ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ ԱՐԵՆ ՌԱՖԱՅԵԼԻ

Aspergillus niger R-3 ԲՈՐԲՈՍԱՍՆԿԵՐԻ L-ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱԶԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Գ.00.04-Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան-2013

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГРИГОРЯН АРЕН РАФАЕЛОВИЧ

ОСОБЕННОСТИ L-АМИНОКИСЛОТНЫЙ ОКСИДАЗЫ У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ Aspergillus niger R-3

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
03.00.04-Биохимия

Ереван – 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար`	ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կենս.գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Մ. Ա. Դավթյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ`	կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր Գ.Վ. Ապրիկյան
կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր Ա. Ե. Զաքարյան

Առաջատար կազմակերպություն`	Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2013 թ ապրիլի 19-ին, ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի 051 Կենսաֆիզիկա մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2013թ. մարտի 18-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր`	Լ.Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:	академик НАН РА, доктор биол.наук, профессор М. А. Давтян

Официальные оппоненты:	доктор биол.наук, профессор Г. В. Априкян
доктор биол.наук профессор А. Е. Закарян

Ведущая организация:	Государственный аграрный университет Армении

Защита диссертации состоится 19-го апреля 2013 г., в 14^{00} часов, на заседании Специализированного совета 051 Биофизика ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ биологический факультет)
С диссертацией можно ознокомится в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 18-го марта 2013 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051, доктор биол. наук, профессор	Л. А. Навасардян

In our laboratory, methods of ferment induction were worked out; in particular, when growing yeast of Candida species on yeast extracts or on small amounts of ammonia sulfate, L-amino acid oxidase is induced in specific peroxisomal fractions. After discovering of this enzyme participation in the number of significant processes, scientific interest toward this enzyme sharply increase. In particular, L-amino acid oxidaseof a bacterium *Lechevalieria aerocolonigenes* deaminates tryptophan forming a-keto-β-indolil of propanoic acid, then 7-chloro-tryptophan which involves into the biosynthesis of rebekamicin (antibiotic).

It has been proved, that during the catalytic activity of L-amino acid oxidase, together with amino acid deamination and ammonia forming, hydrogen peroxide is formed which stimulates apoptosis of cells. Unambiguously it is revealed that snake poison exposes cytotoxicity through H_2O_2 of L-amino acid oxidase. It has been shown that this enzyme provides antibacterial activity in milk. According to the results obtained by differential centrifugation method of Aspergillus niger mold homogenate, we assumed that only 2^{nd} and 3^{th} peroxisomal fractions contain the enzyme, together with other FAD- dependent enzymes (D-amino acid oxidase, xanthine oxidase, catalase).

We intend to explore possibilities of stimulating L-amino acid oxidase in under study molds. We proceeded from the data,found in numerous publications, concerning stimulating of many cellular processes through low concentration of (lower than 50 mkM) H_2O_2 (activates K+ channels of plasmatic membrane, activates various phospholipases, activates cyclooxigenase pathway of prostaglandin biosynthesis, participate in thyroids biosyntheses, activates different phospholipases, stimulates protein kinase, etc.). H_2O_2 is the most important signal molecule of the cells. Some of scientists reasonably consider that H_2O_2 is a messenger.

We could prove that 0,018 M concentration of H_2O_2 in nutrient medium activates L-amino acid oxidase in peroxisomas of Aspergillus niger R-3 mold. At that, enzyme activity also seen in extracts of these fungi. If the enzyme is activated by hydrogen peroxide not only substrate specificity does not change but also the sequence of amino acids to activeness of their deamination. This is the proof that only one L-amino acid oxidase is present in the under study molds. L-amino acid oxidase shows high excitability toward ions of bivalent metals. It is interesting, that enzyme activity changes under the influence of metal ionssubstrate specificity and sequence of deamination intencity of amino acids do not change, which is another proof of isoenzym absence in under study oxidase.

We also explored the possibility of amino acid desaminases transdeamination mechanisms in the under study fungi. It has been previously discovered that the fungi contain glutamate dehydrogenase, which while active in α-ketoglutaric acid amiation process, absolutely are not active to deamiation of glutamate. GTP and hydroxylamine inhibit transaminase, but the processes of ammonia formation is not change. This is a proof of amino acid transamiation mechanism absence in under study fungi.

цитотоксичность через образование H_2O_2 оксидазой L-аминокислот. Показано, что этот фермент в молоке обеспечивает антибактериальное действие. Нами, методом дифференциального центрифугирования гомогената плесневых грибов Asp. niger, было показано, что фермент содержится лишь во 2-ой и 3-ей фракциях пероксисом наряду с другими ФАД зависимыми ферментами (оксидаза D-аминокислот, ксантин оксидаза, каталаза). Перед нами была поставлена цель исследовать возможность стимулирования оксидазы L-аминокислот в исследуемых плесневых грибах. Мы исходили из множества литературных данных относительно стимулирования многих клеточных процессов низкими концентрациями (ниже 50 мкм) H_2O_2 (активирует K^+ каналы плазматической мембраны, стимулирует циклооксигеназный путь биосинтеза простагландинов, участвует в биосинтезе тироидных гормонов, активирует различные фосфолипазы, стимулирует тирозин протеинкиназы и др.). H_2O_2 считается важнейшей сигнальной молекулой клеток. Ряд ученых обоснованно считают H_2O_2 мессенджером. Нам удалось показать, что H_2O_2 в концентрации 0.018м в питательной среде активирует оксидазу L-аминокислот в пероксисомах плесневых грибов Asp. niger R-3. При этом активность фермента проявляется и в экстрктах этих грибов. При активировании фермента H_2O_2 не меняется не только субстратная специфичность, но и последовательность аминокислот по активности их дезаминирования. Это является доказательством присустивя в исследуемых плесновых грибах только одной оксидазы L-аминокислот. Оксидаза L-аминокислот проявляет высокую чувствительность к ионам двухвалентных металлов. Интересно, что при изменении активности фермента под влиянием ионов металлов не меняется субстратная специфичность и очередность интенсивности дезаминирования аминокислот, что явяется еще одним доказательством отсутствия изоэнзимов исследуемой оксидазы. Нами была исследована возможность функционирования в исследуемых плесневых грибах механизма трансдезаминирования аминокислот. Было выяснено, что в грибах содержится глутаматдегидрогеназа, которая будучи активной в процессах аминирования α-кетоглутарата, абсолютно неактивна в отношении дезаминирования глутамата. ГТФ и NH_2OH ингибируют трансаминазы, но не ингибируют процесс аммиакобразования. Это является доказательством отсутствия у изучаемых грибов механизма трансаминирования аминокислот.

GRIGORYAN AREN

CHARACTERISTICS OF L-AMINO ASID OXIDASE IN Aspergillus niger R-3 MOLDS
SUMMARY

Key words: L-amino asid oxidase, FAD dependent enzymes, peroxisom, hydrogen peroxide

L-aminoacid oxidase was discovered long ago, but there are still number of questions about the mechanism of its functioning. It has been shown that it can be found in the kidneys and liver of rats, also in molds. It was also discovered in the poison of many types of snakes. They deaminate more than 12 amino acids; they are FAD and FMN dependent enzymes with pH optimum 10 and low enzymatic turn. Many researchers have claimed that enzyme cannot play any significant role in ammonia forming processes.

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Թեմայի արդիականությունը և հիմնավորումը: Ամինաթթուների օքսիդատիվ դեզամինացումը հայտնաբերվել է 1932թ. Կրեբսի կողմից առնետների երիկամների կտրվածքներում [Кребс 1932]: Հայտնի է, որ ֆերմենտը ֆլավին կախյալ է, օպտիմում pH =10 և դեզամինացնում է մեծ թվով L-ամինաթթուներ:

Հետագայում ֆերմենտի ակտիվությունը հայտնաբերվել է կենսաբանական բազմաթիվ օբյեկտներում (բակտերիաներ, խմորասնկեր, բորբոսասնկեր) և տարբեր տեսակներին պատկանող կենդանական բջիջներում [Майстер 1961, Давтян, Багдасарян 1985, и др.]: Վերջին տարիներին հետազոտողների հետաքրքրությունը ֆերմենտի հանդեպ խիստ բարձրացել է կապված նրա կենսաբանական տարբեր ֆունկցիաներում ունեցած մասնակցության վերաբերյալ հայտնաբերված նոր փաստերի հետ: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ Lechevalieria aerocolonigenes բակտերիալ բջիջներում այն մասնակցում է հակաուռուցքային ակտիվությամբ օժտված անտիբիոտիկ ռեբեկամիցինի կենսասինթեզում [Nishizawa et. al., 2005], օձի թույնից անջատված ֆերմենտը ունի հակաբակտերիալ, հակաուռուցքային, հակառետրովիրուսային, հակամակարդիչ, ապոպտոզը խթանող ազդեցություններ [Liu et. al 2002; Zhang et. al., 2003; 2004; Stabeli et. al., 2004; Kitani et. al., 2006].

