей представление о молекулярной массе ниже 100 000 дальтон. Осаждение аденилатдезаминазы полиэтиленгликолем без предварительной термоденатурации не дало аналогичных результатов.

Свежий очищенный препарат аденилатдезаминазы *P. lamoso-viride* 8D, не подвергнутый замораживанию-оттаиванию или другим денатурирующим воздействиям, дает на электрофореграмме зоны с  $Rf \leq 0,37$  (рис. 20<sup>а</sup>), а такой же препарат при электрофорезе в присутствии ДДС дает зоны белков и с  $Rf > 0,85$  (рис. 20<sup>б</sup>). Это указывает на субъединичное строение фермента. Поскольку при гельфильтрации препарата, не подвергнутого денатурирующим воздействиям, аденилатдезаминазная активность обнаруживается во фракциях с молекулярной массой 210 тыс. дальтон, преобладающей активной формой фермента можно считать именно форму этой фракции. Таким образом можно предполагать, что молекулярная масса нативной аденилатдезаминазы *P. lamoso-viride* 8D равна 210 тыс. дальтон. Это согласуется с представлением о структуре

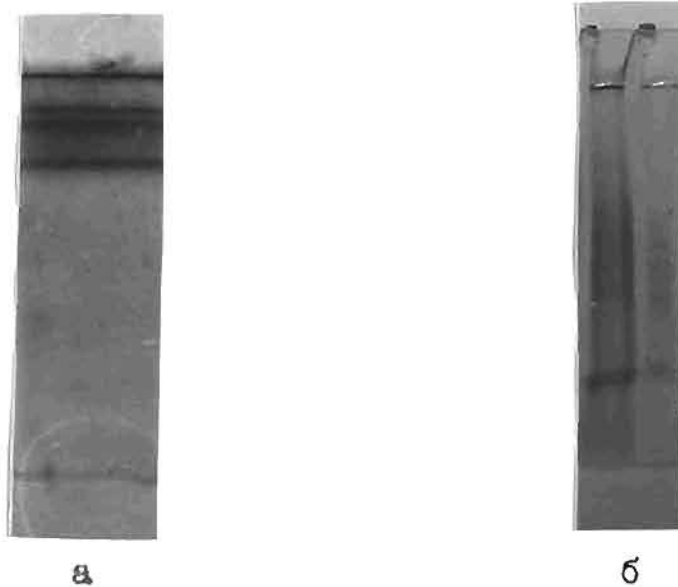


Рис. 20. Электрофореграммы не подвергнутого денатурирующим воздействиям очищенного препарата аденилатдезаминазы *P. lamoso-viride* 8D: а - без ДДС; б - в присутствии ДДС

неспецифической аденозиндезаминазы *Aspergillus oryzae*, молекулярная масса которой 214-221 тыс. дальтон и которая тоже диссоциирует на субъединицы (Minato, 1968).

Наблюдение большого спектра электрофоретических форм аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D побудило нас провести проверку на присутствие углеводов в составе ферментного препарата, так как известно, что углеводные компоненты влияют на электрофоретическую подвижность (Маурер, 1971). Установили, что полученный нами после этапа очистки гельфильтрацией препарат аденилатдезаминазы содержит 22% углеводов. Как показано в табл. 10, основная масса углеводов удаляется, т.е., остается в супернатанте при высаливании белков сульфатом аммония. Но оставшиеся 9% сохраняются и после следующего этапа очистки - хроматографии. Таким образом предполагаем, что аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D является гликопротеидом и что ее молекула содержит около 22% углеводов. Это близко к составу аденозиндезаминазы *Aspergillus oryzae*, в которой по данным С.Минато (Minato, 1968) углеводы составляют 25% массы.

Глава 7. Биологическая активность аденилат-  
дезаминазы *P. lanoso-viride* 8D

Как было показано во 2-й главе, дезаминазы соединений аденозина участвуют в разных физиологических процессах высших организмов - в обеспечивании нормального протекания мышечного сокращения, кровообращения, нейротрансмиссии и иммунного ответа. Изменение уровня активностей дезаминаз производных аденина характеризует процессы опухолевого роста. Сообщено о результатах опытов по определению влияния экзогенных аденозиндезаминаз на нейтральную активность (Michaelis et al., 1979) и липолиз (Pain, Wieser, 1975). Установлено лечебное действие введения больным с тяжелой комплексной иммунонедостаточностью эритроцитов, содержащих аденозиндезаминазу (Polmar et al., 1976<sup>A</sup>, 1976<sup>B</sup>; Cohen et al., 1978; Reem et al., 1979). Однако нами не были найдены никакие сведения о биологической активности дезаминаз микроорганизмов в тканях высших организмов. Так как аденилат-дезаминаза *P. lanoso-viride* 8D связана с развитием продуцента, то нами были предприняты попытки выяснить, влияет ли она и на процессы дифференциации клеток человека и экспериментальных животных. В качестве модели была выбрана бласттрансформация лимфоцитов и рост клеток асцитных опухолей.

### 7.1. Влияние на бласттрансформацию лимфоцитов и гемагглютинирующее воздействие

Влияние очищенного препарата аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D на стимуляцию лимфоцитов оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина в культуры лейкоцитов, а также методом морфологического учета бласттрансформации. Результаты, обобщенные в табл. 21, показывают, что грибная аденилатдезаминаза стимулирует лимфоциты практически здоровых людей. При добавлении митогена Т-лимфоцитов - ФГА (30 мкг/мл) - на 4% повышается включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки крови, при добавлении аденилатдезаминазы - на 52%. Влияние аденозина в 0,1 мМ концентрации в присутствии ФГА является незначительным. В опытах с кровью больных, получающих иммунодепрессанты, добавление стимуляторов, как ФГА, так и дезаминазы, судя по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, не усиливает синтез ДНК, а даже несколько угнетает. При совместном действии ФГА и дезаминазы никаких изменений не наблюдалось по сравнению с контролем.

Таблица 21

Стимуляция человеческих лимфоцитов ФГА  
и аденилатдезаминазой *P. lanoso-viride* 8D

№ п. п.	Варианты	Включение $^3\text{H}$ -тимидина (имп./мин.) в лимфоциты	
		здоровых людей	больных почечной недостаточностью
1	контроль	3579,1 ± 604,1	1237,0 ± 74,0
2	ФГА	3737,2 ± 267,3	1042,0 ± 43,6
3	ФГА, аденозин	3794,7 ± 426,8	-
4	ФГА, аденозин, аденилатдезаминаза	3138,4 ± 382,5	-
5	ФГА, аденилатдезаминаза	5291,9 ± 866,0	1234,1 ± 139,2
6	аденилатдезаминаза	5450,1 ± 881,2	1071,4 ± 59,4

В культурах клеток гнотобиологических морских свинок как ФГА, так и аденилатдезаминаза в отдельности стимулировали пролиферацию лимфоцитов, но при совместном их добавлении эффект снизился (рис. 21). Низкий уровень включения метки в клетках гнотобиологических животных можно объяснить слабым развитием иммунной системы у гнотобионтов (Обгольц, 1980).

В опытах с клетками селезенки мышей ФГА немного стимулировал включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки ( $1213,0 \pm 108,1$  имп./мин.) по сравнению с контролем ( $995,0 \pm 82,6$  имп./мин.), а аденилатдезаминаза даже несколько ингибировала включение ( $840,0 \pm 55,6$  имп./мин.). Так как селезенка в основном содержит В-клетки и аденилатдезаминаза их не стимулирует, то можно предполагать, что митогенная активность дезаминазы *P. lanosoviride* 8D не проявляется по отношению к В-лимфоцитам, а, возможно, является результатом стимуляции популяции Т-лимфоцитов или возникает в сложном взаимодействии различных классов лейкоцитов.

В опытах с кровью практически здоровых людей установили оптимальную дозу аденилатдезаминазы для достижения максимальной бласттрансформации лимфоцитов. Это определяли методом морфологического учета результатов - высчитывали содержание больших лимфоцитов в % от их общего количества. Как показано на рис. 22, при добавлении 2,2 МЕ аденилатдезаминазы *P. lanosoviride* 8D на мл культуры стимулированные бластклетки составляют примерно половину от всех лимфоцитов. При повышении дозы фермента до 3,0 МЕ/мл эффект стимуляции несколько снижается. В параллельном опыте, где в качестве митогена добавлен ФГА в концентрации 30 мкг/мл, большие лимфоциты составляют 40%, и в концентрации 15 мкг/мл - 22%. Таким образом трансформация

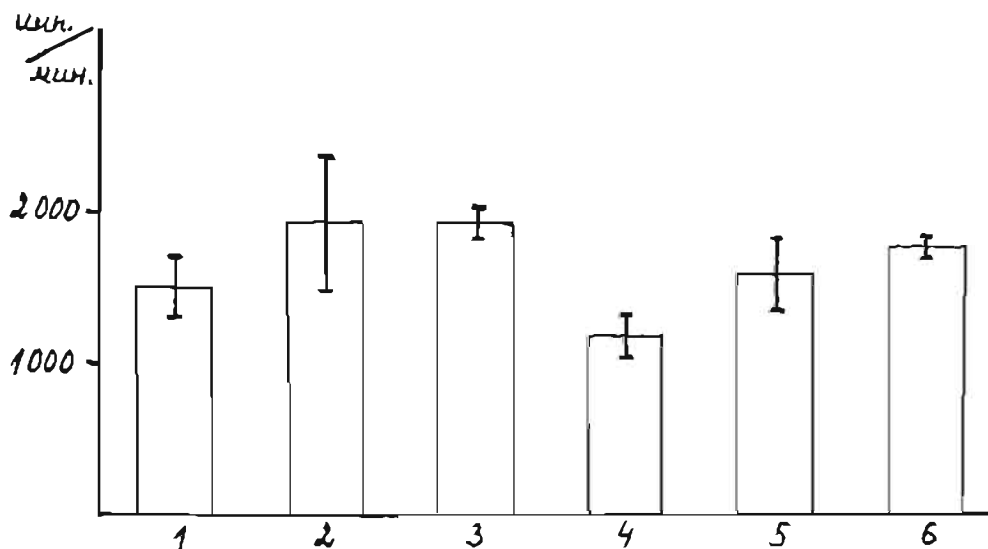


Рис. 21. Включение <sup>3</sup>H-тимидина в лимфоциты гнотобиологических морских свинок:

- I - контроль; 2 - ФГА; 3 - ФГА, аденозин;  
 4 - ФГА, аденозин, аденилатдеаминаза;  
 5 - ФГА, аденилатдеаминаза;  
 6 - аденилатдеаминаза

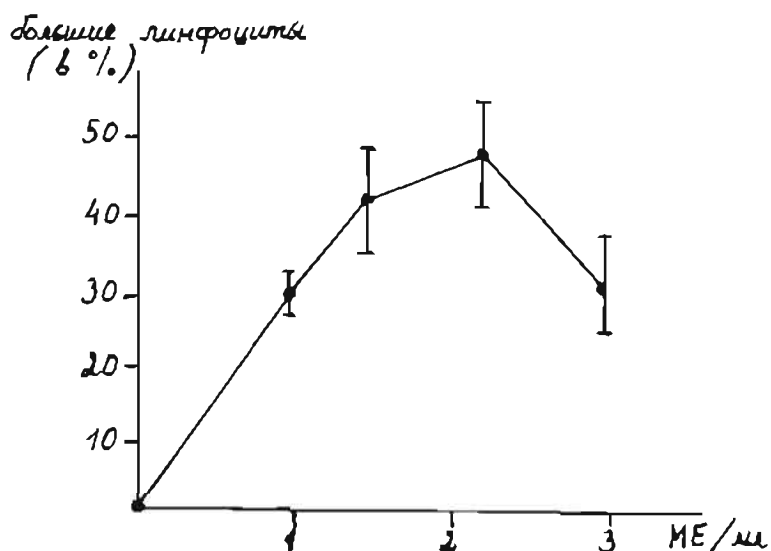


Рис. 22. Бласттрансформация лимфоцитов человеческой крови под воздействием аденилатдеаминазы *P. lipo-viride* 8D

лимфоцитов сходна в случае их стимулирования ФГА и препаратом аденилатдезаминазы. Предполагают, что митогенная активность ФГА является следствием его гликопротеидной природы. Возможно, что и аденилатдезаминаза, также содержащая в своей молекуле углеводный компонент, взаимодействует с клетками, благодаря наличию небелковой части.

Препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, применяемый примерно в таких же концентрациях, как при стимуляции лимфоцитов, оказывает гемагглютинирующее воздействие. Об этом свидетельствует визуально наблюдаемое склеивание кроличьих эритроцитов. Агглютинацию наблюдали при уровне аденилатдезаминазы равным или превышающим 1,9 МЕ/мл. Однако стимуляция лимфоцитов происходит уже при уровне дезаминазной активности 1,0 МЕ/мл. Тем, что лимфоцитстимулирующая активность аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D проявляется при менее высоких дозах фермента чем гемагглютинирующее действие, дезаминаза отличается от ФГА, который агглютинирует эритроциты при минимальной концентрации 0,2–0,5 мкг на мл 1% суспензии эритроцитов, а лимфоциты стимулирует только при концентрации 10 мкг/мл (Карманский, 1977).

## 7.2. Влияние на синтез нуклеиновых кислот в клетках асцитных опухолей *in vitro*

Функциональные повреждения иммунной системы организма могут способствовать возникновению и развитию злокачественных опухолей. Учитывая некоторое стимулирующее действие аденилатдезаминазы из *P. lanoso-viride* 8D на клетки иммунной системы млекопитающих, возникло предположение о возможной канцеростатической активности фермента, которое экспериментально проверяли

на модели некоторых видов опухолевых клеток мышей *in vitro* и *in vivo*.