Առանձնապես մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում ապոպտոզի մեխանիզմներում օձի թույնի մեջ պարունակվող L-ամինաթթվային օքսիդազի մասին եղած տվյալները [Suhr Kim, 1999]: Ապացուցված է նաև, որ D-ամինաթթվային օքսիդազի նման L-ամինաթթվային օքսիդազը հիմնականում տեղակայված է բջիջների պերօքսիսոմներում [Давтян и др. 1998, Оганесян 2001]:

Ներկայումս ապացուցված է, որ անհատական զարգացման տարբեր փուլերում, ինչպես նաև սննդամիջավայրի բաղադրիչների որակական և քանակական փոփոխությունների ժամանակ առաջանում են պերօքսիսոմների տարբեր պոպուլյացիաներ իրենց յուրահատուկ ֆերմենտային հավաքածուներով [Белицер 1977, Давтян и др. 1998, Оганесян и др. 1998].

L-ամինաթթվային օքսիդազների ուսումնասիրությունները դժվարանում են ֆերմենտի ցածր ակտիվության և տարբեր գործոնների նկատմամբ (ջերմաստիճան, պահելու տևողություն, վակուումային չորացում, դեհիդրատացնող միացությունների ազդեցություն և այլն) ցուցաբերած բարձր անկայունության պատճառով: Տարբեր հեղինակների կողմից կիրառվել են ֆերմենտի ակտիվացման զանազան եղանակներ: Ցույց է տրվել, որ Neurospora crassa բորբոսասնկերի L-ամինաթթվային օքսիդազը հնարավոր է խթանել ֆերմենտի կատաբոլիկ ռեպրեսիան վերացնելու միջոցով [Sikora, Marzluf 1982]: N. crassa բորբոսասնկերը կազեինի հիդրոլիզատի միջավայրում ինկուբացնելիս կրկնակի բարձրանում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ելքը [Tayer, Horowitz, 1951]: Ֆերմենտի ինդուկցման նպատակով շատ հեղինակներ օգտագործել են L- և D-ամինաթթուներ [Niederman, Lerch 1991], բիոտին, խմորասնկային հիդրոլիզատ [Давтян, Багдасарян 1985], ուրոկանինաթթու [Schwartzkoff 1963]: Սակայն նշված բոլոր եղանակները առանձնապես արդյունավետ չեն: Մեր ուշադրությունը գրավեց ջրածնի պերօքսիդը, որը վերջին տարիներին դարձել է շատ հետազոտողների ուսումնասիրության առարկան, այն համարվում է շատ կարևոր ազդանշանային մոլեկուլ, որը հեշտությամբ հաղթահարում է կենսա-

բանական մեմբրանները և օժտված է բազմաթիվ կենսաբանական պրոցեսների վրա ազդելու ունակությամբ: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ H_2O_2-ի ցածր դոզաները (10^{-7}Մ) խթանում են Sach. cerevisiae խմորասնկերի աճը [Bagdasaryan, Ayrapetyan 2006]: Ներկայումս մանրամասնությամբ պարզաբանված են օրգանիզմում ջրածնի պերօքսիդի առաջացման աղբյուրներն ու մեխանիզմները [Скулачов 1996; Кулиский 1999; Гамалей, Клюбин, 1996]: Այն հանդիսանում է թթվածնի ակտիվ մետաբոլիտ, որը հիմնականում առաջանում է ներշնչված թթվածնի մեկ էլեկտրոնային վերականգնմամբ: Հիմնավորվում է նրա մեսենջերային դերը նյութափոխանակության մեջ [Гамалей, Клюбин, 1996; Ayrapetyan et al., 2007] :

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: *Հաշվի* առնելով վերոհիշյալը, մեր առջև խնդիր է դրվել բազմակողմանի ուսումնասիրել Aspergillus niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության խթանման, ֆերմենտի ներբջջային լոկալիզացիայի, մետաղների իոնների ազդեցության և իզոէնզիմների գոյության հարցերը: Կարևոր է պարզել նաև այն, թե L–ամինաթթվային օքսիդազի հետ միաժամանակ գործում է արդյո՞ք L-ամինաթթուների դեզամինացումը տրանսդեզամինացման մեխանիզմով՝ գլյուտամինաթթվի դեհիդրոգենազի և տրանսամինազների համատեղ գործունեությամբ:

Առաջադրված խնդիրները լուծելու նպատակով հետազոտությունները տարվել են Aspergillus niger R-3 բորբոսասնկերի վրա հետևյալ հարցերի պարզաբանման ուղղությամբ

1. Բորբոսասնկերի էկքստրակտներում և նրանցից անջատված պերօքսիսոմներում L- ամինաթթվային օքսիդազների ակտիվությունը:
2. Ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը բորբոսասնկերի էքստրակտներում և պերօքսիսոմներում L- ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա:
3. L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոֆերմենտների գոյությունը: Կարևոր է պարզել, թե ջրածնի պերօքսիդի ազդեցության տակ ֆերմենտատիվ ակտիվության կտրուկ բարձրացումն արդյունք է գոյություն ունեցող L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվացման, թե նոր իզոֆերմենտի ինդուկցիայի: Այդ նպատակով ուսումնասիրվել են տարբեր L-ամինաթթուների դեզամինացման ակտիվությունները սննդամիջավայրում ջրածնի պերօքսիդի առկայության և բացակայության պայմաններում բորբոսասնկերն աճեցնելուց հետո: Եթե փորձի պայմաններում ինդուկցվում է միայն մեկ ֆերմենտ, ապա առանձին ամինաթթուների դեզամինացման ինտենսիվությունների հարաբերությունը պետք է մնա նույնը ջրածնի պերօքսիդի և վերջինիս բացակայության պայմաններում բորբոսասունկն աճեցնելիս:
4. Երկվալենտ մետաղական իոնների ազդեցությունը բորբոսասնկերի L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա:
5. Ամինաթթուների տրանսդեզամինացման մեխանիզմների գոյությունը բորբոսասնկերում:

Աշխատանքի գիտական նորույթը և գործնական արժեքը: Առաջին անգամ ցույց է տրվել ջրածնի պերօքսիդի ազդեցության տակ L-ամինաթթվային օքսիդազայի ակտիվացումը Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի օրինակի վրա: Այդ տվյալները համահունչ են H_2O_2 -ի ցածր կոնցենտրացիաների ազդեցության տակ բջիջներում զանազան կենսաբանական պրոցեսների խթանման գրականության փաստերի հետ

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված գիտական աշխատանքների ցուցակ

1. С.П. Оганесян, Г.А. Габриелян, М.А. Давтян, А.Р. Григорян. Влияние перекиси водорода на индукцию L- аминокислотной оксидазы Aspergillus niger R-3 Вестник МАНЭБ, 2010, т 15, N 5, вып. 1 стр. 56-58
2. С.П. Оганесян, А.Р. Григорян, Г.А. Габриелян. О дезаминировании аминокислот оксидазой L- аминокислот гриба Aspergillus niger R-3. Современная наука, 2011, N 1 стр. 65- 68
3. М.А. Давтян, А.Р. Григорян, С.П. Оганесян, Г.А. Габриелян, Влияние перекиси водорода на активность L- аминокислотной оксидазы ы плесневого гриба Aspergillus niger R-3 Научная перспектива 2012 N5, стр 56-58
4. Grigoryan A., Davtyan R.M., Gabrielyan G.A., Hovhannisyan S.P., Davtyan M.A., Introduction of L-aminoasid oxidase of Asp. niger–R3 by hydrogen peroxide. 22-ой конгрес IUBMB (Межд. союз по биох. и мол. Биол.) и 37-ой конгресс FEBS (Фед. Европ. Биохим. обществ), Севилия, Испания, 4-9 сент, 2012, Спец. вып, том 279, стр, 2285, код P12-68,
5. Ա.Ռ. Գրիգորյան, Aspergillus niger R-3 բորբոսասնկի պերօքսիսոմներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության ուսումնասիրությունը, <<Հայաստանի կենսաբանական հանդես>> մարտ 2012 էջ 118-120

ГРИГОРЯН АРЕН РАФАЕЛОВИЧ

ОСОБЕННОСТИ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ У ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ Aspergillus niger R-3

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: Оксидаза L-аминокислот, ФАД зависимые ферменты, пероксисомы, перекись водорода

Оксидаза L-аминокислот была открыта давно, но все еще остается много вопросов о механизмах ее функционирования. Было показано, что она представлена в почках и печени крыс, у плесневых грибов. В дальнейшем она была открыта в ядах многих видов змей. Оксидазы L-аминокислот дезаминируют более 12 аминокислот, являются ФАД или ФМН зависимыми ферментами с pH оптимумом 10 и низким числом оборотов. Многими исследователями было заключено, что фермент не может играть существенную роль в процессах аммиакобразования. В нашей лаборатории были разработаны методы индукции оксидазы L-аминокислот в определенных пероксисомальных фракциях дрожжей рода Candidia путем выращивания их на экстрактах дрожжей или в присутствии небольших концентраций сульфата аммония. Интерес к ферменту резко возрос после открытия фактов участия фермента в ряде существенных процессов клеток. В частности, оксидаза L-аминокислот бактерий *Lechevalieria aerocolonigenes* дезаминирует триптофан с образованием a-кето-β-индолил пропионовой кислоты, затем 7-хлор триптофана, которая и включается в биосинтез ребекамицина (антибиотик).

Доказано, что в ходе каталитической активности оксидазы L-аминокислот, помимо дезаминирования аминокислот и образования аммиака, образуется H_2O_2, которая стимулирует апоптоз клеток. Однозначно доказано, что змеиный яд проявляет

ֆերմենտները կարող են գործել միայն բջիջների ամբողջականության պահպանման պայմաններում, կամ առնվազն հյուսվածքային կտրվածքների պայմաններում, երբ պահպանված են գոյացող NH_3-ը բջջից հեռացնելու հնարավորությունները: Ուստի մեր տվյալները խոսում են այն մասին, որ հոմոգենատներում ամինաթթուների դեզամինացում որևէ մեխանիզմով, այդ թվում նաև տրանսդեզամինացման մեխանիզմով ժխտվում է, իսկ բջիջների ամբողջականության պայմաններում բոլոր ամինաթթուները կարող են դեզամինացվել տրանսդեզամինացմամբ, բացառություն է կազմում L-ամինաթթվային օքսիդազը, որի ակտիվությունը H_2O_2-ով խթանվելուց հետո հայտնաբերվում է նաև էքստրակտում: Մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում H_2O_2-ով L-ամինաթթվային օքսիդազը խթանելու մեխանիզմի հարցը, որի պարզաբանումը պահանջում է նոր հետազոտություններ:

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Asp. niger R-3 բորբոսասնկի մոտ ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությամբ խթանվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը: Ակտիվության խթանումը ունի ջրածնի պերօքսիդի կոնցենտրացիայից կախյալ բնույթ: Այն ամենաբարձրն է ջրածնի պերօքսիդի 0,018 Մ կոնցենտրացիայի դեպքում: Ավելի բարձր կոնցենտրացիաների ժամանակ ֆերմենտի ակտիվությունը նվազում է:
2. Ջրածնի պերօքսիդով L-ամինաթթվային օքսիդազան խթանելիս ֆերմենտի ակտիվությունը դրսևորվում է ոչ միայն պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում այլ նաև բորբոսասնկի էքստրակտներում:
3. Ջրածնի պերօքսիդով ակտիվացված L-ամինաթթվային օքսիդազի տարբեր ամինաթթուները դեզամինացնելու ակտիվության տոկոսը նրանց գումարային ակտիվության նկատմամբ մնում է անփոփոխ, որը ապացուցում է բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոֆերմենտների բացակայությունը:
4. L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը երկվալենտ մետաղական իոնների առկայությամբ ենթարկվում է փոփոխությունների (Zn^{2+}-ը ճնշում, իսկ Cu^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} իոնները ակտիվացնում են ֆերմենտին): Սակայն նշված երկվալենտ մետաղական իոնների առկայությամբ տարբեր ամինաթթուների դեզամինացման ակտիվացման տոկոսը մնում է նույնը, որը նույնպես վկայում է L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոֆերմենտների բացակայության մասին:
5. Asp. niger R-3 բորբոսասնկի աճման միջավայրը անընդհատ թթվածնով աէրացիայի ենթարկելիս չի ակտիվանում L-ամինաթթվային օքսիդազը, հետևաբար ֆերմենտի ինդուկցիան կապված չէ ջրածնի պերօքսիդի քայքայումից գոյացող թթվածնի հետ:
6. Բորբոսասնկերում առկա են գլյուտամատ- և ալանին դեհիդրոգենազներ, որոնք բորբոսասնկերի էքստրակտներում գործում են համապատասխան կետոթթուների ամինացման ուղղությամբ: Այդ ֆերմենտների չեն գործում ամինաթթուների դեզամինացման ուղղությամբ, քանի որ բջիջների ամբողջականության խախտման պատճառով NH_3-ը կուտակվում է ինկուբացիոն միջավայրում:

[Kuo et. al 1993; Krippeit Drews et.al 1994; 1995; Goldman et.al 1992; Rao et. al 1995].

Մեր կողմից ստացված տվյալները խոսում են այն մասին, որ Asp.niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվացումը H_2O_2-ի ազդեցության տակ զուգակցվում է ջրածնի պերօքսիդի լրացուցիչ արտադրության խթանման հետ, որը, ինչպես նշվեց վերևում, կարող է բերել նյութափոխանակության տարբեր օղակների ակտիվացման:

Տարբեր մետաբոլիկ օղակների խթանումը կարող է բուժական նշանակություն ունենալ զանազան հիվանդությունների ժամանակ, որի վերաբերյալ գոյություն ունեն կլինիկական բազմաթիվ հետազոտությունների արդյունքներ: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ H_2O_2 կարելի է կիրառել արտրիտի, աստմայի, մաշկային, հիվանդությունների և այլ դեպքերում [Афанасева 2006; Неумыванки 2007]: Ներկայումս հայտնի է, որ պերօքսիսոմների բիոգենեզի խախտման դեպքում զարգանում են նյարդային համակարգի, լսողության, տեսողության խանգարումներ, ինչպես նաև ֆիզիկական թերզարգացում [Зиновик, Гусина 2000, Wei et. al 2000]:

Մեր արդյունքները հաստատում են գրականության տվյալներն այն մասին, որ H_2O_2 խթանում է բջջային ֆունկցիաները ցածր կոնցենտրացիաների (0,018 Մ) դեպքում:

Ուսումնասիրելով L-ամինաթթվային օքսիդազի առանձին ամինաթթուների վրա ունեցած ազդեցությունը, ցույց տրվեց, որ առանձին ամինաթթուների դեզամինացման տոկոսը բոլոր ամինաթթուների գումարային ակտիվության նկատմամբ չի փոփոխվում H_2O_2-ով ֆերմենտի ակտիվությունը խթանելիս: Այս տվյալները միանշանակ ապացուցում են, որ ուսումնասիրվող բորբոսասնկերը պարունակում են միայն մեկ L-ամինաթթվային օքսիդազ և բացակայում են իզոֆերմենտները:

<u>Աշխատանքի փորձաքննությունը և հրապարակումները</u> Ատենախոսությունը փորձաքննության է ենթարկվել ԵՊՀ կենսաբանության ֆակուլտետի կենսաքիմիայի ամբիոնի և գիտահետազոտական լաբորատորիայի ընդլայնված նիստում:

Ստացված արդյունքները ներկայացվել են FEBS-ի (Федерация европейских биохимических обществ) 22-րդ և IUBMB-ի (Международный союз по биохимии и молекулярный биологии) 37-րդ միացյալ կոնգրեսում, Սեվիլիա, Իսպանիա, 4-9 սեպտեմբերի, 2012 թ.