В проведенных нами опытах по изучению влияния препарата аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D на синтез нуклеиновых кислот в клетках асцитных опухолей *in vitro* в качестве объектов были выбраны клетки асцитной карциномы Эрлиха и асцитных лимфолейкозов L 5178Y, L 1210 и P 388, перевиваемые у мышей. Результаты оценивали по данным включения  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислото-нерастворимую фракцию клеток.

Как видно из рис. 23, деаминаза снижает уровень включения  $^{14}\text{C}$ -урацила в высокомолекулярные соединения клеток, при том в случае карциномы Эрлиха - чем больше доза фермента, тем больше вызванный им эффект, а в случае лимфолейкоза L 5178Y повышение дозы фермента до 0,5 ME/мл угнетает синтез нуклеиновых кислот на 46%, а дальнейшее увеличение дозы дает противоположный результат - при 2,0 ME/мл синтез нуклеиновых кислот обновляется до исходного уровня. У клеток асцита Эрлиха только на 16% ингибируется включение меченого урацила при добавлении 0,5 ME/мл аденилатдезаминазы, и на 27% - при 2,0 ME/мл.

Однофакторный дисперсионный анализ данных (табл. 22 и 23) показывает, что удельный вес влияния аденилатдезаминазы на включение меченого предшественника нуклеиновых кислот в асцитные клетки Эрлиха составляет 95,3% и что воздействие фермента является существенным. Существенное снижение включения урацила наблюдается при 0,5 ME/мл и 2,0 ME/мл фермента (при уровне существенности  $\alpha = 0,05$ ).

Добавление препарата деаминазы существенно изменяет и включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в клетки лимфолейкоза L 5178Y. Удельный вес влияния фермента составляет 77,7% (табл. 24 и 25), а

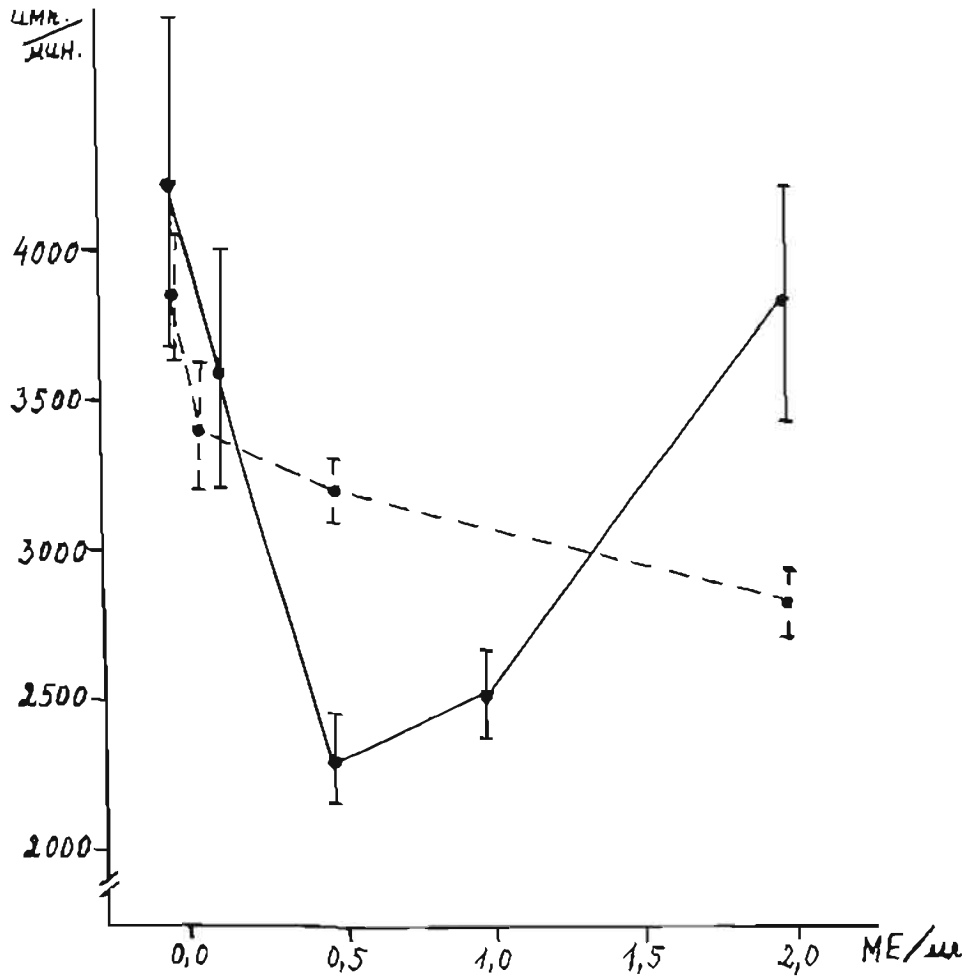


Рис. 23. Включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию асцитных клеток в опытах *in vitro* при добавлении аденилатдезаминазы *P. lanozo-viride* 8D

— лимфоциты L 5178Y;  
 - - - карцинома Эрлиха

Таблица 22

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния аденилатдезаминазы на включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию асцитных клеток Эрлиха в опытах *in vitro*

Дисперсия	Сумма квадратов отношения $Q$	Удельный вес влияния $\chi^2$ (%)	Число степеней свободы $\nu$	Средний квадрат отклонения	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Общая	304	100,0	42	-	-	-	-
Фактора	290	95,3	3	96,7	241,75	2,45	3,51
Остатка	14	4,7	39	0,4			

Таблица 23

Анализ разниц классов градаций при определении влияния аденилатдезаминазы на включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию асцитных клеток Эрлиха в опытах *in vitro*

Классы градаций	$\bar{x}$	Разница $\bar{x}$ с		
		3,4	3,2	2,8
$A_1$	3,1	0,4	<u>0,6</u>	<u>1,0</u>
$A_2$	3,4	-	0,2	<u>0,6</u>
$A_3$	3,2	-	-	0,4
$A_4$	2,8	-	-	-

$A_1$  - контроль;  $A_2$  - 0,07 ME/мл аденилатдезаминазы;

$A_3$  - 0,5 ME/мл аденилатдезаминазы;  $A_4$  - 2,0 ME/мл аденилатдезаминазы

Одной чертой подчеркнуты разницы, значимость которых превышает  $\neq 0,05$ .  
Двумя чертами подчеркнуты разницы, значимость которых превышает  $\neq 0,01$ .

Таблица 24

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния аденилатдезаминазы на включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию опухолевых клеток L 5178Y в опытах *in vitro*

Дисперсия	Сумма квадратов отношения $\sigma$	Удельный вес влияния $\eta^2(\%)$	Число степеней свободы $\nu$	Средний квадрат отклонения $\tau$	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Общая	99	100,0	24	-	-	-	-
Фактора	77	77,7	4	19,3	17,54	2,87	4,43
Остатка	22	22,3	20	1,1			

Таблица 25

Анализ разниц классов градаций при определении влияния аденилатдезаминазы на включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию асцитных клеток L 5178Y в опытах *in vitro*

Классы градаций	$\bar{x}$	Разница $\bar{x}$ с			
		3,8	3,6	2,5	2,3
A <sub>1</sub>	4,2	0,4	0,6	<u>1,7</u>	<u>1,9</u>
A <sub>5</sub>	3,8	-	0,2	<u>1,3</u>	<u>1,5</u>
A <sub>2</sub>	3,6	-	-	1,1	<u>1,3</u>
A <sub>4</sub>	2,5	-	-	-	0,2
A <sub>3</sub>	2,3	-	-	-	-

A<sub>1</sub> - контроль; A<sub>2</sub> - 0,15 ME/мл аденилатдезаминазы; A<sub>3</sub> - 0,50 ME/мл аденилатдезаминазы; A<sub>4</sub> - 1,0 ME/мл аденилатдезаминазы; A<sub>5</sub> - 2,0 ME/мл аденилатдезаминазы

Одной чертой подчеркнуты разницы, значимость которых превышает  $\gamma$  0,05.  
Двумя чертами подчеркнуты разницы, значимость которых превышает  $\gamma$  0,01.

существенное снижение синтеза нуклеиновых кислот по сравнению с контролем происходит, если добавляют 0,5 и 1,0 ME/мл активности фермента ( $\alpha = 0,05$ ). Добавление 2,0 ME/мл аденилатдезаминазы существенных изменений (по сравнению с контролем) в уровне синтезируемых нуклеиновых кислот не вызывает.

Аналогичные опыты с клетками лимфоидного лейкоза L 1210 и лимфоцитарного лейкоза P 388 дали отрицательные результаты (табл. 26) - не были обнаружены существенные отличия в уровне синтеза нуклеиновых кислот при добавлении 0,1-2,0 ME/мл аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D. Напротив, в случае L 1210 наблюдалась тенденция к повышению уровня включения метки в высокомолекулярную фракцию клеток при добавлении 0,1-0,5 ME/мл фермента.

Известно, что злокачественным лимфобластным клеткам, таким как L 5178Y и L 1210, свойственен повышенный уровень аденозиндезаминазной активности и в то же время - отсутствие аденилатдезаминазной активности (Scholar, Calabresi, 1973). А в опухолевых клетках асцита Эрлиха идет сильное дезаминирование аденилата: около 82% АМФ подвергается дезаминированию, и только оставшая часть проходит катаболизм через дефосфорилирование (Dawson, Zauer, 1970; Lomax, Henderson, 1973). Учитывая уровень активности эндогенных дезаминаз производных аденина, интересно то, что добавление чужеродной низкоспецифичной аденилатдезаминазы, какой по отношению к асцитным клеткам мышей является дезаминаза *P. lanoso-viride* 8D, в клетках лимфолейкоза L 5178Y и асцита Эрлиха вызывает снижение включения  $^{14}\text{C}$ -урацила, что, по-видимому, отражает важные сдвиги в метаболизме. В проведенных опытах мы ограничивались установлением эффекта влияния грибной аденилатдезаминазы на синтез нуклеиновых кислот,

Таблица 26

Включение  $^{14}\text{C}$ -урацила в кислотонерастворимую фракцию клеток асцитных лимфолейкозов L 1210 и P 388 в опытах *in vitro* при добавлении препарата аденилатдезаминазы P. 1 novo-viride 8D

№ п. п.	Добавленная аденилат-дезаминаза (МЕ/мл)	Лимфолейкоз L 1210		Лимфолейкоз P 388	
		повторы	включение $^{14}\text{C}$ -урацила (имп./мин.)	повторы	включение $^{14}\text{C}$ -урацила (имп./мин.)
1	0,0	8	4931,4 ± 196,3	7	3555,2 ± 112,5
2	0,1	6	5575,0 ± 446,1	5	3601,9 ± 197,8
3	0,5	5	5750,2 ± 800,8	6	3388,3 ± 212,0
4	1,0	8	5048,8 ± 181,2	6	3420,0 ± 221,1
5	2,0	6	5056,6 ± 410,7	5	3513,3 ± 176,8

но не затрагивали вопрос о том, является ли это следствием каталитической активности или глюкопротеидной природы фермента, или, что кажется наиболее вероятно, - следствием их суммирования.

### 7.3. Влияние на продолжительность жизни мышей с асцитным лимфолейкозом L 5178Y

Так как в опытах *in vitro* препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D оказывал наиболее сильное влияние на синтез нуклеиновых кислот в клетках лимфатического лейкоза L 5178Y, то опыты *in vivo* проводили именно с этим видом лейкоза. В качестве стандарта применяли препарат L-аспарагиназы - средство для лечения лейкозов, в том числе острого лейкоза (Хомченковский, 1980).

Результаты (табл. 27) показывают, что относительно невысокие дозы (50 ME/кг) аденилатдезаминазы увеличивает среднюю про-

Таблица 27

Противолейкозная активность аденилатдезаминазы в отношении лимфолейкоза L 5178Y

Препарат	Доза (ME/кг)	Средняя продолжительность жизни животных (сутки)	Продолжительность жизни животных опытных групп (% к контролю)	Эффективность аденилатдезаминазы (% от эффективности L-аспарагиназы 100 ME/кг)
аденилатдезаминаза	50	24,2	158,2	55,7
	100	15,5	101,3	1,2
	200	13,7	89,5	-
	300*	7,3	47,7	-
L-аспарагиназа	50	29,8	194,8	
	100	31,3	204,5	
	200	25,8	168,6	
контроль		15,3		

\* Одноразовое введение

должительность жизни мышей на 58,2%. *L*-аспарагиназа в дозах 50 и 100 МЕ/кг продлевает жизнь соответственно на 94,8 и 104,5%, а более высокие дозы (200 МЕ/кг массы животного) на 68,6%.

При повышении дозы аденилатдезаминазы наблюдается снижение и даже исчезновение положительного эффекта при введении 100 МЕ/кг, а однократное инъектирование 300 МЕ/кг примерно в два раза ускоряет гибель животных опытной группы по сравнению с контролем. Можно было бы подумать, что летальность вызвана гемагглютинирующей активностью аденилатдезаминазы. Как было показано выше, при 1,9 и больше МЕ активности на мл происходит агглютинация эритроцитов. А при введении 200 и больше МЕ на кг массы животных в крови достигается примерно такой же уровень фермента, что может явиться причиной свертывания крови, и это в свою очередь приводит к гибели. Но однократное введение аденилатдезаминазы не вызывает гибель интактных мышей даже в дозах 1000–2000 МЕ/кг массы животного.

Известно, что способность агглютинировать клетки, что быстрее чем со всеми другими происходит с недифференцированными клетками (Метаковский, 1981), лежит в основе продления жизни при введении некоторых препаратов, например, ФГА (Folk, Pierre, 1971; Yang, 1975), который действует на клетки лимфолейкоза, как в качестве митогена, так и в качестве агглютинирующего агента. Аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D, как выше описано, обладает сходными свойствами, и не исключено, что в какой-то мере сходными являются и механизмы их действия. Отличия обязательно обуславливают то, что препарат аденилатдезаминазы кроме того обладает и каталитической активностью, что тоже должно оказывать влияние на процессы метаболизма. Для выяснения механизма действия аденилатдезаминазы *P. lanoso-*

*viride* 8D и изучения возможностей её применения в медицине необходимо ещё провести большую экспериментальную работу.

#### 7.4. Аденилатдезаминаза в составе кормовых добавок

Как было указано во второй главе, поступление в организм больших количеств производных аденина вызывает токсические явления. Биомасса бактерий и дрожжей очень богата нуклеиновыми кислотами, они составляют соответственно 8,0–16,0 и 6,0–12,0% от их сухой массы (Межиня и др., 1982). Именно высокое содержание производных нуклеиновых кислот является фактором, ограничивающим их использование в качестве корма для сельскохозяйственных животных. Наиболее выраженной токсичностью обладает аденин и его производные. В результате вскармливания продуктов, обогащенных аденином, изменяется активность ферментов пуринового обмена и уменьшается скорость роста животных (Clifford, Story, 1976). Препараты мицелиальных грибов содержат меньше нуклеиновых кислот – 1,6–2,5%, поэтому они более безвредны. Они имеют и некоторые другие преимущества: у них приятный запах, их аминокислотный состав близок к мясному белку, клеточная стенка тонка, легко перевариваемая (Межиня и др., 1982). Кроме того, мицелиальным грибам свойственна мощная ферментативная система, включающая многие гидролитические ферменты. Так продуцент аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D обладает и значительной глюкоамилазной и протеолитической активностью. Результаты опытов по культивированию *P. lanoso-viride* 8D на отходных продуктах сельского хозяйства, как видно из табл. 28, показывают, что полученный препарат гриба содержит аденилатдезаминазную активность 13–160 МЕ/г, глюкоамилазную – 20–50 МЕ/г и протеолитическую – 0,02–0,10 МЕ/г. Важное значение имеет и то,

Таблица 28

Характеристика комплексной кормовой добавки,  
полученной культивированием *P. lanoso-viride* 8D  
на питательных средах различного состава

Характеристика кормовой добавки	Среды выращивания <i>P. lanoso-viride</i> 8D		
	№ 13	№ 14	№ 15
Содержание белка:			
а) в % от сухой массы;	27	22	17
б) в % по сравнению с исходным	310	131	240
Влажность	10%	10%	10%
Аденилатдезаминазная активность	160 ME/г	13 ME/г	68 ME/г
Глюкоамилазная активность	50 ME/г	20 ME/г	40 ME/г
Протеолитическая активность	0,10 ME/г	0,02 ME/г	0,04 ME/г

что происходит обогащение растительных продуктов белками. При выращивании продуцента на среде № 13 (60% коричневого сока люцерны и 40% отрубей) полученный препарат содержит 27% белка. В 1,3–2,4 раза обогащается белками также и зеленый сок люцерны, сенная мука и солома (среды № 14 и 15).

Описанные препараты *P. lanoso-viride* 8D рекомендованы для применения в животноводстве в качестве комплексных кормовых добавок (заявка на получение авт. свид. СССР № 3366045/15, полож. решение от 10.12.81). В испытаниях, которые проведены в Институте биологии АН Латв.ССР, получены положительные результаты по их скармливанию цыплятам. Установлено, что добавка в рацион с низким содержанием протеина (15,5%) 5% белка в составе

кормовой добавки увеличивает живую массу цыплят на 26,0%.

Отрицательное влияние препарата на биохимические показатели тканей организма отсутствует. Кормовая добавка отличается высокой усвояемостью, нежной консистенцией и приятным ароматом, и, поскольку она содержит высокую аденилатдезаминазную активность, ее особенно ценно применять в комплексе с сырьем, содержащим повышенное количество нуклеиновых кислот, особенно адениловых соединений, например, с биомассой дрожжей и бактерий.

С целью обогащения белком и гидролитическими ферментами целлюлозосодержащие субстраты и учитывая то, что *P. lanoso-viride* 8D не обладает заметной целлюлазной активностью, были предприняты попытки его культивирования совместно с продуцентом целлюлаз *Trichoderma viride* LA-531. *P. lanoso-viride* 8D использует в своих биосинтетических процессах продукты деградации целлюлозы, продуцируемые *T. viride* LA-531. Ассоциации культур микроорганизмов очень перспективны для рационального использования сложных субстратов (Межиня и др., 1982).

Питательную среду сначала засеивали посевным материалом *T. viride* LA-531 и после 6–24 часов – продуцентом гидролаз и белка *P. lanoso-viride* 8D. Для стимуляции роста *P. lanoso-viride* 8D и получения более богатого белком препарата к соломе добавляли пшеничные отруби в количестве 10–75%. Во время культивирования микроорганизмов (на 24–48 часу с момента начала процесса) проводили подкармливание источником азота (в виде сернохлорного аммония) в количестве 0,5–1,5%. Высушенный готовый препарат (влажность до 10%) содержит 14–30% белка, т.е., в 2,4–2,7 раза больше исходного (табл. 29), ферменты – аденилатдезаминазу, глюкоамилазу, целлюлазу и протеазу и другие компоненты биомассы микроорганизмов. В дальнейшем препарат можно

Таблица 29

Обогащение белками целлюлозосодержащих субстратов  
путем совместного культивирования *Trichoderma viride* IA-531  
и *Penicillium lanoso-viride* 8D

№ среды	Время культивирования (в сутках)	Содержание белка в продукте	
		в % от сухой массы	в % по сравнению с исходным
I6	5	13,7	269
I7	6	17,5	259
I8	4	24,7	260
I9	5	29,5	241

использовать в качестве добавки к комбикорму для животных и птиц; в качестве источника белка и биологически активных веществ. Комплексная кормовая добавка успешно прошла биологические лабораторные испытания в Институте биологии АН Латв.ССР, где установлено, что она улучшает усвояемость кормов с уменьшением их расхода на единицу привеса на 8-18%. Таким образом возможна замена до 15% полноценного рациона на комплексную кормовую добавку, что дает значительный эффект в экономии (заявка на получение авт. свид. СССР № 3241760/13, полож. решение от 11.02.82).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнем десятилетии значительно расширилось и углубилось изучение дезаминаз производных аденина. Однако в связи с перспективами применения препаратов дезаминаз в медицине появилась необходимость в исчерпывающих исследованиях, охватывающих как физико-химические, так и биологические свойства ферментов. В данной диссертационной работе исследована аденилатдезаминаза из микроскопического гриба *Penicillium lanoso-viride* 8D - высокоактивного продуцента этого фермента.

Изучены условия культивирования *P. lanoso-viride* 8D и выяснено, что культура обладает аденилатдезаминазной активностью в фазах конидиеобразования и конидионошения, которые характерны для ее развития на плотных питательных средах. Наиболее высокая аденилатдезаминазная активность (50 ME на г сырой биомассы) наблюдается при культивировании продуцента в течение 3-4 суток на среде, содержащей увлажненные отруби пшеницы (табл. 6). Аденилатдезаминазная активность присутствует в конидиях и в гифах, начиная с середины фазы экспоненциального роста культуры, что примерно соответствует началу конидиеобразования. Результаты опытов с добавлением в среду культивирования различных пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве единственных или дополнительных источников питания показывают, что уменьшение скорости роста, вызванное недостатком доступных источников азотного питания, сопровождается повышенным удельным весом аденилатдезаминазной активности в биомассе (рис. 9).

Из биомассы *P. lanoso-viride* 8D выделена и в 6 этапном процессе очистки (табл. 10) получена в 1317 раз очищенная аденилатдезаминаза с удельной активностью 790 ME/мг белка. Разработаны 3 способа очистки фермента, рекомендованные для внедрения в производство. В 12-18 раз очищенные ферментные препараты получают в ускоренном, 2-х этапном процессе очистки, включающим обработку суспензии клеток гриба активированным углем и хроматографию на анионообменных смолах ЭДЭ-10П или ДЭАЭ-целлюлозе (табл. 11). Применение анионообменных материалов на основе макропористого кремнезема (аминосилохромов и аминосиликагеля) позволяет прямо из экстракта гриба получить в 11-83 раз (в зависимости от типа использованного носителя и колоночного или объемного приема очистки) очищенную аденилатдезаминазу. Примерно такая же степень очистки достигается с применением термо- или термокислотной обработки экстракта в присутствии глицина в качестве стабилизатора и фракционированием белков видами полиэтиленгликоля с молекулярными массами 1500 и 3000 и 2-метилпентандиолом-2,4 (табл. 13).

Изучены некоторые каталитические свойства очищенной аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D. Выяснено, что фермент является относительно низко специфичным - с различной скоростью дезаминирует как адениловые нуклеотиды, так и нуклеозиды, как рибозо-, так и дезоксирибозопроизводные аденина, а также НАД, НАДФ и 2',3'-цАМФ (табл. 15). Определены некоторые кинетические константы дезаминазной реакции (табл. 16). Выявлены катионы - ингибиторы аденилатдезаминазы (табл. 18). Найдены оптимальные условия для ее каталитического действия - 0,05-0,10 М калий-фосфатный буфер, pH 6,0, 0,04-0,10 М NaCl, температура  $37 \pm 3$  °C. Изучены условия термоинактивации очищенной аденилатдезаминазы (табл. 19, рис. 16, 17).

Установленная гельфильтрацией на С1-сефарозе 4В и электрофорезом в полиакриламидном геле молекулярная масса аденилатдезаминазы равна 210 тыс. дальтон. Предполагается, что фермент является гликопротеидом и что около 22% его массы составляют углеводы.

Разработан и рекомендован для внедрения в производство способ получения производных гипоксантина путем микробиологического дезаминирования производных аденина цельными клетками *P. lanoso-viride* 8D. Выход целевых продуктов составляет 95-100%.

Используя препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, впервые проведены опыты по выявлению биологической активности дезаминаз производных аденина микроорганизмов по отношению к высшим организмам и культурам их клеток. Установлено, что аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D стимулирует включение <sup>3</sup>H-тимидина в высокомолекулярные соединения клеток культур человеческих лейкоцитов и бласттрансформацию лимфоцитов. 1,5-2,7 МЕ/мл фермента на 45-55% усиливает синтез ДНК в лимфоцитах. При концентрациях, равных или превышающих 1,9 МЕ/мл, аденилатдезаминаза агглютинирует эритроциты.

В опытах *in vitro* изучено влияние препарата аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D на синтез нуклеиновых кислот в культурах клеток асцитной карциномы Эрлиха и асцитных лимфолейкозов L 5178Y, L1210 и P 388, перевиваемых у мышей. Фермент существенно ( $\alpha = 0,05$ ) понижает включение предшественника нуклеиновых кислот <sup>14</sup>C-урацила в высокомолекулярные соединения асцитных клеток Эрлиха и лимфолейкоза L 5178Y, но не влияет на включение меченого урацила в кислотонерастворимую фракцию клеток L 1210 и P 388. Дозы фермента 0,5-2,0 МЕ/мл снижают уровень синтеза нуклеиновых кислот в клетках карциномы Эрлиха на 16-27%

и дозы 0,5–1,0 МЕ/мл в клетках L 5178Y – на 40–46% по сравнению с контролем. Опыты *in vivo*, проведенные с гибридными мышами BDF-1 с лимфолейкозом L 5178Y, показывают, что высокие дозы аденилатдезаминазы продлевают жизнь экспериментальных животных по сравнению с контролем (табл. 27). Так 5-кратное введение препарата по 50 МЕ/кг массы животного увеличивает среднюю продолжительность жизни мышей на 58,2%. Более высокие дозы (больше 200 МЕ/кг) ускоряют гибель животных с лимфолейкозом.

Разработаны два способа получения комплексных кормовых добавок, богатых аденилатдезаминазой, рекомендованных для получения кормов для сельскохозяйственных животных и птиц. Добавки представляют собой биомассу *P. lanoso-viride* 8D, содержащую 12–29% белка от сухой массы и обладающую активностями ряда гидролитических ферментов – аденилатдезаминазы, глюкоамилазы и протеазы (табл. 28). Кормовую добавку получают культивированием *P. lanoso-viride* 8D поверхностным способом на отходных продуктах сельского хозяйства – коричневом и зеленом соке люцерны, сенной муке, соломе, отрубях – с последующим высушиванием продукта до влажности 10%. В процессе роста продуцента отходные продукты обогащаются белками в 2–3 раза. Обогащенную белками и гидролитическими ферментами кормовую добавку получают также на целлюлозосодержащих субстратах при совместном культивировании *P. lanoso-viride* 8D с продуцентом целлюлаз *Trichoderma viride* LA-531, который расщепляет целлюлозу до соединений, используемых *P. lanoso-viride* 8D в качестве питательных веществ. Описанные кормовые добавки рекомендуются добавлять к комбикорму для животных и птиц в качестве источника белка и биологически активных веществ.

Результаты исследований показывают, что производство аденилатдезаминазы, продуцируемой *P. lanoso-viride* 8D, не представляет особых трудностей, а фермент является перспективным для применения в медицине и сельском хозяйстве.