Ատենախոսության թեմայով հրատարակված են 4 հոդվածներ և 1 գիտաժողովի թեզիս:

<u>Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը:</u> Ատենախոսությունը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտման օբյեկտի և մեթոդների նկարագրությունից, հետազոտությունների արդյունքներից ու քննարկումներից, ամփոփումից, եզրակացություններից և օգտագործված գրականության ցուցակից:

Աշխատանքը շարադրված է համակարգչային տեքստի 103 էջերում: Պարունակում է 9 աղյուսակ և 16 գծապատկեր:

ՀԵՏԱԶՈՏՄԱՆ ՕԲՅԵԿՏԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Որպես **հետազոտման օբյեկտ** ծառայել է **Aspergillus niger R-3** բորբոսասունկը, որն օգտագործվում է լիմոնաթթվի արտադրության մեջ [Журавский 1953]: Սունկն աճեցվել է Ռոլենի սինթետիկ սննդամիջավայրում, որի 100 մլ-ը (pH-7.0) պարունակում է գլյուկոզ - 20 գ, KH_2PO_4 – 0,5գ, $ZnSO_4$ – 0,05գ, $FeSO_4 x 7H_20$ -0,005գ և

0.4գ L-ալանին որպես ազոտի աղբյուր: Բորբոսասնկի ցանքսը կատարվել է ստերիլ պայմաններում 42^{0}C-ում, աճեցումը՝ 32^{0}C –ում չորս օր:

Բորբոսասնկային էքստրակտի պատրաստումը: Քառօրյա կուլտուրան ենթարկվել է հոմոգենիզացիայի թորած ջրում Էլվեջեմ-Պոտտերի հոմոգենիզատորով 5 րոպե: 10% հոմոգենատը ցենտրիֆուգվել է 600-700g (3000պտ/ր) արագությամբ, 10 րոպե տևողությամբ կորիզային ֆրակցիան հեռացնելու համար:

Aspergillus niger R-3 բորբոսասնկերի ենթաբջջային միավորների բաժանումը իզոպիկնիկ ցենտրիֆուգման մեթոդով: Asp. niger R3 բորբոսասնկի 10% հոմոգենատից կորիզային ֆրակցիան հեռացնելուց հետո ստացված վերնստվածքը (բորբոսասնկային էքստրակտ) ենթարկվել է իզոպիկնիկ ցենտրիֆուգման 0,25Մ սախարոզի և 1.2 խտությամբ ֆիկոլի գրադիենտում: Դրա համար, վերջին խառնուրդը պարունակող վերնստվածքը ցենտրիֆուգվել է 12000-14000 g արագությամբ, 90 րոպե տևողությամբ 0-4^{0}C-ում: Այնուհետև բժշկական ներարկիչով (шприц) առանձնացվել են երեք (I, II, III) ֆրակցիաներ, որոնց պերօքսիսոմալ լինելը հաստատվել է մարկերային համապատասխան ֆերմենտների (D-ամինաթթվային օքսիդազա և կատալազա) որոշմամբ, իսկ ֆրակցիաների մաքրության աստիճանը պարզելու համար նրանցում որոշվել է միտոքոնդրիումների մարկերային ֆերմենտ սուկցինատդեհիդրոգենազը և լիզոսոմների մարկերային ֆերմենտ β-N-ացետիլ D-գլյուկոզամիդազը [Chandoga, Krizko 1983]:

Պերոքսիսոմալ ֆրակցիաների (II, III) իդենտիֆիկացումից հետո նրանցում և սկզբնական վերնստվածքում որոշվել են L-ամինաթթվային օքսիդազի, գլյուտամինաթթվի և ալանին դեհիդրոգենազներիի ակտիվությունները:

Գլյուտամինաթթվի և ալանին դեհիդրոգենազների ակտիվությունների որոշումը ներկայացված է հետազոտական համապատասխան բաժիններում:

L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության որոշումը: 0,1 մլ ֆերմենտային պրեպարատը ինկուբացվել է 37^{0}C-ում, 60 րոպեների ընթացքում, 0,1 Մ պիրոֆոսֆատային բուֆերում (pH 8,3) համապատասխան տարբեր սուբստրատների (10 մկմոլ L-ալանին, L-մեթիոնին, L-վալին, L-գլյուտամինաթթու) առկայությամբ անընդհատ թափահարելով: Ինկուբացիոն խառնուրդում ռեակցիան կանգնեցվել է 0,5 մլ 0,2% 2.4 դինիտրոֆենիլհիդրազինով, ապա ավելացվել է 2 մլ 0.1N NaOH [Baudhuin et al 1964]: Ստացված գույնի ինտենսիվությունը որոշվել է գունաչափման մեթոդով ФЕК-56, λ=570 նմ: Ֆերմենտի ակտիվությունն արտահայտվել է առաջացած կետոթթվի (որոշ դեպքերում առաջացած ամոնիակի) մկմոլերով՝ հաշված 1գ միցելում:

Ամոնիակի որոշումը: Ամոնիակը որոշվում է Զելինգսոնի միկրոդիֆուզիոն մեթոդով [Zelingson .et al., 1951]՝ձևափոխված Սիլակովայի և աշխատակիցների կողմից [Силакова и др. 1962]: Մեթոդի էությունը կայանում է նրանում, որ հերմետիկորեն փակված հատուկ միկրոդիֆուզիոն անոթներում KOH-ի միջոցով ինկուբացիոն խառնուրդից NH_3-ը դուրս է մղվում և կապվում է ձողիկների վրա գտնվող 1 Ն H_2SO_4-ի հետ՝ առաջացնելով ջրալուծ ծծմբաթթվային աղ՝ $(NH_4)_2SO_4$, որի քանակությունը որոշվում է գունաչափման եղանակով՝ Նեսսլերի ռեակտիվի հետ փոխազդման արդյունքում առաջացած կոմպլեքս միացության դեղին գունավորման շնորհիվ:

Ստացված արդյունքների վիճակագրական մշակումը իրականացվել է Ստյուդենտ- Ֆիշերի տարբերությունների և հավաստիության մեթոդի կիրառմամբ:

բեր ներկայացուցիչների թույների L-ամինաթթվային օքսիդազներ, որոնք տարբերվում են իրենց հակաբակտերիալ ազդեցությամբ և սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ: Հեղինակները կարողացել են մաքրել L-ամինաթթվային օքսիդազի 2 իզոֆերմենտներ, որոնցից մեկի ակտիվությունը կրկնակի բարձր է եղել մյուսից [Stiles et. al 1991]: Streptomyces բակտերիաների տարբեր շտամներում հայտնաբերվել են L-ամինաթթվային օքսիդազի տարբեր իզոէնզիմներ՝ օժտված տարբեր սուբստրա-տային սպեցիֆիկությամբ: Հստակ ցույց է տրված, որ նշված բակտերիաների L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոֆերմենտները ցուցաբերում են տարբեր զգայնություն տարբեր մետաղների իոնների նկատմամբ [Виноградов 1980]: Բերված գրականության տվյալները վկայում են այն մասին, որ L-ամինաթթվային օքսիդազները ունեն հարուստ իզոէնզիմային սպեկտոր:

Մեր կողմից հետազոտած բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոֆերմենտների գոյության հարցը պարզաբանելու նպատակով ուսումնասիրվել է H_2O_2–ի կոնցենտրացիայի փոփոխման պայմաններում ամինաթթուներից յուրաքանչյուրի դեզամինացման ակտիվության տոկոսային փոփոխությունը 4 ամինաթթուների գումարային ակտիվությունից: Հետազոտությունները հստակ ցույց տվեցին, որ H_2O_2 կոնցենտրացիայի փոփոխման պայմաններում, թեև փոփոխվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը ամինաթթուների նկատմամբ, բայց յուրաքանչյուր ամինաթթվի դեզամինացման տոկոսային ակտիվությանը բոլոր ամինաթթուների գումարային ակտիվությունից նմում է նույնը: Այսպես H_2O_2–ի բոլոր կոնցենտրացիաների դեպքում L ալանինի դեզամինացման ակտիվությունը բոլոր ամինաթթուների գումարային ակտիվության նկատմամբ կազմում է 20%, L- մեթիոնինը 32%, L-վալինինը 28%, L գլյուտամինաթթվինը 20%: Այս տվյալները անժխտելի խոսում են այն մասին, որ հետազոտվող բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազան չունի իզոֆերմենտներ: Այդ մասին է խոսում նաև այն, որ տարբեր երկվալենտ մետաղների իոններ օգտագործելիս փոխվում է առանձին ամինաթթուների դեզամինացման ակտիվությունը, բայց հետաքրքիրն այն է, որ յուրաքանչյուր իոնի առկայությամբ նույնն է մնում նրանց դեզամինացման ակտիվացման տոկոսը:

Հետազոտվել է նաև բորբոսասնկերում գլյուտամատ- և ալանին դեհիդրոգենազների առկայությունը և նրանց դերը համապատասխան ամինաթթուների դեզամինացման հարցում: Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ հետազոտվող բորբոսասնկերում պարունակվում են գլյուտամատ- և ալանին դեհիդրոգենազներ, բայց նրանք գործում են կետոթթուների ամինացման, այլ ոչ թե համապատասխան ամինաթթուների դեզամինացման ուղղությամբ: Դեռևս 1937թ. Բրաունշտեյնը և նրա աշխատակիցները ցույց տվեցին, որ կենդանիների հոմոգենատներում գլյուտամատ եհիդրոգենազների և տրանսամինազների համատեղ գործունեությամբ ապահովվում է ըստ էության բոլոր ամինաթթուների անուղղակի դեզամինացումը տրանսդեզամինացման մեխանիզմով [Браунштейн, Крицман 1937; Браунштейн Азарх 1944, Браунштейн 1949]: Մեր ամբիոնի նախորդ հետազոտություններով ցույց էր տրվել, որ հյուսվածքների հոմոգենատներում տրանսդեզամինացման մեխանիզմը գործել չի կարող, քանի որ հոմոգենատներում ազատ ամոնիակի հեռացման հնարավորությունները բացակայում են և ամոնիակը կուտակվում է միջավայրում՝ արգելակելով ամինաթթուների դեզամինացումը: Ամինաթթուները դեզամինացնող

[Krippeit et al. 1995] և բազմաթիվ այլ պրոցեսներ: Հետաքրքրություն է ներկայացնում H_2O_2–ով Neyrospora crassa բորբոսասնկերի պրոլիֆերացիայի և դիֆերենցման սկզբնավորման խթանումը [Hansberg et al. 1993]:

Ցույց է տրվել, որ CO_2–ի ցածր կոնցենտրացիաները խթանում են H_2O_2–ի թունավոր ազդեցությունը միկրոօրգանիզմների վրա, որի հիման վրա հեղինակ-ները առաջարկում են այդ երևույթը օգտագործել որպես ջրի մաքրման միջոց [Martirosyan et al. 2010]:

Ցույց է տրվել, որ H_2O_2 –ի բարձր դոզան արգելակում է Sach. cerevisiae խմորասնկերի աճը, մինչդեռ ցածր դոզան՝ ակտիվացնում է: Նույն պայմաններում ստատիկ մագնիսական դաշտը և բարձր հզորությամբ վիբրացիան առաջին 20 րոպեներում ճնշում են խմորասնկերի աճը և 2 ժամ անց խթանում են այն: Հեղինակները եզրակացնում են, որ ստատիկ մագնիսական դաշտը և ծայրահեղ բարձր հզորությամբ վիբրացիան բարձրացնում են H_2O_2–ի մակարդակը [Bagdasaryan, Ayrapetyan 2006] :

Ցույց է տրվել, որ 4 հց ծայրահեղ ցածր հաճախականությամբ էլեկտրամագնիսական դաշտը և H_2O_2-ը ճնշում են Na^+ -K^+ պոմպով ինդուկցված սրտամկանի կծկողականությունը, իսկ ինֆրաձայնը, հակառակը, ուժեղացնում է Na^+-K^+ պոմպի ինհիբիցիան: Հեղինակները եզրակացնում են, որ H_2O_2 -ը մեսենջեր է, որի միջոցով իրականացվում է էլեկտրամագնիսական դաշտի ազդեցությունը սրտամկանի վրա, մինչդեռ ինֆրաձայնի սրտի կծկողականության ճնշելը պայմանավորված է CO_2-ի լուծելիության անկումով [Ayrapetyan et al. 2007] :

Բերված գրականության տվյալներից բխում է, որ H_2O_2 –ը բարձր կոնցենտրացիաներով ունի ցիտոտոքսիկ ազդեցություն, իսկ ցածր կոնցենտրացիաներով խթանում է բազմաթիվ բջջային ֆունկցիաներ, այդ թվում ֆերմենտների ինդուկցիան:

Մեր առաջ խնդիր է դրվել գտնել L-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցման եղանակ՝ վերջինիս հատկությունները ուսումնասիրելու համար: Մեր լաբորատորիայի նախկին հետազոտություններում ցույց է տրվել, որ L-ամինաթթվային օքսիդազը տեղակայված է բջիջների պերօքսիսոմալ որոշ ֆրակցիաներում: Պարզվել է, որ պերօքսիսոմները անչափ զգայուն են սննդամիջավայրի բաղադրության փոփոխության նկատմամբ և ինդուկցվում են միջավայրում ամինաթթուներից բացի NH_3-ի ոչ մեծ քանակությունների առկայության դեպքում: Մեր կողմից մշակված այս ինդուկցիայի ֆերմենտատիվ ելքը բարձր չէր, ուստի խնդիր դրվեց մշակել ինդուկցիայի ավելի արդյունավետ եղանակներ: Մեզ հաջողվեց ցույց տալ, որ բորբոսասնկերի աճման միջավայրում 0,009Մ կոնցենտրացիայով H_2O_2 ավելացնելու դեպքում դրսևորվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը, իսկ H_2O_2-ի կոնցենտրացիան կրկնապատկելիս (0,018 Մ) L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը բարձրանում է ավելի քան 50%-ով: Սակայն H_2O_2–ի կոնցենտրացիայի հետագա բարձրացումը իջեցնում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցիան:

Այս տվյալները համապատասխանում են գրականության տվյալներին, որոնց համաձայն H_2O_2–ի բարձր կոնցենտրացիաները ընկճում են որոշակի բջջային ֆունկցիաներ, իսկ ցածր կոնցենտրացիաները խթանում են նույն պրոցեսները:

Խիստ անբավարար են ուսումնասիրված L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոէնզիմների գոյության հարցերը: Հետազոտված է ավստրալիական կոբրայի 30 տար-

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

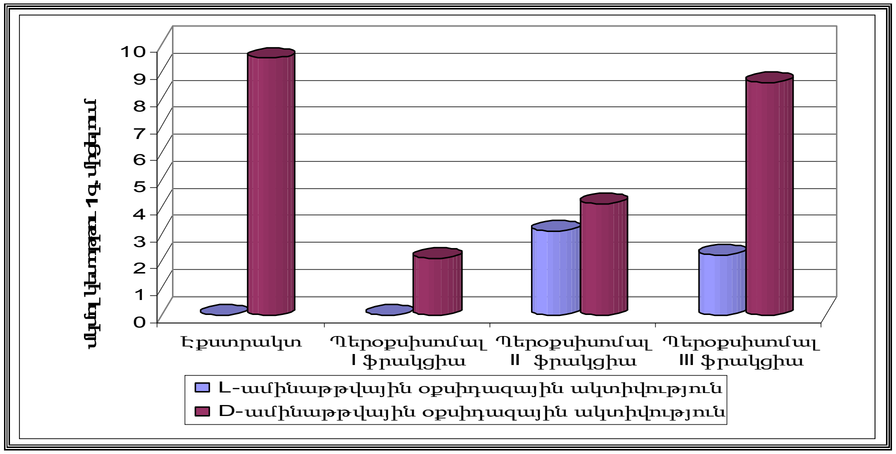
Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը: Հայտնի է, որ պերօքսիսոմների համար մարկերային են ուրատօքսիդազան, D-ամինաթթվային օքսիդազան, L-ամինաթթվային օքսիդազան, կատալազան, տրիպտոֆան պիրոլազան: Ներկայումս մեծ ուշադրություն է դարձվում այն հանգամանքի վրա, որ պերօքսիսոմալ ֆերմենտների գործունեության ընթացքում առաջանում է H_2O_2, որն ունի բազմապիսի ազդեցություն կենդանի բջիջների վրա: H_2O_2-ի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում հիմնականում ճնշվում է բջիջների կենսաբանական ակտիվությունն ընդհուպ մինչև ապոպտոզի զարգացումը, իսկ ցածր կոնցենտրացիաներով խթանում է բջիջների բազմաթիվ ֆունկցիաներ [Ikebuchi et al., 1991; Гамалей и др. 1991; Лапинский А. Г, 1994; Zor et al., 2006; Qin et al. 2007]