## ВЫВОДЫ

1. Изучены закономерности накопления аденилатдезаминазной активности у *P. lanoso-viride* 8D и выяснено, что аденилатдезаминаза присутствует в конидиях и гифах во время конидиеобразования и конидионошения культуры.
2. Изучено влияние экзогенных пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве единственных или дополнительных источников питания на уровень аденилатдезаминазной активности *P. lanoso-viride* 8D. Показано, что недостаток доступных источников азотного питания в среде культивирования сопровождается повышенным удельным весом аденилатдезаминазы в биомассе.
3. Разработаны 4 схемы очистки аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D, отличающиеся друг от друга по применяемым методам, численностью этапов работы, выходом активности и степенью очистки фермента, а также по времени, которое занимает проведение очистки.
4. Изучены некоторые каталитические и физико-химические свойства очищенной аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* 8D с удельной активностью 790 ME на мг белка. Установлена субстратная специфичность, молекулярная масса, глюкопротеидная природа фермента, некоторые кинетические константы, выявлены катионы-ингибиторы и условия термоинактивации, найдены оптимальные условия каталитического действия.

5. Разработан способ получения производных гипоксантина путем микробиологического дезаминирования производных аденина интактными клетками *P. lanoso-viride* 8D.
6. Впервые проведены опыты по выявлению биологической активности дезаминаз производных аденина микроорганизмов по отношению к высшим организмам и культурам их клеток. Установлено, что аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* 8D стимулирует бласттрансформацию человеческих лимфоцитов *in vitro* и обладает гемагглютинирующей активностью. Препарат аденилатдезаминазы в определенных дозах снижает уровень синтеза нуклеиновых кислот в клетках некоторых асцитных опухолей мышей *in vitro* и продлевает среднюю продолжительность жизни экспериментальных животных *in vivo*.
7. Разработаны два способа получения комплексных кормовых добавок путем микробиологического обогащения отходов растительных продуктов сельского хозяйства белками и гидролитическими ферментами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. с. 207907 (СССР). Способ получения солей инозин-5'-трифосфорной кислоты / Вайдерс Л.Л., Гайлума М.А., Лидака И.Е., Аузукалне В.В. - Оpubл. в Б.И., 1968, № 3.
2. А. с. 764385 (СССР). Способ получения производных гипоксантина / И.О.Муйжнискс, В.Р.Ревелиня, А.Б.Шафранский, Х.А.Мауриня.
3. А. с. 782392 (СССР). *Penicillium lanoso-viride* 8D - продуцент аденилатдезаминазы / И.О.Муйжнискс, В.Р.Ревелиня, А.Б.Шафранский.
4. Акопян Ж.И. АМФ-аминогидролазы. - Биол. ж. Арм., 1977, т. 30, № 10, с. 49-61.
5. Акопян Ж.И., Горкин В.З. Современные достижения в изучении природы аденилатдезаминаз. - Усп. совр. биол., 1973, т. 76, вып. I (4), с. 54-67.
6. Арутюнян А.В., Ловенштейн Д.М. Кинетические исследования изоферментов АМФ-дезаминазы мозга крыс. - Вопр. биохим. мозга, 1977, № 12, с. 29-40.
7. Арутюнян А.В., Нерсисян Ц.М. Об отличии ферментативных механизмов дезаминирования адениловой кислоты и аденозиндифосфата в мозговой ткани. - Вопр. биохим. мозга, 1970, № 6, с. 39-43.
8. Астапович Н.И. Нуклеотидный фонд и метаболизм микробной клетки. - Минск: Наука и техника, 1979. - 148 с.
9. Бем Э. Двойная радиальная иммунодиффузия по Ухтерлони. - В кн.: Иммунологические методы. М., 1979, с. 31-37.
10. Бенниг Г.П. Методы исследования бактериальных нуклеаз. - В кн.: Бактериальные нуклеазы: Уч. записки КГУ. - Казань, 1964, т. 124, кн. I, с. 17-32.
11. Билай В.И. Основы общей микологии. - Киев: Вища школа, 1974. - 394 с.
12. Брновицкая З.С., Горетов В.П. Высаливание белков серноокислым аммонием при низких температурах. Таблица и номограмма.

- Прикл. биохим. и микробиол., 1967, т. 3, вып. 6, с. 707-710.

13. Бунятян Г.Х. Нуклеотиды, белки, пептиды, аминокислоты, трансмиттеры, биохимия старческого слабоумия по материалам VI Международного собрания международного общества по нейрохимии (Копенгаген, 21-26 авг., 1977 г.). - *Вопр. биохим. мозга*, 1977, № 12, с. 191-208.
14. Вилкс С.Р. Использование и расщепление природных производных пурина и пиримидина дрожжами. - *Дисс. ... канд. биол. наук.* - Рига, 1972. - 178 с.
15. Вилкс С.Р., Вульф Л.Я., Нейберга Э.Р. Исследование *Flavobacterium breve* (Lusting) Bergey et al. как продуцента аденозиндезаминазы (E.C.3.5.4.4.). - В кн.: VI съезд Всесоюзного микробиол. общества: Тез. докл. Рига, 1980, т. 4, с. 24.
16. Вульфа Л.Я., Вилкс С.Р., Романова Н.А. Дезаминирование аденозина культурами ризосферных микроорганизмов. - В кн.: *Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами: Уч. записки ЛГУ им. П.Стучки.* - Рига, 1981, с. 70-73.
17. Вылож. заявка 50-52273 (Япония). Производство аденилатдезаминазы мицелиальными грибами / Т.Фушима, К.Яманойо, К.Ухида, Х.Иохино. - *Опубл. в СА*, 1975, т. 83, P145781 d.
18. Вылож. заявка 50-88283 (Япония). Получение ферментов / Т.Фушима, К.Ухида, Х.Иохино. - *Опубл. в СА*, 1976, т. 84, P42013 w.
19. Вылож. заявка 52-87293 (Япония). Имобилизованный ферментный препарат / К.Муцугава, Т.Фушима, А.Кунинака, Х.Иохино. - *Опубл. в СА*, 1977, т. 87, P 179916 z.
20. Вылож. заявка 53-34796 (Япония). Изокоформидин / Х.Омесава, Т.Такеуши, С.Кондо, Х.Шимазаки. - *Опубл. в СА*, 1978, т. 89, 75438 v.
21. Вылож. заявка 53-88391 (Япония). Использование спор из плесеней в ферментных реакциях / А.Кунинака, Х.Иосино. - *Опубл. в СА*, 1979, т. 90, P 2447 h.

22. Вылож. заявка 54-20192 (Япония). Имобилизованная АМФ-дезаминаза / С.Шузуки, И.Каруб, К.Хирано. - Оpubл. в СА, 1979, т. 91, Р 1944 в.
23. Вылож. заявка 55-120788 (Япония). Аденилатдезаминаза. - Оpubл. в СА, 1981, т. 94, Р 63784.
24. Вылож. заявка 55-160794 (Япония). N<sup>6</sup>-замещенные производные кордицепина - ингибиторы аденилатдезаминазы. - Оpubл. в СА, 1981, т. 95, Р 7703 в.
25. Вылож. заявка 55-160796 (Япония). N<sup>1</sup>-метилкордицепин, обладающий активностью ингибирования аденозиндезаминазы. - Оpubл. в СА, 1981, т. 95, Р II5943 р.
26. Гнеушев Е.П., Наумова В.В., Богословский В.А. Клиренс и превращения инозина в организме. - Фармакол. и токсикол., 1978, № 6, с. 714-719.
27. Голубева Н.Н. Метод определения лимфоцитстимулирующей активности фитогемагглютинаина. - В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 257-262.
28. Грибанов В.А. Превращение экзогенных пуриновых оснований дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*.: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. - Рига, 1974. - 28 с.
29. Дунцис М.Э., Витол М.Я. Трансформация производных пурина анаэробными микроорганизмами рода *Clostridium*. - В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами: Уч. записки ЛГУ им. П.Стучки. - Рига, 1972, т. 145, с. 49-59.
30. Жагат Р.А., Шилов Ю.В., Эйдусе И.А. и др. Аденозиндезаминазная активность бесклеточного экстракта *Flavobacterium breve*. - Прикл. биохим. и микробиол., 1981, т. 17, № 5, с. 708-711.
31. Иванов С.В. Аденилатдезаминаза и 5'-нуклеотидаза в сарком на Rous при пиле. - Обща и сравнит. патол., 1977, № 4, с. 94-97.
32. Иммунология. Т 8. Патология иммунной системы / Под общ. ред. Р.В.Петрова - М.: ВИНТИ, 1979. - 236 с.

33. Иммунохимический анализ / Под общ. ред. Л.А.Зильбера - М.: Медицина, 1968. - 300 с.
34. Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. - М.: Наука, 1977. - 286 с.
35. Карманский И.М. Выделение фитогемагглютинаина из семян фасоли. - В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1977, с. 254-257.
36. Киносита С. Микробиологическая промышленность Японии. - Микробиол. синтез, 1968, № 2, с. 27-30.
37. Кирштейне Б.Э., Львов Н.П., Любимов В.И., Кретович В.Л. Деаминарование аденина и некоторых его производных бесклеточными экстрактами из *Azotobacter vinelandii*. - Докл. АН СССР, 1968, т. 181, № 3, с. 741-743.
38. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. - М.: Мир, 1979. - 280 с.
39. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1980. - 271 с.
40. Курский М.Д., Нечипоренко З.Ю., Тугай В.А., Пискарев В.Б. Освобождение ионов кальция из фрагментированного саркоплазматического ретикулума при деаминаровании АМР. - Биохимия, 1979, т. 44, № 10, с. 1877-1883.
41. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.М.Грачева, Ю.П.Грачев, М.С.Мосичев и др. - М.: Легкая и пищевая пром., 1982. - 238 с.
42. Литвинов М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. - Ленинград: Наука, 1969. - 121 с.
43. Лория Ш.К., Амосова Н.В., Егоров Н.С. О зависимости между спорообразованием и синтезом протеолитических ферментов. - Научные докл. высшей школы, биол. науки, 1976, № 4, с. 13-28.
44. Максименко О.А., Зюкова Л.А., Федорович Р.М. Определение общего количества углеводов в сухих дрожжах. - Прикл. биохим. и микробиол., 1975, т. 11, № 1, с. 127-130.

45. Максимова Л.Ф. Свойства частично очищенной АТФ-дезаминазы *Actinomyces* № 4 strain antibioticus. - *Вопр. мед. химии*, 1975, т. 21, вып. 3, с. 239-242.
46. Максимова Л.Ф., Дебов С.С., Реброва Т.Т. Выделение, частичная очистка и изучение некоторых свойств АТФ-дезаминазы. - *Вопр. мед. химии*, 1974, т. 20, вып. 1, с. 86-89.
47. Маурер Г.Р. Диск-электрофорез. - М.: Мир, 1971. - 247 с.
48. Межиня Г.Р., Кристалсонс М.Ж., Калныня Д.Э. Биотехнология белковых препаратов для кормопроизводства: Обзорная информация. Сер. 1У. - М.: ОНТИТЭИ микробиопром, 1982, 40 с.
49. Метакровский Е.В. О механизме межклеточных контактов и изменении мембраны клеток при дифференцировке. - *Мол. биол.*, 1981, т. 15, № 4, с. 753-767.
50. Мецлер Д. Биохимия. - М.: Мир, 1980, т. 1, 407 с.
51. Муйжниец И.О. Трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений почвенными микроорганизмами по параллельным путям метаболизма.: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. - М., 1980. - 14 с.
52. Наградова Н.К., Гроздова И.Д. Применение иммунохимических методов в энзимологии. - *Биохимия*, 1977, т. 42, № 7, с. 1155-1166.
53. Нечипоренко З.Ю., Тугай В.А., Пискарев В.В. Возможная роль дезаминарования АМФ в процессе освобождения  $Ca^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума. - В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности. М., 1980, с. 289-291.
54. Ниязян Р.М., Арутюнян А.В. К вопросу об АМФ-дезаминазной активности нейростенина. - *Вопр. биохим. мозга*, 1980, № 14, с. 121-126.
55. Обгольц А.А. Микроорганизмы и иммунная система. - *Ж. мед., эпидемиол., иммунол.*, 1980, № 2, с. 9-14.
56. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 1981. - 285 с.

57. Пат. 43-11759 (Япония). Получение инозина и 5'-инозиловой кислоты с помощью *Microsporium audouinii* / И.Асажи, Х.Аида, Т.Яги. - Оpubл. в СА, 1969, т. 70, Р 2451 в.
58. Пат. 43-24478 (Япония). Получение 5'-инозиловой кислоты или инозина с помощью *Penicillium* / Х.Иохино, Т.Фушима. - Оpubл. в СА, 1969, т. 70, Р 86271 а.
59. Пат. 46-20038 (Япония). Микробиологическое превращение адениловой кислоты в инозиловую / Т.Фушима. - Оpubл. в СА, 1971, т. 75, Р 74916 у.
60. Пат. 47-04511 (Япония). Получение инозиловой кислоты или инозина путем ферментативного дезаминирования / Т.Фушима, Х.Иохино. - Оpubл. в СА, 1972, т. 76, Р 139050 а.
61. Пат. 50-22115 (Япония). Получение 5'-инозиловой кислоты от 5'-адениловой кислоты с применением фермента *Aspergillus* / Т.Сугимори, Х.Таки. - Оpubл. в СА, 1976, т. 84, Р 87979 г.
62. Пат. 52-31032 (Япония). Получение ферментов / Т.Фушима, К.Ухида, Х.Иохино. - Оpubл. в СА, 1976, т. 84, Р 42012 в.
63. Пат. 52-31948 (Япония). Получение ферментов / Т.Фушима, К.Ухида, Х.Иохино. - Оpubл. в СА, 1976, т. 84, Р 42011 и.
64. Пат. 2 928 773 (США). Способ получения инозина / В.Клейн. - Оpubл. в СА, 1961, т. 54, Р 18896 с.
65. Пеккаль В.А. Аденилатдезаминазы тканей животных. - Усп. совр. биол., 1980, т. 89, № 3, с. 377-393.
66. Пеккаль В.А., Киркель А.З. Аллостерическая модификация аденилатдезаминазы: появление аденозиндезаминазной активности под воздействием ионов калия. - Бюлл. эксп. биол. мед., 1978, т. 86, № 11, с. 535-537.
67. Пеккаль В.А., Киркель А.З. Очистка и некоторые физико-химические свойства аденилатдезаминазы миокарда. - Биохимия, 1979, т. 44, № 9, с. 1663-1671.

68. Попова Т.А., Романов С.Л., Безбородов А.М. Дегградация нуклеотидов грибом *Penicillium pizowii*. - В кн.: Экология и физиолого-биохимические основы микробиологического превращения азота: Мат. конф. Тарту, 1972, с. 322-326.
69. Рацино Е.В., Соколов Л.В. Инозин, свойства и химическая модификация. - Хим.-фармацевт. ж., 1978, т. 12, № 10, с. 38-49.
70. Селга С.Э., Дзелкалейс Я.Я., Давиде В.Э. Установка для фракционирования зеленой массы растений. - В кн.: Биоконверсия растительного сырья: Тез. докл. Всесоюзного симп. Рига, 1982, т. 2, с. 259-260.
71. Симхович Б.З., Лидак М.Ю., Гилев А.П. Роль циклического аденозин-3,5-монофосфата в возникновении и развитии опухолей. - Хим.-фармацевт. ж., 1978, т. 12, № 6, с. 17-31.
72. Скрыбин Г.К., Головлева Л.А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. - М.: Наука, 1976. - 336 с.
73. Соковнина Я.М., Гусева М.К., Аникейчева Н.В. Некоторые свойства аденинаминогидролазы из *E. coli*. - Булл. экп. биол. мед., 1981, т. 92, № 8, с. 42-44.
74. Соковнина Я.М., Дебов С.С., Яковлева Л.А., Цхакая Н.А. Аденаза тромбоцитов крови здоровых обезьян и обезьян с разной выраженностью гемобластоза. - Булл. экп. биол. мед., 1977, т. 84, № 11, с. 553-556.
75. Сторк Р. Молекулярная микология. - В кн.: Молекулярная микробиология. М., 1977, с. 454-507.
76. Ткачук В.А. Третий Всесоюзный симпозиум по циклическим нуклеотидам. - Биохимия, 1981, т. 46, № 4, с. 761-765.
77. Фетисова Т.В., Соколова Г.Г. Обмен аденозина в сердце при экспериментальном инфаркте миокарда. - Кардиол., 1979, т. 19, № 1, с. 98-102.
78. Хиеон С.Б. Вещества, связанные со спорообразованием у грибов. - Качаку, 1977, т. 32, № 7, с. 554-561. Цит. по: РЖ, Биол. химия, 1978, 4 X 171.

79. Хомченковский Е.И. Экспериментальная химиотерапия лейкозов. - М.: Медицина, 1980. - 240 с.
80. Циклические нуклеотиды / Под общ. ред. С.Е.Северина. - М.: Наука, 1979. - 138 с.
81. Четверикова Е.П. Свойства и регуляция глобулярных ферментов, связанных с мышечным сокращением (миокиназа, креатинкиназа, АМФ-дезаминаза). - Усп. биол. химии, 1975, т. 16, с. 43-67.
82. Шилов Ю.И. Аденозиндезаминаза из *Flavobacterium* sp. - В кн.: Синтез и исследование биологически активных соединений: Тез. докл. 6-й конф. молодых ученых. Рига, 1978, с. 61.
83. Шпрунка И.К. Аденозиндезаминаза (E.C.3.5.4.4) микроорганизмов. - В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами: Уч. записки ЛГУ им. П.Стучки. - Рига, 1978, с. 64-77.
84. Abbondandolo A., Weyer A., Meslot H., Lambert M. Adenine aminohydrolase in the yeasts, *Schizosaccharomyces pombe*. - J. Bacteriol., 1971, v. 108, N 3, p. 959-963.
85. Adams A., Harkness R.A., McVie J.G. Adenosine deaminase activity in erythrocytes, lymphocytes, polymorphonuclear neutrophil leukocytes and cultured cells: a possible role in the immune response. - J. Inherited Metab. Dis., 1978, v. 1, N 1, p. 43-45.
86. Agarwal R.P. Recovery of 2'-deoxycoformycin-inhibited adenosine deaminase of mouse erythrocytes and leukemia L 1210 in vivo. - Cancer Res., 1979, v. 39, N 4, p. 1425-1427.
87. Agarwal R.P. In vivo inhibition of adenosine deaminase by 2'-deoxycoformycin in mouse blood and leukemia L 1210 cells. - Biochem. Pharmacol., 1980, v. 29, N 2, p. 187-193.
88. Aida K., Chung S., Suzuki I., Yagi T. On the purification and some properties of 5'-adenylic acid-deaminating enzyme from *Microsporium audouini*. - Agr. Biol. Chem., 1965, v. 29, N 6, p. 508-514.

89. Alexander M., Wilson P.W. Enzyme localization in *Azotobacter vinelandii*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1955, v. 41, N 11, p. 843-848.
90. Allan A.M., Elzainy T.A. Utilization and deamination of adenine by *Penicillium chrysogenum*. - J. Chem. UAR, 1970, v. 13, N 2, p. 253-257.
91. Arch J.R.S., Newsholme E.A. Activity and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. - Biochem. J., 1978, v. 174, N 3, p. 965-977.
92. Arora K.L., Iyer S.N., Murti C.R.K. Effect of sodium chloride on adenosine deaminase, serine deaminase and tryptophanase of *Vibrio cholerae*. - Enzymologia, 1956, v. 17, N 5/6, p. 333-337.
93. Ashby B., Holmsen H. Platelet AMP deaminase. Purification and kinetic studies. - J. Biol. Chem., 1981, v. 256, N 20, p. 10519-10523.
94. Atkinson D.E. The adenylate energy charge in metabolic regulation. - In: Horizons of bioenergetics. N.Y., 1972, p. 83-96.
95. Baker D.C., Putt S.R. A total synthesis of pentostatin, the potent inhibitor of adenosine deaminase. - J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, N 20, p. 6127-6128.
96. Bauer R.J., Carlberg D.M. Adenosine aminohydrolase from *Halobacterium cutirubrum*. - Can. J. Biochem., 1973, v. 51, N 5, p. 621-626.
97. Berne K.M. Regulation of coronary blood flow. - Physiol. Rev., 1964, v. 44, N 1, p. 7-9.
98. Bernlohr R.W., Gray B.H. Enzyme inactivation during initiation of sporulation. - In: Spores 1968. Bethesda, 1969, v. 4, p. 186-195.
99. Biochemicals catalogue 1982/83 / Boehringer Mannheim GmbH - Munich, 1981. - 229 p.

100. Blakley R.L., Vitols E. The control of nucleotide biosynthesis. - Annual Res. Biochem., 1968, v. 37, N 1, p. 201-224.
101. Brady T.G., O'Connell W. A purification of adenosine deaminase from the superficial mucosa of calf intestine. - Biochim. Biophys. Acta, 1962, v. 62, N 2, p. 216-229.
102. Braun J., Rosen F.S., Unanue E.R. Capping and adenosine metabolism. Genetic and pharmacologic studies. - J. Exp. Med., 1980, v. 151, N 1, p. 174-183.
103. Brawerman G., Chargaff E. On a deoxyribonuclease from germinating barley. - J. Biol. Chem., 1954, v. 210, N 1, p. 445-454.
104. Bremer H., Bauer I., Brock J., Kleist H. Adenosindeaminase in stimulated and nonstimulated lymphocytes. - In: On cell function and differentiation: Abstr. Special FEBS Meeting. Athens - Greece, 1982, p. 148.
105. Brown E.G., Goodwin T.W., Jones O.T.G. Biosynthesis of riboflavine. 4. Purine metabolism and riboflavine synthesis in *Eromethecium ashbyii*. - Biochem. J., 1958, v. 68, N 1, p. 40-49.
106. Bruce M.C., Suhadolnik R.J. Adenosine aminohydrolase. - J. Biol. Chem., 1967, v. 242, N 16, p. 3655-3658.
107. Burger R., Lowenstein J.M. Adenylate deaminase. III. Regulation of deamination pathways in extracts of rat heart and lung. - J. Biol. Chem., 1967, v. 242, N 22, p. 5281-5288.
108. Burrige P.W., Paetkau E.A. Studies of the relationship between adenosine deaminase and immune function. - J. Immunol., 1977, v. 119, N 2, p. 675-678.
109. Caffee C.J. AMP deaminase from rat skeletal muscle. - In: Methods in enzymologic. Purine and pirimidine metabolism. N.-Y., 1978, v. 51, p. 490-496.
110. Carson D.A., Seegmiller J.E. Effect of adenosine deaminase inhibition upon human lymphocyte blastogenesis. - J. Clin. Invest., 1976, v. 57, N 2, p. 274-282.

111. Chan T.S., Purine excretion by mouse peritoneal macrophages lacking adenosine deaminase activity. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, N 2, p. 925-929.
112. Chapman A.G., Atkinson D.E. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. - J. Biol. Chem., 1973, v. 248, N 23, p. 8309-8312.
113. Chapman A.G., Miller A.L., Atkinson D.E. Role of adenylate deaminase reactions in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. - Cancer Res., 1976, v. 36, N 3, p. 1144-1150.
114. Chechik B.E., Rao J., Greaves M.F., Hoffbrand A.V. Human thymus/leukemia-associated antigen (a low-molecular weight form of adenosine deaminase) and the phenotype of leukemic cells. - Leuk. Res., 1980, v. 4, N 4, p. 343-349.
115. Chen S.H., Ochs H.D., Scott C.R., Giblett E.R. Adenosine deaminase and nucleoside phosphorylase activity in patients with immunodeficiency syndromes. - Clin. Immunol. Immunopathol., 1979, v. 13, N 2, p. 156-160.
116. Chung S.T., Aida K. Purification and properties of ATP deaminase from *Microsporium audouini*. - J. Biochem., 1967, v. 61, N 1, p. 1-9.
117. Chung S.T., Aida K., Uemura T. Studies on ATP deaminase. IV. Distribution of ATP deaminase, and the purification and properties of acid-type ADP deaminating enzyme. - J. Gen. Appl. Microbiol., 1967, v. 13, N 4, p. 335-347.
118. Chung S.T., Hamano M., Aida K., Uemura T. ATP deaminase. III. Water-insoluble ATP deaminase. - Agr. Biol. Chem., 1968, v. 32, N 10, p. 1287-1291.
119. Clifford A.J., Story D.L. Levels of purines in foods and their metabolic effects in rats. - J. Nutr., 1976, v. 106, N 3, p. 435-442.
120. Cohen A., Hirschhorn R., Horowitz S.D. et al. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, N 1, p. 472-476.

121. Daddona P.E. Human adenosine deaminase: properties and turnover in cultured T and B lymphoblasts. - *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, N 23, p. 12496-12501.
122. Daddona P.E., Kelley W.N. Analysis of normal and mutant forms of human adenosine deaminase - a review. - *Mol. Cell. Biochem.*, 1980, v. 29, N 2, p. 91-101.
123. Davis F.F., Abuchowski A., Van Es T. et al. Soluble, non-antigenic polyethylene glycol-bound enzymes. - *Polym. Prepr.*, 1979, v. 20, N 1, p. 357-360.
124. Davuluri S.P., Hird F.J.R., Sanley I.J. On the significance of adenylic acid aminohydrolase in skeletal muscle of vertebrates. - *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1981, v. 68B, N 3, p. 369-375.
125. Dawson J.D., Sauer L.A. The effect of different incubation temperatures on the adenine nucleotide content of Ehrlich-Lette ascites tumor cells. - *Cancer Res.*, 1970, v. 30, N 7, p. 1918-1921.
126. Deutsch A., Nilsson R. Deamination of adenosine diphosphate by actomyosin. - *Soc. Chem. Ind.*, 1953, N 7, p. 1288.
127. Deutsch A., Nilsson R. Dephosphorylation and deamination of adenosinetriphosphate by actomyosin gel. - *Acta Chem. Scand.*, 1954, N 8, p. 1898-1906.
128. Diezel W., Kopperschlaeger G., Hofmann E. Improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. - *Anal. Biochem.*, 1972, v. 48, N 2, p. 617-620.
129. Dissing J., Knudsen B. Adenosine-deaminase deficiency and combined immunodeficiency syndrome. - *Lancet*, 1972, N 2, p. 1316.
130. Donofrio J., Coleman M.S., Hutton J.J. et al. Overproduction of adenine deoxynucleosides and deoxynucleotides in adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency disease. - *J. Clin. Invest.*, 1978, v. 62, N 4, p. 884-887.