Հետաքրքիր է, որ օձերի թույների ազդեցության ներքո ակտիվանում է L- ամինաթթվային օքսիդազը, որի գործունեության ընթացքում արտադրվող H_2O_2-ը ամենայն հավանականությամբ պայմանավորում է ապոպտոզի զարգացումը [Sur, Kim 1999]:

Այսպիսով, ջրածնի պերօքսիդը խթանելով L-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցիան, խթանում է նաև ջրածնի պերօքսիդի արտադրությունը: Նման հետազոտություններ պերօքսիսոմների մակարդակով գրականության մեջ չկան, մինչդեռ պերօքսիսոմներում կողք-կողքի պարունակվում են և L-ամինաթթվային օքսիդազ, որը արտադրում է ջրածնի պերօքսիդ և նրան քայքայող ֆերմենտը՝ կատալազը: Նշված ֆերմենտների փոխհարաբերությունների պարզաբանումը, անկասկած, ներկայացնում է գիտական մեծ հետաքրքրություն:

Մեր լաբորատորիայի նախորդ հետազոտություններում ցույց է տրվել, որ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում գոյություն ունեն պերօքսիսոմների տարբեր ֆրակցիաներ, որոնք արտաքին միջավայրի ազդեցության ներքո (հատկապես սննդային միջավայրի փոփոխության պայմաններում) կրում են քանակական և որակական փոփոխություններ [Папоян и др. 2001]: Պարզվել է, որ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերից անջատված պերօքսիսոմալ 3 ֆրակցիաներից 2-ը ցուցաբերում են L-ամինաթթվային օքսիդազային ակտիվություն: Մինչդեռ բորբոսասնկերի էքստրակտներում այդ ֆերմենտի ակտիվությունը բացակայում է: Եզրակացվել է, որ պերօքսիսոմներն ամենայն հավանականությամբ ֆերմենտի գործունեության ժամանակ անջատված ամոնիակը արտազատում են պերօքսիսոմներից դուրս և դրանով ապահովում են դեզամինացնող ֆերմենտի անմիջական շրջապատում NH_3-ի ցածր կոնցենտրացիաներ, որոնք չեն ընկճում այդ ֆերմենտների ակտիվությունը: Այս բացատրությունը հնարավորություն է տալիս հասկանալ էքստրակտներում ֆերմենտատիվ դեզամինացման բացակայության պայմաններում պերօքսիսոմների L-ամինաթթուների դեզամինացնող ակտիվության դրսևորումը [Davtyan et al 2000]:

Նախ և առաջ մեր առջև խնդիր էր դրվել վերարտադրել մեր լաբորատորիայի նախկին հետազոտությունները Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության հայտնաբերման ուղղությամբ: Այդ նպատակով բորբոսասնկի աճեցման համար մեր կողմից օգտագործվել է 100 մլ Ռոլենի սննդամիջավայր, որում գլյուկոզի և L-ալանինի քանակությունները



Գծ,1 L- և D-ամինաթթվային օքսիդազների ակտիվությունը Asp.niger R-3 բորբոսասնկերի էքստրակտներում և նրանից անջատված պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում

փոփոխվել են (0.5% D-գլյուկոզ և 0.1գրամ L-ալանին 100 մլ-ում) և այդ պայմաններում L-ամինաթթվային օքսիդազը դրսևորել է իր առավելագույն ակտիվությունը: Ստացված փորձարարական տվյալները բերված են գծապատկեր 1-ում, որտեղից պարզ երևում է, որ բորբոսասնկերի էքստրակտներում պարունակվում է D-ամինաթթվային օքսիդազա, որի ակտիվությունը կազմում է 9.5 մկմոլ կետոթթու 1 գ. միցելում, իսկ նրանում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը բացակայում է: Դա բացատրվում է հյուսվածքների հոմոգենիզացման ժամանակ ամինաթթուների դեզամինացման ընդհատմամբ՝ կապված NH_3-ի չեզոքացման և հեռացման գործընթացների խանգարման հետ: Այնուհետև սկզբնական էքստրակտից անջատվել են պերօքսիսոմներ պարունակող երեք (I, II, III) ֆրակցիաներ, որը հաստատվել է պերօքսիսոմների օրգանոսպեցիֆիկ մարկերային ֆերմենտի՝ D-ամինաթթվային օքսիդազի առկայությամբ: Ինչ վերաբերվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությանը, ապա այն հայտնաբերվում է պերօքսիսոմներ պարունակող II և III ֆրակցիաներում իսկ I-ին ֆրակցիայում բացակայում է, ինչն էլ համապատասխանում է մեր լաբորատորիայի նախորդ փորձարարական տվյալներին:

L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը ջրածնի պերօքսիդի տարբեր կոնցենտրացիաների պայմաններում աճեցված Asp.niger R-3 բորբոսասնկերում:
Ուսումնասիրվել է H_2O_2-ի տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա: Այդ նպատակով սունկն աճեցվել է տարբեր կոնցենտրացիաների (0,009 Մ, 0.018 Մ, 0.027Մ, 0.045 Մ) H_2O_2 պարունակող սննդամիջավայրերում: Գծապատկեր 2-ում ներկայացված փորձնական արդյունքները վկայում են, որ բորբոսասնկերի աճման ժամանակ H_2O_2-ի տարբեր կոնցենտրացիաները տարբեր ազդեցություն են թողնում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Աճման միջավայրում H_2O_2–ի բացակայության պայմաններում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվություն չի դրսևորվում: Սննդամիջավայրում 0.009Մ H_2O_2

շրջանում տիրում էր այն կարծիքը, որ L-ամինաթթվային օքսիդազը ունի սահմանափակ տարածվածություն բնության մեջ: Հետագայում հետազոտման մեթոդների կատարելագործմանը զուգահեռ ընդլայնվել է այդ ֆերմենտը պարունակող օրգանիզմների ցանկը: Մեր ամբիոնում ապացուցվել է L-ամինաթթվային օքսիդազի առկայությունը Candida ցեղի խմորասնկերում՝ շնորհիվ այդ ֆերմենտի ինդուկցիայի եղանակի մշակման: Մասնավորապես ցույց է տրվել, որ նշված խմորասնկերի աճման միջավայր $(NH_4)_2SO_4$, չնչին կոնցենտրացիաներ ավելացնելուց ինդուկցվում է L-ամինաթթվային օքսիդազը: Այդ պայմաններում սինթեզվում է գլուտամին, որը ապահովում է պուրինային և պիրիմիդինային նուկլեոտիդների, հիստիդինի և այլ կարևոր ազոտ պարունակող միացությունների կենսասինթեզը: L-ամինաթթվային օքսիդազը ավելի ցայտուն ինդուկցվում է, երբ $(NH_4)_2SO_4$-ի փոխարեն սննդամիջավայր է ավելացվում խմորասնկային էքստրակտ, որը հարուստ է աճը խթանող բազմաթիվ ցածրամոլեկուլյար միացություններով [Давтян, Багдасарян 1985]:

Ներկայումս լայն սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ L-ամինաթթվային օքսիդազներ հայտնաբերվել են Penicillium, Aspergilus niger, Neyrospora crassa, բորբոսասնկերի մոտ, սակայն ֆերմենտի շատ հատկություններ դեռևս անբավարար են ուսումնասիրված [Pelmont et al., 1972; Duerre, Chakrafarty, 1975; Папоян 1999]:

L-ամինաթթվային օքսիդազի ուսումնասիրությունների համար խթան հանդիսացան ֆերմենտի տարբեր բջջային պրոցեսներում ունեցած դերի վերաբերյալ նոր տվյալները: Մասնավորապես ցույց է տրված, որ Lechevalieria aerocolonigenes ATCC 39243 բակտերիաների L-ամինաթթվային օքսիդազը դեզամինացնում է տրիպտոֆանին առաջացնելով α-կետո-β-ինդոլիլ-պրոպիոնաթթու և այնուհետև 7-քլորտրիպտոֆան, որն ընդգրկվում է ռեբեկամիցին անտիբիոտիկի կենսասինթեզի մեջ: Հետաքրքիրն այն է, որ նշված միկրոօրգանիզմներում բացի L-ամինաթթվային օքսիդազի գենից կան ևս 10 գեներ, որոնք կոդավորում են ռեբեկամիցինի կենսասինթեզի համար անհրաժեշտ տարբեր սպիտակուցների սինթեզը [Nishizawa et. al 2003]:

Ապացուցված է, որ օձերի թույները օժտված են հակաբակտերիալ ազդեցությամբ, որում գլխավոր դերը պատկանում է L-ամինաթթվային օքսիդազին [Ahn et. al 1997; Suhr, Kim 1999; Macheraux 2004]:

Մկների կաթի մեջ նույնպես հայտնաբերված է L-ամինաթթվային օքսիդազ, որը պաշտպանում է կաթին բակտերիաներից [Sun et al 2002]:

Գրականության ակնարկում բերված են բազմաթիվ տվյալներ զանազան օձերի թույնի ազդեցության մեխանիզմների վերաբերյալ, որոնցում ամենաէականը L-ամինաթթվային օքսիդազի և նրա գործունեության ընթացքում արտադրվող ջրածնի պերօքսիդի ապոպտոզը խթանելու հատկությունն է [Torii et al 1997; Lu et al, 2002]:

Անհրաժեշտ է նշել, որ սկսած անցյալ դարի 90–ական թվականներից H_2O_2–ը դարձավ բազմակողմանի ուսումնասիրման նյութ: Այն 0.1-50.0 մկՄ կոնցենտրացիայով խթանում է բազմաթիվ կենսաբանական պրոցեսներ, մասնավորապես խթանում է էպիթելյալ բջիջների և թրոմբոցիտների ցիկլոօքսիգենազային ակտիվությունը, որը բերում է պրոստոգլանդինների սեկրեցիայի ուժեղացման [Pratico et al. 1991]: Խթանում է մակրոֆագերի ֆագոցիտոզը [Gamaley et al. 1994], ակտիվացնում է պրոտեինկինազա C-ին [Shasby et al. 1988], տարբեր ֆոսֆոլիպազների [Zor et al., 2006; Qin et al. 2007], բջիջների պլազմատիկ թաղանթի կալիումական խողովակները

Աղյուսակ 4.

Asp. niger R-3 բորբոսանկերում L- ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա հիդրօքսիլ ամինի (NH_2OH) ազդեցությունը (մկմոլ ամոնիակ 1գ միցելում n=5, $p<0.05$)

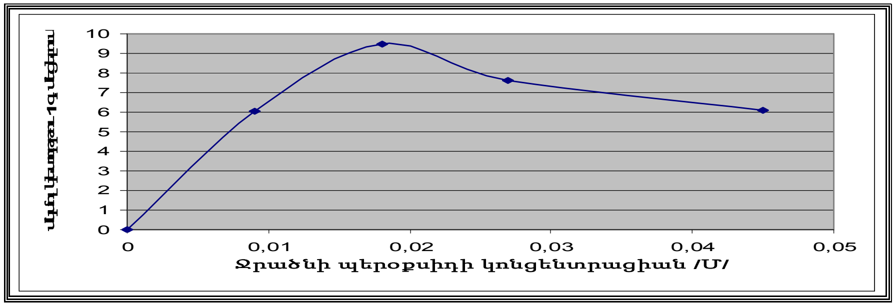
Սուբստրատ	(NH_2OH) -ի առկայությամբ	(NH_2OH) -ի բացակայությամբ
Էքստրակտ		
L-ալանին	0	0
L-մեթիոնին	0	0
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա		
L-ալանին	14,8±0,2	14,8±0,1
L-մեթիոնին	12,1±0,1	12,2±0,1
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա		
L-ալանին	12±0,1	12±0,2
L-մեթիոնին	10,3±0,1	9,3±0,5

նաև զուրկ է տրանսդեզամինացման հնարավորությունից: Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիայում ալանինի դեզամինացումը L-ամինաթթվային օքսիդազով կազմում է 16մկմոլ NH_3 1գ միցելում, որը ԳԵՖ-ի առկայության դեպքում մնում է նույնը: L-մեթիոնինի դեզամինացման դեպքում ԳԵՖ-ի բացակայությամբ կազմում է 13 մկմոլ NH_3 1գրամ միցելում, իսկ նրա առկայության դեպքում` դարձյալ նույնն է: Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիայում L-ալանինի դեզամինացումը ԳԵՖ-ի և' բացակայության, և' առկայության պայմաններում կազմում է 14 մկմոլ $NH_3$ 1գ միցելում, իսկ L-մեթիոնինի դեզամինացման դեպքում` 12 մկմոլ NH_3: Այս տվյալները հստակ ցույց են տալիս, որ գլյուտամինաթվի դեհիդրոգենազի ընկճումը ԳԵՖ-ով բացարձակապես չի անդրադառնում ամոնիակագոյացման պրոցեսի վրա: Այլ կերպ ասած Asp. niger R-3 բորբոսանկերում L-ամինաթթվային օքսիդազից բացի ամինաթթուներից ամոնիակագոյացման այլ մեխանիզմ գոյություն չունի: Վերջին եզրակացությունը հաստատվում է նաև NH_2OH-ի 0,2 x 10^{-3}Մ կոնցենտրացիայով տրանսամինազների ընկճման պայմաններում փորձերի արդյունքներով: Այսպես (աղ. 4) պերօքսիսոմալ II ֆրակցիայում L-ալանինի և L-մեթիոնինի դեզամինացման ինտենսիվությունները համապատասխանաբար կազմում են 14,8 մկմոլ և 12 մկմոլ NH_3 1գ միցելում, և այդ ցուցանիշները փոփոխության չեն ենթարկվում NH_2OH-ի առկայությամբ նշված սուբստրատները դեզամինացնելիս: Նմանատիպ պատկեր ստացվում է նաև պերօքսիսոմալ III ֆրակցիայում, այսինքն և' L-ալանինի և' L-մեթիոնինի դեզամինացման ինտենսիվությունները NH_2OH-ի ազդեցության պայմաններում մնում են անփոփոխ:

Այսպիսով, մեր հետազոտությունները հստակ ցույց են տալիս, որ Asp. niger R-3 բորբոսանկերում առկա է L-ամինաթթվային օքսիդազը և NH_3-ի առաջացման ուղղությամբ L-ամինաթթվային օքսիդազից բացի, ամոնիակագոյացման այլ մեխանիզմ չի գործում:

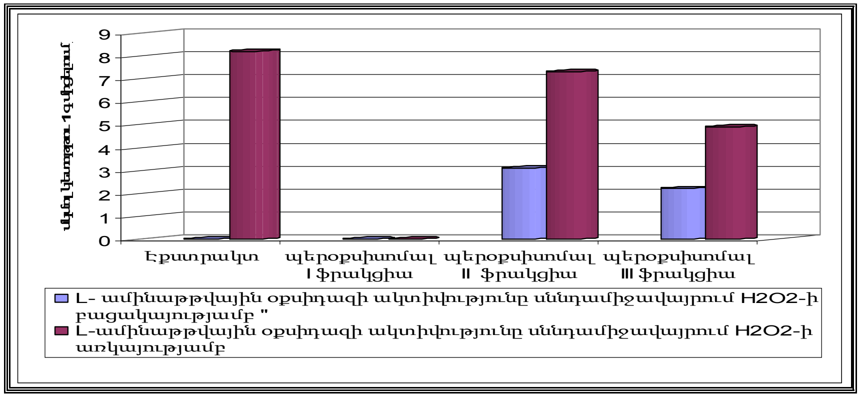
ԱՄՓՈՓՈՒՄ

L-ամինաթթվային օքսիդազները թեև հայտնաբերվել են գրեթե մեկ դար առաջ, դեռևս նրանց հետ կապված բազմաթիվ հարցեր պարզաբանված չեն: Սկզբնական



Գծապատկեր 2. Asp.niger R-3-ի բորբոսանկի L ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը կախված աճման միջավայրում ջրածնի պերօքսիդի կոնցենտրացիայից