131. Fain J.N., Wieser P.B. Effects of adenosine deaminase on cyclic adenosine monophosphate accumulation, lipolysis and glucose metabolism of fat cells. - *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, N 3, p. 1027-1037.
132. Felicioli R.A., Senesi S., Falcone G. et al. Nucleoside phosphomonoesterase. Hypothesis on their physiological role in sporulating bacteria. - *Acta Vitaminol. Enzymol.*, 1973, v. 27, N 1-4, p. 23-28.
133. Fernandez B.M., Saggerson E.D. Alterations in response of rat white adipocytes to insulin, noradrenaline, corticotropin and glucagon after adrenalectomy. Correction of these changes by adenosine deaminase. - *Biochem. J.*, 1978, v. 174, N 1, p. 111-118.
134. Fishbein W.N., Armbrustmacher V.W., Griffin J.L. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. - *Science*, 1978, v. 200, N 4341, p. 545-548.
135. Fodor P.J., Tomashefsky P., Funk C. Enzyme levels in the growing and spontaneously regressing Flexner-Jobling carcinoma. III. The breakdown of ATP to inosine and its effect on glycolysis. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, v. 76, N 2, p. 245-254.
136. Folk R.M., Pierre R.L.S. Increased survival time of leukemia mice following treatment with phytohemagglutinin. - *Experientia*, 1971, v. 27, N 4, p. 444-446.
137. Formeister J.F., Trisch G.L., Mittleman A. Adenosine deaminase levels in construction workers with asbestos contact dermatitis. - *J. Med.*, 1978, v. 9, N 4, p. 285-290.
138. Franke W., Hahn G.E. Bacterial degradation of purines. II. Degradation of amino-hydroxy- and methylpurines by *Pseudomonas aeruginosa*. - *J. Physiol. Chem.*, 1955, v. 301, N 1, p. 90-106.
139. Fredholm B.B. Local regulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acids, prostaglandins and adenosine. - *Med. Biol.*, 1978, v. 56, N 5, p. 249-261.

140. Frieden C., Kurz L.C., Gilbert H.R. Adenosine deaminase and adenylylase deaminase: comparative kinetic studies with transition state and ground state analogue inhibitors. - *Biochemistry*, 1980, v. 19, N 23, p. 5303-5309.
141. Fujii M., Miwa S., Suzuki K. Purification and properties of adenosine deaminase in normal and hereditary hemolytic anemia with increased red cell activity. - *Hemoglobin*, 1980, v. 4, N 5-6, p. 693-705.
142. Fujishima T., Yoshino H. Adenylylase deaminase produced by molds. I. Screening of adenylylase deaminase-producing molds and properties of adenylylase deaminase and phosphatase produced by *Aspergillus melleus*. - *Hakko To Taisha*, 1967, N 16, p. 45-55. *Usp. no: CA*, 1968, v. 68, 102 042 m.
143. Gabrielle C.M.C., Tocchini V.G.A., Galtaneo G. Adenosine deaminase of mycobacteria. - *Ann. Inst. Carlo Forlanini*, 1962, v. 22, N 1, p. 28-37.
144. Giblett E.R. Immune cell function and recycling of purines. - *New Engl. J. Med.*, 1976, v. 295, N 24, p. 1375-1376.
145. Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F. et al. Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. - *Lancet*, 1972, N 2, p. 1067.
146. Glenn A.R., Coote J.G. Cytochemical studies on alkaline phosphatase production during sporulation in *Bacillus subtilis*. - *Biochem. J.*, 1975, v. 152, N 1, p. 85-89.
147. Green H., Chan T. Pyrimidine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase. - *Science*, 1973, v. 182, N 4114, p. 836-837.
148. Green H., Ishii K. On the existence of a guanine nucleotide trap, the role of adenosine kinase and a possible cause of excessive purine production in mammalian cells. - *J. Cell. Sci.*, 1972, v. 11, N 1, p. 173-177.
149. Guha S.R., Saxena R.P., Arora K.L. Mycobacterium tuberculosis adenosine deaminase activity. - *J. Sci. Ind. Res.*, 1962, v. 216, N 3, p. 66-69.

150. Guinand M., Michel G., Balassa G. Lytic enzymes in sporulating *Bacillus subtilis*. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 68, N 4, p. 1287-1293.
151. Haeckel R. Hepatic gluconeogenesis and urate formation from various nucleosides. - In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, v. 76A, p. 488-499.
152. Hall J.G. Adenosine deaminase activity in lymphoid cells during antibody production. - *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1963, v. 41, N 1, p. 93-97.
153. Hall J.G., Gyure L., Peppard J., Orlans E. Levels of adenosine deaminase in some experimental animal tumors and the possible therapeutic effect of the ADA inhibitor 2-deoxy-coformycin. - *Brit. J. Cancer*, 1979, v. 40, N 5, p. 751-755.
154. Harma M.M., Warglen G., Mulder A.H. Adenosine modulates depolarization induced release of <sup>3</sup>H-noradrenaline from slices of rat brain neocortex. - *Eur. J. Pharmacol.*, 1978, v. 49, N 3, p. 305-308.
155. Hartenstein R.C., Fridovich I. Adenine aminohydrolase. An investigation of specificity. - *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, N 4, p. 740-746.
156. Hartman S.C. Purines and pyrimidines. - In: *Metabolic Pathways*. N.Y.-L., 1970, v. 4, p. 1-68.
157. Hecker M. Niedermolekulare Regulatoren der bakteriellen Genexpression. - *Biol. Rdsch.*, 1978, v. 16, N 5, p. 315-316.
158. Heppel L.A., Hurwitz J., Horecker B.L. Adenine deaminase of *Azotobacter vinelandii*. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, v. 79, N 3, p. 630-633.
159. Hirose M., Tsuneo N., Masuhide M. Enzyme activities in purine metabolism. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis and adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase of leukocyte fractions. - *Nippon Shonika Gakkai Zasshi*, 1979, v. 83, N 8, p. 892-898. Цит. по: *CA*, 1979, v. 91, 208916 q.

160. Hirschhorn R., Roegner V., Jenkins T. et al. Erythrocyte adenosine deaminase deficiency without immunodeficiency. Evidence for an unstable mutant enzyme. - *J. Clin. Invest.*, 1979, v. 64, N 4, p. 1130-1139.
161. Hirschhorn R., Roegner-Maniscalco V., Kuritsky L., Rosen F.S. Bone marrow transplantation only partially restores purine metabolites to normal in adenosine deaminase-deficient patients. - *J. Clin. Invest.*, 1981, v. 68, N 6, p. 1387-1393.
162. Ho D.H.W., Pincus C., Carter C.Y., Benjamin R.S. Distribution and inhibition of adenosine deaminase in tissues of man, rat, and mouse. - *Cancer Treat. Rep.*, 1980, v. 64, N 4-5, p. 629-633.
163. Hochstadt-Ozer J., Stadtman E.R. Regulation of purine utilization in bacteria. III. Involvement of purine phosphoribosyltransferases in the uptake of adenine and other nucleic acid precursors by intact resting cells. - *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, N 17, p. 5312-5320.
164. Hoffmeyer J., Neuhaard J. Metabolism of exogenous purine bases and nucleosides by *Salmonella typhimurium*. - *J. Bacteriol.*, 1971, v. 106, N 1, p. 14-24.
165. Novi T., Smyth J.F., Allison A.C., Williams S.C. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. - *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, v. 23, N 3, p. 395-403.
166. Hutchison K.W., Hanson R.S. Adenine nucleotide changes associated with the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. - *J. Bacteriol.*, 1974, v. 119, N 1, p. 70-75.
167. Hyeon S.B., Suzuki A., Tamura S. Adenosine and related nucleotides as sporulation-inducing factors in *Alternaria tomato*. - *Agr. Biol. Chem.*, 1967, v. 40, N 6, p. 1263-1264.
168. Jackson R.C., Monis M.P., Weber G. Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumors. - *Brit. J. Cancer*, 1978, v. 37, N 5, p. 701-713.

169. Jakubowski H., Guranowski A. Adenosylhomocysteinase: adenosine complex. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 84, N 4, p. 1054-1059.
170. Johnson S.M., North M.B., Asterson G.L. et al. Lymphocyte purine 5'-nucleotidase deficiency in primary hypogammaglobulinemia. - *Lancet*, 1977, v. 1, N 8004, p. 168-170.
171. Kalckar H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. - *J. Biol. Chem.*, 1947, v. 167, N 2, p. 461-475.
172. Kalckar H.M., MacNutt W.S., Hof-Jorgensen E. Trans-N-glycosidase studied with radioactive adenosine. - *Biochem. J.*, 1952, v. 50, N 3, p. 397-400.
173. Kaplan N.O. Specific adenosine deaminase from intestine. - In: *Methods in Enzymology*. N.-Y., 1955<sup>a</sup>, v. 2, p. 473-475.
174. Kaplan N.O. Nonspecific adenosine deaminase from takadiastase. - In: *Methods in Enzymology*. N.-Y., 1955<sup>o</sup>, v. 2, p. 475-478.
175. Kaplan N.O., Colowick S.P., Ciotti M.M. Enzymatic deamination of adenosine derivatives. - *J. Biol. Chem.*, 1952, v. 194, N 2, p. 579-591.
176. Keith E.J., Karan K., Julian S.M. The activation of muscle adenylate deaminase by substrate. - *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, N 21, p. 6631-6637.
177. Koch A.L., Vallee G. The properties of adenosine deaminase and adenosine nucleoside phosphorylase in extracts of *Escherichia coli*. - *J. Biol. Chem.*, 1959, v. 234, N 5, p. 1213-1218.
178. Koch G., Shows T.B. A gene on human chromosome 6 functions in assembly of tissue-specific adenosine deaminase isozymes. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, N 8, p. 3876-3880.

179. Koch G., Shows T.B. Somatic cell genetics of adenosine deaminase expression and severe combined immunodeficiency disease in humans. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, N 7, p. 4211-4215.
180. Kream J., Chargaff E. Procedures for the study of purine and pyrimidine deaminases in small amounts. - J. Am. Chem. Soc., 1952, v. 74, N 17, p. 4274-4277.
181. Kredich N.M., Hershfield M.S. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, N 5, p. 2450-2454.
182. Kuroda Y. Regulatory functions of adenosine derivatives on neurotransmission in brain. Involvement of calcium (2+) and cyclic AMP as the second messengers. - Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1981, v. 26, N 1, p. 28-45. *Int. Rev. Cytol.*, 1981, v. 94, 132587 x.
183. Lawrence H.L. The relationship between the cleavage of purine ribosides by bacterial spores and the germination of the spores. - J. Bacteriol., 1955, v. 70, N 5, p. 583-587.
184. Lee Y.P. 5'-adenylic acid deaminase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit skeletal muscle. - J. Biol. Chem., 1957<sup>a</sup>, v. 227, N 2, p. 987-992.
185. Lee Y.P. 5'-adenylic acid deaminase. III. Properties and kinetic studies. - J. Biol. Chem., 1957<sup>o</sup>, v. 227, N 2, p. 999-1007.
186. Lee Y.P. Crystalline adenylic acid deaminase from rabbit skeletal muscle. - In: Methods in Enzymologie. N.-Y., 1963, v. 6, p. 102-106.
187. Leuchtenberger A. Die Sporenbildung bei Bakterien unter molekularbiologischem Aspekt. - Biol. Rdsch., 1973, v. 11, N 3, p. 139-152.
188. Liepa I. Biometrija. - Riga: Zvaigzne, 1974. - 336 lpp.

189. Lipper R.A., Machkovech S.M., Drach J.C., Higuchi W.I.  
Inhibition of drug metabolism by a prodrug: 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine 5'-valerate as an inhibitor of adenosine deaminase. - *Mol. Pharmacol.*, 1978, v. 14, N 2, p. 366-369.
190. Lomax C.A., Bagnara A.S., Henderson J.F. Studies on the regulation of purine nucleotide catabolism. - *Can. J. Biochem.*, 1975, v. 53, N 2, p. 231-241.
191. Lomax C.A., Henderson J.F. Phosphorylation of adenosine and deoxyadenosine in Ehrlich ascites carcinoma cells resistant to 6-(methylmercapto) purine ribonucleoside. - *Can. J. Biochem.*, 1972, v. 50, N 4, p. 423-427.
192. Lomax C.A., Henderson J.F. Adenosine formation and metabolism during adenosine triphosphate catabolism in Ehrlich ascites tumor cells. - *Cancer Res.*, 1973, v. 33, N 11, p. 2825-2829.
193. Lopez J.M., Marks C.L., Freese E. The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus subtilis*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 587, N 2, p. 238-252.
194. Lowenstein J., Tornheim K. Ammonia production in muscle: The purine nucleotide cycle. - *Science*, 1971, v. 171, N 3969, p. 397-400.
195. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. - *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, N 1, p. 265-275.
196. Luckner M. The integration of benzodiazepine and quinoline alkaloid formation into the developmental program of *Penicillium cyclopium*. - In: *Cell differentiation in microorganisms, plants and animals: Leopoldina-Symp.*, 1976. Jena, 1977, p. 538-558.
197. Lum C.T., Sutherland D.E.R., Foker J.E., Najarian J.S. Low-toxicity immunosuppression by specific inhibition of adenosine deaminase (ADA): prolongation of mouse skin grafts with erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochloride (EHNA). - *Surg. Forum*, 1977, v. 28, p. 320-322.

198. Lutwak-Mann C. Adenine derivatives and their biological functions. - Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 1939, v. 14, N 4, p. 399-419.
199. MacDermott R.P., Tritsch G.L., Formeister J.F. Adenosine deaminase and nucleoside phosphorylase activities in normal human blood mononuclear cell subpopulations. - Clin. Exp. Immunol., 1980, v. 42, N 2, p. 303-307.
200. Magasanik B., Karibian D. Purine nucleotide cycles and their metabolic role. - J. Biol. Chem., 1960, v. 235, N 9, p. 2672-2681.
201. Magill J.M., Spencer R.R., Magill C.W. Relation between 8-<sup>14</sup>C -adenosine transport and growth inhibition in *Neurospora crassa* strain ad-8. - J. Bacteriol., 1974, v. 119, N 1, p. 202-206.
202. Magnuson N.S., Perryman L.E. In vitro effects of adenosine on lymphocytes and erythrocytes from horses with combined immunodeficiency. - J. Clin. Invest., 1979, v. 64, N 1, p. 89-101.
203. Marone G., Lichtenstein L.M. Adenosine-adenosine deaminase modulation of histamine release from human basophils in vitro. - Ric. Clin. Lab., 1979, v. 9, N 2, p. 131-139.
204. Marone G., Lichtenstein L.M., Quattrin S. et al. Characterization of a specific adenosine receptor on human peripheral lymphocytes. - Folia Allergol. Immunol. Clin., 1980, v. 27, N 3, p. 175-188.
205. Meier J., Coleman M.S., Mutton J.J. Adenosine deaminase activity in peripheral blood cells of patients with haematological malignancies. - Brit. J. Cancer, 1976, v. 33, N 3, p. 312-319.
206. Michaelis M.L., Michaelis E.K., Myers S.L. Adenosine modulation of synaptosomal dopamine release. - Life Sci., 1979, v. 24, N 22, p. 2083-2092.
207. Minato S. Adenosine deaminase from takadiastase. V. Subunits of enzyme and interaction with adenosine analogs. - J. Biochem., 1968, v. 64, N 6, p. 815-826.

208. Minato S., Tagawa T., Miyaki M. et al. Studies of nonspecific adenosine deaminase from takadiastase. II. Studies on the structure of the substrates. - J. Biochem., 1966, v. 59, N 3, p. 265-271.
209. Minato S., Tagawa T., Nakanishi K. Studies on nonspecific adenosine deaminase from takadiastase. I. Purification and properties. - J. Biochem., 1965, v. 58, N 6, p. 519-525.
210. Mitchell H.K., McElroy W.D. Adenosine deaminase from *Aspergillus oryzae*. - Arch. Biochem., 1946, v. 10, N 3, p. 251-258.
211. Miwa S., Fujii H., Matsumoto N. et al. A case of red-cell adenosine deaminase overproduction associated with hereditary hemolytic anemia found in Japan. - Am. J. Haematol., 1978, v. 5, N 2, p. 107-115.
212. Moat A.G., Friedman H. The biosynthesis and interconversion of purines and their derivatives. - Bact. Rev., 1960, v. 24, N 3, p. 309-339.
213. Molnar J., Pragai B. Possible role of adenosine deaminase in suboptimal growth of the *Bacillus anthracis* adenine auxotroph mutant. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1973, v. 20, N 4, p. 255-265.
214. Kura U., Sgarrella P., Ipata P.L. Utilization of exogenous purine compounds in *Bacillus cereus*. Translocation of the ribose moiety of inosine. - J. Biol. Chem., 1978, v. 253, N 21, p. 7905-7909.
215. Murakami K. AMP-deaminase from baker's yeast. Kinetic and molecular properties. - J. Biochem., 1979, v. 86, N 5, p. 1331-1337.
216. Mustafa S.J. Cellular and molecular mechanism(s) of coronary flow regulation by adenosine. - Mol. Cell. Biochem., 1980, v. 31, N 2, p. 67-87.
217. Müller W.E.G., Zahn R.K., Arendes J. et al. Influence of coformycin on the cytostatic activity of  $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine and adenosine in mouse L5178Y cells. - Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1978, v. 359, N 10, p. 1287-1295.

218. Nathans G.R., Chang D., Deuel T.F. AMP deaminase from human erythrocytes. - In: *Methods in Enzymologie*. N.-Y., 1978, v. 51, p. 497-501.
219. Nikiforuk G., Colowick S.P. 5'-adenylic acid deaminase from muscle. - In: *Methods in Enzymologie*. N.-Y., 1955, v. 2, p. 469-472.
220. Nikiforuk G., Colowick S.P. The purification and properties of 5'-adenylic acid deaminase from muscle. - *J. Biol. Chem.*, 1956, v. 219, N 1, p. 119-129.
221. Nishihara H., Ishikawa S., Shinkai K., Akedo H. Multiple forms of human adenosine deaminase. II. Isolation and properties of a conversion factor from human lung. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, v. 302, N 2, p. 429-442.
222. Niven D.P., Collins P.A., Knowles C.J. Catabolism of adenosine 5'-monophosphate by extracts of the marine bacterium *Beneckea natriegens*. - *J. Gen. Microbiol.*, 1977, v. 100, N 1, p. 5-13.
223. Noguchi S., Shimura G., Kimura K., Samejima H. Production of 5'-mononucleotides using immobilized 5'-phosphodiesterase and 5'-AMP deaminase. - *J. Solid-Phase Biochem.*, 1976, v. 1, N 2, p. 105-118.
224. Nygaard P. Adenosine deaminase from *Escherichia coli*. - In: *Methods in Enzymologie*. N.-Y., 1978, v. 51, p. 508-512.
225. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y. et al. AMP deaminase isozymes in human tissues. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, v. 714, N 2, p. 298-306.
226. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. Isozymes of rat AMP deaminase. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, v. 403, N 2, p. 530-537.
227. Ogawa K., Tominaga K., Taoka S. et al. Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in lymphocytes from patients with lung cancer. - *Gann*, 1978, v. 69, N 4, p. 471-475.
228. Ogilvie A., Antl W. Human leukemia diadenosine tetraphosphatase ( $Ap_4Ase$ ): purification and characterisation. -

In: On cell function and differentiation: Abstr.  
Special FEBS Meeting. Athens-Greece, 1982, p. 232.

229. Olsson R.A., Snow J.A., Gentry M.K. Adenosine metabolism in canine myocardial reactive hyperemia. - *Circ. Res.*, 1978, v. 42, N 3, p. 358-362.
230. Parkman R., Gelfand E.W., Rozen et al. Severe combined immunodeficiency and adenosine deaminase activity. - *New Engl. J. Med.*, 1975, v. 292, N 11, p. 714-717.
231. Pendyala L., Wellman A.M. Endogenous purine metabolism in the conidia of wild type and certain adenine mutants of *Neurospora crassa*. 1. The nature of the reserve pools and pool utilization during adenine starvation. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, v. 385, N 2, p. 194-206.
232. Pflieger K., Niederau D., Volkmer I., Stock H. Mode of action of dipyridamole: inhibition by dipyridamole of the uptake of adenosine in erythrocytes. - *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1969, v. 265, N 2, p. 118-130.
233. Pickard M.A. Purification and some properties of the soluble and membrane-bound adenosine deaminases of *Micrococcus sodonensis* ATCC 11880 and their distribution within the family *Micrococcaceae*. - *Can. J. Biochem.*, 1975, v. 53, N 3, p. 344-353.
234. Pickard M.A., Whelihan J.A., Knowles C.J. AMP metabolism in the marine bacterium *Beneckeia natriegens*. - *Can. J. Microbiol.*, 1980, v. 26, N 5, p. 633-636.
235. Plunkett W., Alexander L., Chubb S., Loo T.L. Comparison of the activity of 2'-deoxycoformycin and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine in vivo. - *Biochem. Pharmacol.*, 1979, v. 28, N 2, p. 201-206.
236. Pollara B., Moore J.J.J., Pickering R.J. et al. Combined immunodeficiency disease: an inborn error of purine metabolism. - *Birth Defects*, 1975, v. 11, N 1, p. 120-123. Цит. по: *CA*, 1976, т. 85, 91517 t.
237. Polmar S.H., Stern R.C., Schwartz A.L., Hirschhorn R. Enzyme replacement therapy for adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency disease. - *Pediatr. Res.*, 1976<sup>a</sup>, v. 10, p. 392-397.

238. Polmar S.H., Stern R.C., Schwartz A.L. et al. Enzyme replacement therapy for adenosine deaminase deficiency and severe combined immuno-deficiency. - *New Eng. J. Med.*, 1976, v. 295, N 24, p. 1337-1343.
239. Powell J.F. The sporulation and germination of a strain of *Bac. megatherium*. - *J. Gen. Microbiol.*, 1951, v. 5, p. 993-1000.
240. Powell J.F., Hunter J.R. Adenosine deaminase and ribosidase in spores of *Bacillus cereus*. - *Biochem. J.*, 1956, v. 62, N 3, p. 381-387.
241. Powell J.F., Strange R.E. Biochemical changes occurring during sporulation in *Bacillus* species. - *Biochem. J.*, 1956, v. 63, N 4, p. 661-668.
242. Raivio K.O., Hovi T. Adenine and adenosine metabolism in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated and unstimulated normal human lymphocytes. - In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, v. 76A, p. 448-455.
243. Rajendra W., Indira K., Swami K.S. Effect of electrical stimulation on ammonia detoxification potential in amphibian skeletal muscle. - *Curr. Sci.*, 1980, v. 49, N 17, p. 681-683.
244. Ranieri-Raggi M., Bergamini C., Raggi A. Effect of pH on the kinetic properties of rat skeletal muscle AMP deaminase. - *Ital. J. Biochem.*, 1980, v. 29, N 4, p. 238-250.
245. Ranieri-Raggi M., Raggi A. Skeletal muscle amp deaminase: effects of limited proteolysis on the aggregation and regulatory properties. - *Ital. J. Biochem.*, 1980, v. 29, N 3, p. 218-219.
246. Ratech H., Thorbecke G.J., Hirschhorn R. Metabolic abnormalities of human adenosine deaminase deficiency reproduced in the mouse by 2'-deoxycoformycin, an adenosine deaminase inhibitor. - *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1981, v. 21, N 1, p. 119-127.
247. Reem G.H., Borkowsky W., Hirschhorn R. Purine and phosphoribosylpyrophosphate metabolism of lymphocytes and erythrocytes of an adenosine deaminase deficient immuno-

- competent cells. - *Pediatr. Res.*, 1979, v. 13, N 5, p. 649-653.
248. Rhaese H.J., Groscurth R. Initiation of sporulation and the role of highly phosphorylated nucleotides. - *Spore Res.*, 1977, N 1, p. 195-205.
249. Ribeiro J.A. ATP-related nucleotides and adenosine on neurotransmission. - *Life Sci.*, 1978, v. 22, N 16, p. 1373-1380.
250. Rokugawa K., Fujishima T., Kuninaka A., Yoshino K. Immobilization of adenosine (phosphate) deaminase on ion exchange resins by titanium complex method. - *J. Ferm. Technol.*, 1980, v. 58, N 6, p. 583-585.
251. Rosinova M., Holy A., Zelinkova E. Substrate specificity of adenosine aminohydrolase from *Streptomyces aureofaciens*. - *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1978<sup>a</sup>, v. 43, N 9, p. 2330-2340.
252. Rosinova M., Zelinkova E., Zelinka J. Adenosine aminohydrolase from *Streptomyces aureofaciens*. - *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1978, v. 43, N 9, p. 2324-2329.
253. Roush A.H. Yeast adenase. - *Arch. Biochem.*, 1954, v. 50, N 5, p. 510-512.
254. Russo M., Giancane R., Apice G., Galanti B. Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in peripheral lymphocytes from patients with solid tumors. - *Brit. J. Cancer*, 1981, v. 43, N 2, p. 196-200.
255. Sabina R.L., Swain J.L., Patten B.M. et al. Disruption of the purine nucleotide cycle. A potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. - *J. Clin. Invest.*, 1980, v. 66, N 6, p. 1419-1423.
256. Sadasivudu B., Rao T., Indira M., Radhakrishna C. Studies on AMP deaminase and 5'-nucleotidase in rat brain under different experimental conditions. - *J. Neurosci. Res.*, 1980, v. 5, N 4, p. 281-289.

257. Saito D., Nixon D.G., Olsson R.A. Effect of adenosine deaminase on myocardial reactive hyperemia: preliminary report. - *Basic Res. Cardiol.*, 1981, v. 76, N 4, p. 369-371.
258. Sakai T., Jun M.K. Purification and crystallization of adenosine deaminase in *Pseudomonas iodinum* IFO 3558. - *FEBS Lett.*, 1978, v. 86, N 2, p. 174-178.
259. Sauer L.A. Control of adenosine monophosphate catabolism in mouse ascites tumor cells. - *Cancer Res.*, 1978, v. 38, N 4, p. 1057-1063.
260. Sawa T., Fukagawa Y., Homma I. et al. Formycin deaminating activity of microorganisms. - *J. Antib.*, 1967, v. 20, N 6, p. 317-321.
261. Schmalstieg F.C., Mills G.C., Nelson J.A. et al. Limited effect of erythrocyte and plasma infusions in adenosine deaminase deficiency. - *J. Pediatr.*, 1978, v. 93, N 4, p. 597-603.
262. Scholar E.M., Calabresi P. Identification of the enzymatic pathways of nucleotide metabolism in human lymphocytes and leukemic cells. - *Cancer Res.*, 1973, v. 33, N 1, p. 94-103.
263. Schramm V.L., Lazorik F.C. Pathway of adenylate catabolism in *Azotobacter vinelandii*. Evidence for adenosine monophosphate nucleosidase as the regulatory enzyme. - *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, N 5, p. 1801-1808.
264. Schwabe U., Ebert R. Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and lipolysis in fat cells by adenosine deaminase. - *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.*, 1974, v. 281, N 1, p. 33-44.
265. Schwabe U., Ebert R., Erbiler H.C. Adenosine release from isolated fat cells and its significance for the effects of hormones on cyclic 3',5'-AMP levels and lipolysis. - *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol.*, 1973, v. 276, N 2, p. 133-148.

266. Schwartz A.L., Polmar S.H., Stern R.C., Cowaer D.M. Abnormal platelet aggregation in severe combined immunodeficiency disease with adenosine deaminase deficiency. - *Brit. J. Haematol.*, 1978, v. 39, N 2, p. 189-194.
267. Seegmiller J.E., Watanabe T., Shreier M.H., Waldmann T.A. Immunological aspects of purine metabolism. - In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, v. 76A, p. 412-433.
268. Sehgal O.P., Siegel A. Attempted enzymatic deamination of tobacco mosaic virus ribonucleic acid. - *Nature*, 1964, v. 202, N 4931, p. 472-474.
269. Sekar V., Wilson S.P., Hageman J.H. Induction of *Bacillus subtilis* sporulation by nucleosides: inosine appears to be sporegen. - *J. Bacteriol.*, 1981, v. 145, N 1, p. 489-493.
270. Setlow B., Burger R., Lowenstein J.M. Adenylate deaminase. I. The effects of adenosine and guanosine triphosphates on activity and the organ distribution of the regulated enzyme. - *J. Biol. Chem.*, 1966, v. 241, N 5, p. 1244-1245.
271. Severin E.S., Nesterova M.V., Itkes A.V. et al. Role of cyclic AMP in the regulation of genome expression in eukaryots. - In: *On cell function and differentiation: Abstr. Special FEBS Meeting. Athens-Greece, 1982*, p. 110.
272. Sgarrella F., Mura U., Pitti A., Ipata P.L. Studies on adenosine deaminase from *Bacillus cereus*. - In: *On cell function and differentiation: Abstr. Special FEBS Meeting. Athens-Greece, 1982*, p. 256.
273. Shibata M., Takamatsu H., Tani J. Inhibition by ammonium ion of germination of unactivated spores of *Bacillus cereus* induced by L-alanine and inosine. - *Microbiol. and Immunol.*, 1978, v. 22, N 3, p. 123-131.
274. Shipman C.J., Drach J.D. Absence of adenosine deaminase activity in a mammalian cell line transformed by Rous sarcoma virus. - *Science*, 1978, v. 200, N 4346, p. 1163-1165.

275. Šimuth J., Zelinka J. Nucleic acid degradation products of *Streptomyces aureofaciens*. - *J. Antib.*, 1970, v. 23, N 5, p. 242-249.
276. Shore A., Dosh H.M., Gelfand E.W. Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. - *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, v. 44, N 1, p. 152-155.
277. Sigma Price List Feb. 1982/Sigma Chem. Co. - St.Louis, 1981. - 864 p.
278. Simmonds H.A., Sahota A., Potter C.F., Cameron J.S. Purine metabolism and immunodeficiency: urine purine excretion as a diagnostic screening test in adenosine deaminase and phosphorylase deficiency. - *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1978, v. 54, N 5, p. 579-584.
279. Sieli Y., Boer P., Pick I. et al. Increased adenosine deaminase activity in peripheral lymphocytes in Waldenstroem's macroglobulinemia. - *Lancet*, 1979, v. 1, N 8114, p. 500.
280. Skolnick P., Marangos P.J., Goodwin F.K. et al. Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of [ $^3\text{H}$ ]diazepam binding in the central nervous system. - *Life Sci.*, 1978, v. 23, N 14, p. 1473-1480.
281. Skorka G., Shuker P., Gill D. et al. Fluorescent substrate analog for adenosine deaminase: 3'-O-[5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl] adenosine. - *Biochemistry*, 1981, v. 20, N 11, p. 3103-3109.
282. Smiley K.L., Berry J.A.J., Suelter C.H. An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. - *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, N 10, p. 2502-2506.
283. Smith C.M., Belch A., Henderson J.F. Hemolysis in mice treated with deoxycoformycin. An inhibitor of adenosine deaminase. - *Biochem. Pharmacol.*, 1980, v. 29, N 8, p. 1209-1210.

284. Smith L.D., Kizer D.E. Purification and properties of rat liver AMP deaminase. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 191, N 2, p. 415-424.
285. Smith J.E., Valenzuela-Perez J. Changes in intracellular concentrations of glycolytic intermediates and adenosine phosphates during the growth cycle of *Aspergillus niger*. - *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1971, v. 57, N 1, p. 103-110.
286. Smyth J.F., Marrap K.R. Adenosine deaminase activity in leukemia: lymphoid characteristic with diagnostic and therapeutic potential. - *Brit. J. Cancer*, 1975, v. 31, N 5, p. 544-549.
287. Smyth J.F., Poplack D.G., Holiman B.J. et al. Correlation of adenosine deaminase activity with cell surface markers in acute lymphoblastic leukemia. - *J. Clin. Invest.*, 1978, v. 62, N 3, p. 710-712.
288. Snyder F.F., Herhfield M.S., Seegmiller J.E. Purine toxicity in human lymphoblasts. - In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977, v. 76A, p. 30-39.
289. Snyder F.F., Hershfield M.S., Seegmiller J.E. Cytotoxic and metabolic effects of adenosine and adenine on human lymphoblasts. - *Cancer Res.*, 1978, v. 38, N 8, p. 2357-2362.
290. Solano C., Coffee C.J. Comparison of AMP deaminase from skeletal muscle of acidotic and normal rats. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 582, N 3, p. 369-379.
291. Spudich J.A., Kornberg A. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VI. Origin of spore core and coat proteins. - *J. Biol. Chem.*, 1968, v. 243, N 17, p. 4588-4599.
292. Spudich J.A., Kornberg A. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XIII. Adenylate kinase of vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. - *J. Bacteriol.*, 1969, v. 98, N 1, p. 69-74.

293. Stankiewicz A., Spychala J. Comparative studies on AMP deaminase. IV. Amino acid composition of the enzymes from rat, rabbit, hen, frog, and pikeperch skeletal muscle, and frog liver. - *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1981, v. 69B, N 1, p. 5-8.
294. Stephenson M., Trim A.R. Metabolism of adenine compounds by *Bacterium coli*. - *Biochem. J.*, 1938, v. 32, N 3, p. 470.
295. Sufrin G., Tritsch G.L., Moore R.H., Murphy G.P. Adenosine deaminase activity in a transplantable murine renal adenocarcinoma. - *Invest. Urol.*, 1979, v. 16, N 5, p. 385-387.
296. Sundaram P. Coupled and multienzyme-nylon tube reactors. - *Enzyme Eng.*, 1978, v. 3, p. 133-138.
297. Swallow D.M., Evans L., Hopkinson D.A. Several of the adenosine deaminase isozymes are glycoproteins. - *Nature*, 1977, v. 269, N 5625, p. 261-262.
298. Switzer R.L., Maurizi M.R., Wong J.Y. et al. The role of proteolysis in the selective inactivation of enzymes during sporulation in *Bacillus subtilis*. - In: *Proteolysis Microorg.*, 1979, p. 103-107. Цит. по: *CA*, 1981, v. 94, 205150m.
299. Switzer R.L., Turnbough C.L.J., Brabson J.S., Waindle L.M. Enzyme inactivation of de novo nucleotide biosynthesis in sporulating *Bacillus cereus* cells. - *Spores*, 1975, v. 6, p. 327-334.
300. Szulmajster J. Is sporulation a simple model for studying differentiation? - *Trends Biochem. Sci.*, 1979, v. 4, N 1, p. 18-22.
301. Tai K.J., Wolf F.F. The utilization of nucleic acid derivatives by *Penicillium chrysogenum*. - *Bull. Tchey. Bot. Club.*, 1961, v. 88, N 1, p. 42-45.
302. Takuo S., Hong K.J. Metabolism of nucleosides in bacteria. VIII. Purification and characterization of adenine deaminase in *Pseudomonas synxantha*. - *J. Ferment. Technol.*, 1978, v. 56, N 4, p. 257-265.

303. Tassi G.C., Mainardi V., Brugo M.A. Immunological deficiencies and enzymopenia. - *Ric.clin. e lab.*, 1978, v. 8, N 1, p. 85-92.
304. Tedde A., Balis M.E., Ikehara S. et al. Animal model for immune dysfunction associated with adenosine deaminase deficiency. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, N 8, p. 4899-4903.
305. Tritesch G.L., Niswander P.W. Positive correlation between adenosine deaminase activity and superoxide formation during phagocytosis. - *J. Med.*, 1980, v. 11, N 5-6, p. 393-399.
306. Tsukada T., Yoshino M. Adenosine deaminase from *Azotobacter vinelandii*. Purification and properties. - *Arch. Microbiol.*, 1980, v. 128, N 2, p. 228-232.
307. Turner D.H., Turner J.F. Adenylic deaminase of pea seeds. - *Biochem. J.*, 1961, v. 79, N 1, p. 143-147.
308. Uberti J., Lightbody J.J., Johnson R.M. The effect of nucleosides and deoxycoformycin on adenosine and deoxyadenosine inhibition of human lymphocyte activation. - *J. Immunol.*, 1979, v. 123, N 1, p. 189-193.
309. Ueland P.M., Saeb J. Cyclic AMP-adenosine binding protein/S-adenosylhomocysteinase from mouse liver. A fraction of adenosine bound is converted to adenine. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 585, N 4, p. 512-526.
310. Valentine W.N., Paglia D.E. Erythrocyte disorders of purine and pyrimidine metabolism. - *Hemoglobin*, 1980, v. 4, N 5-6, p. 669-681.
311. Van der Weyden M.B., Kelley W.N. Human adenosine deaminase. - *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 251, N 18, p. 5448-5456.
312. Van Heukelom S.L.H., Boom A., Bartstra H.A., Staal G.E.J. Characterization of adenosine deaminase isoenzymes from normal human erythrocytes. - *Clin. Chim. Acta*, 1976, v. 72, N 1, p. 109-115.
313. Waithe W.I., Hirschhorn K. The lymphocyte response to activators. - In: *Handbook of experimental immunology*. 1973, v. 2, Chapter 25.

314. Webster H.L. Direct deamination of adenosine diphosphate by washed myofibrils. - *Nature*, 1953, v. 172, N 4375, p. 453-454.
315. Whitely H.R., Oishi M. An increase in alkaline phosphatase in an in vitro system derived from *Bacillus subtilis*. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, v. 13, N 1, p. 6-11.
316. Williams V.R., McIntyre R.T. The adenosine deaminase of *Bacterium cadaveris*. - *J. Bacteriol.*, 1955, v. 70, N 5, p. 563-567.
317. Wolfenden R. Enzymic hydrolysis of 6-substituents on purine ribosides. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, v. 88, N 13, p. 3157-3158.
318. Wolfenden R., Sharpless T.K., Allan R. Substrate binding by adenosine deaminase. Specificity, pH dependence and competition by mercurials. - *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, N 5, p. 977-981.
319. Wolfenden R., Sharpless T.K., Indukanth S.R., Nelson J.L. Enzymic and chemical deamination of 3-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) adenine. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, v. 88, N 1, p. 185-186.
320. Wolfenden R., Tomozawa Y., Bamman B. Takadiatase adenosine deaminase, calf duodenal adenosine deaminase, and rabbit muscle adenosine monophosphate deaminase. A comparison of physical properties and amino acid composition. - *Biochemistry*, 1968, v. 7, N 11, p. 3965-3970.
321. Yadomae T., Suzuki I., Kumazawa Y., Miyazaki T. B Lymphocyte mitogen extracted from a fungus *Peziza vesiculosa*. - *Microbiol. and Immunol.*, 1979, v. 23, N 10, p. 997-1008.
322. Yagawa K., Okamura J. Role of adenosine deaminase in activation of macrophages. - *Infect. Immun.*, 1981, v. 32, N 1, p. 394-397.
323. Yang T.J. Inhibitory effects of phytohemagglutinin on growth of leukemia lymphoblasts L 5178Y in vitro and in vivo. - *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, v. 55, N 2, p. 323-327.

324. Yates A.G. A non-specific adenine nucleotide deaminase from *Desulfovibrio desulfuricans*. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 171, N 2, p. 299-310.
325. Yoshino M., Murakami K. AMP deaminase from spinach leaves purification and some regulatory properties. - *Z. Pflanzenphysiol.*, 1980, v. 99, N 4, p. 331-338.
326. Yoshino M., Murakami K. In situ studies on AMP deaminase as a control system of the adenylate energy charge in yeasts. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1981<sup>a</sup>, v. 672, N 1, p. 15-20.
327. Yoshino M., Murakami K. AMP deaminase activity and the control of adenylate energy charge in alkane-utilizing yeast, *Candida tropicalis*. - *Biochem. Int.*, 1981<sup>b</sup>, v. 3, N 2, p. 173-179.
328. Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. AMP-deaminase from baker's yeast. Purification and some regulatory properties. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, v. 570, N 1, p. 157-166.
329. Yoshino M., Tsukada T., Murakami K., Tsushima K. Adenine nucleotide metabolism in *Azotobacter vinelandii*. Two metabolic pathways of AMP degradation. - *Arch. Microbiol.*, 1980, v. 128, N 2, p. 222-227.
330. Yuan S., Suelter C.H. Human erythrocytes 5' AMP aminohydro-lase. Purification and characterization. - *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, N 2, p. 404-408.
331. Zielke C.L., Suelter C.H. Substrate specificity and aspects of deamination catalyzed by rabbit muscle 5'-adenylic acid aminohydro-lase. - *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, N 5, p. 1313-1317.
332. Zielke C.L., Suelter C.H. Rabbit muscle adenosine 5'-mono-phosphate aminohydro-lase. Characterization as a zinc metalloenzyme. - *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, N 7, p. 2179-2186.
333. Zimmer J., Khalifa A.S., Lightbody J.J. Decreased lymphocyte adenosine deaminase activity in acute lymphocytic leukemic children and their parents. - *Cancer Res.*, 1975, v. 35, N 1, p. 68-70.

334. Zubaidah R.H.A., Lutaya G., Griffiths J.R. Activation of AMP aminohydrolase during skeletal-muscle contraction. - Biochem. J., 1979, v. 184, II 1, p. 173-176.