ավելացնելիս ինդուկցվում է L-ամինաթթվային օքսիդազը, որի ակտիվությունը 0-ից հասնում է 6.01 մկմոլ կետոթթու 1գ. միցելում: Սննդամիջավայրում H_2O_2-ի կոնցենտրացիան կրկնակի անգամ բարձրացնելիս (0.018Մ H_2O_2) L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը բարձրանում է` 6.04 մկմոլից հասնելով 9.5 մկմոլ կետոթթու 1գ. միցելում, այսինքն ֆերմենտի ակտիվությունը 1.5 անգամ բարձրանում է: Սակայն H_2O_2–ի կոնցենտրացիաների հետագա բարձրացումները բերում են L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության անկման: Այսպես, H_2O_2–ի 0,027 Մ կոնցենտրացիայի դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը 9.5 մկմոլից իջնում է մինչև 7.6 մկմոլ կետոթթու 1գ. միցելում, իսկ 0.045Մ կոնցենտրացիայի դեպքում`7.6 մկմոլից մինչև 6.1 մկմոլ: Ինչպես արդեն նշվել է, մեր լաբորատորիայի նախորդ աշխատանքներում ցույց էր տրված, որ L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը դրսևորվում է Asp. niger R-3 բորբոսանկերից անջատված 3 պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներից 2-ում (II և III): Մեր փորձերում հետազոտվել է 0,009Մ կոնցենտրացիայով H_2O_2 պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված բորբոսանկերի պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը: Փորձնական արդյունքներն ամփոփված են գծապատկեր 3-ում, որտեղից հստակ երևում է, որ H_2O_2 պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված բորբոսանկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը զգալի բարձր է պերօքսիսոմալ II և III ֆրակցիաներում համեմատած առանց H_2O_2–ի տարբերակի հետ: Պերօքսիսոմալ I ֆրակցիայում ֆերմենտի ակտիվությունը չի բարձրանում, որտեղ, հավանաբար, L–ամինաթթվային օքսիդազան բացակայում է: Այսպիսով ևս մեկ անգամ ցույց է տրվում, որ H_2O_2 –ի կոնցենտրացիայից կախված փոխվում է նրա ազդեցության բնույթը: Այս եզրակացությունը համահունչ է գրականության մեջ հայտնի տվյալների հետ, որոնց համաձայն H_2O_2 բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում առաջանում են բջիջների տարբեր վնասվածքներ, իսկ ցածր կոնցետրացիաների դեպքում դրսևորվում է բջիջների կենսագործունեության ակտիվացում: Այսպես` H_2O_2–ի 0.1-2.5 մկՄ կոնցենտրացիայով ընկճում է գլիկոլիզը, [Sprage et.al 1985; Schrautsteer et. al 1987] բարձրանում է ներբջջային Ca-ի կոնցենտրացիան [Ikebuchi et al.,1991], սպառվում ԱԵՖ–ի քանակությունը, խզվում ԴՆԹ-ի շղթաները և այլն [Sprage et.al 1996; Кузнецов 1993], իսկ ցածր կոնցենտրացիաների դեպքում (50 մկՄ և ցածր) բջջում չեն առաջ գալիս ֆունկցիոնալ



Գծապատկեր 3 **Ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա Asp. Niger R-3 բորբոսասնկի պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում**

խախտումներ [Oosting 1990], ակտիվանում են պլազմատիկ մեմբրանի K-ական խողովակները [Kuo et.al 1993; Krippeit et.al 1994; 1995] խթանվում է պրոստոգլանդինների արտադրությունը [Ager, Cordon 1983], թիրոիդային հորմոնների բիոսինթեզը [Dupuy et.al 1991], ակտիվանում են պրոտեին կինազա C-ն [Heffetz et al., 1992], տարբեր ֆոսֆոլիպազներ [Goldman et.al 1992; Rao et. al 1995] և այլն:

Կարելի էր ենթադրել, որ ֆերմենտի H_2O_2–ով ակտիվացման պատճառը կարող էր լինել H_2O_2–ից գոյացող թթվածինը: Այդ հարցի պարզաբանման նպատակով մեր կողմից ուսումնասիրվել է մոլեկուլյար թթվածնով աճման միջավայրը անընդհատ աէրացիայի ենթարկելու պայմաններում L- ամինաթթվային օքսիդազայի ակտիվության փոփոխությունը: Փորձերը ցույց տվեցին, որ մոլեկուլյար թթվածինը մեր փորձի պայմաններում չի խթանում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը: Այլ կերպ ասած, ջրածնի պերօքսիդի խթանիչ ազդեցությունը L-ամինաթթվային օքսիդազայի ակտիվության վրա կապված չէ ջրածնի պերօքսիդից գոյացող թթվածնից:

Asp.niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազի իզոէնզիմների գոյության հարցը: Հաջորդ հարցը, որն անհրաժեշտ է ուսումնասիրել, դա Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազների իզոէնզիմների գոյության հնարավորությունն է: Գրականության ակնարկում բերված տվյալներից բխում է, որ տարբեր օբյեկտներից անջատված և մաքրված L-ամինաթթվային օքսիդազները տարբերվում են դեզամինացման ենթարկող ամինաթթուների թվով, ինչպես նաև դրանց դեզամինացման ինտենսիվությամբ: Այսպես, առնետների երիկամների L-ամինաթթվային օքսիդազը դեզամինացնում է 13 ամինաթթուներ, N. crassa բորբոսասնկերը՝ 18 [Meister et. al 1960], Anacystis nidulans կապտականաչ ջրիմուռները՝ 4 [Pictorius et. al 1986], Vipera Lebetin օձի թույնը՝ 7 [Tonismagi et. al 2006], Hebeloma սնկի շտամների միցելները՝ 7, Laccaria bicolor սունկը՝ 5 ամինաթթուներ [Timonena 2008], Streptomyces բակտերիայի շտամներում հայտնաբերվել է միայն L-գլյուտամինաթթուն դեզամինացնող ամինաթթվային օքսիդազ և անվանվել L-գլյուտամինաթթվի օքսիդազ [Виноградова и др. 1999]: Asp.

մանակ աստիճանաբար նվազում է 2,36 մկմոլ-ից՝ II ֆրակցիայում հասնելով 0,9 մկմոլ, III ֆրակցիայում՝1,2 մկմոլ: Ստացված տվյալները վկայում են, որ հետազոտվող բորբոսասնկերում գոյություն ունի գլյուտամատ դեհիդրոգենազ, որի ակտիվությունը մեր փորձի պայմաններում միջավայրում NH_3–ի կուտակման պատճառով թեքված է դեպի α-կետոգլյուտարաթթվի ամինացումը, այլ կերպ ասած մեր փորձի պայմաններում ամինաթթուների տրանսդեզամինացման մեխանիզմը չի գործում: Սակայն ինտակտ բորբոսասնկերում, որոնցում պահպանված է առաջացած NH_3-ի հեռացման հնարավորությունը, ամենայն հավանականությամբ, կարող է գործել տրանսդեզամինացման մեխանիզմ: Աղյուսակ 1 և 2-ում բերված տվյալները ցույց են տալիս, որ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում գլյուտամատ դեհիդրոգենազի ակտիվությունից բացի առկա է նաև ալանին դեհիդրոգենազային ակտիվություն, որը նույնպես գործում է միայն պիրոխաղողաթթուն ամինացնելու ուղղությամբ: ՆԱԴՀ-ի քանակությունը ալանինդեհիդրոգենազի գործունեության ընթացքում նույնպես նվազում է: Այսպիսով կարող ենք ընդհանրացնել, որ հետազոտվող բորբոսասնկերում գոյություն ունի ինչպես L-գլյուտամատ-, այնպես էլ L-ալանին դեհիդրոգենազներ, որոնք մեր փորձերի պայմաններում գործում են միայն համապատասխան կետոթթուների ամինացման ուղղությամբ:

Asp. Niger R-3 բորբոսասնկի պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում գլյուտամատ դեհիդրոգենազի և տրանսամինազների արգելակիչների առկայության պայմաններում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության ուսումնասիրումը: Տրանսդեզամինացման մեխանիզմի բացակայության վերաբերյալ մեր եզրակացությունը ավելի համոզեցուցիչ դարձնելու նպատակով խնդիր է դրվել ուսումնասիրել L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը գլյուտամատ դեհիդրոգենազի ինհիբիտոր ԳԵՖ-ի և տրանսամինազների ինհիբիտոր հիդրօքսիլ ամինի (NH_2OH) առկայությամբ, ելնելով այն նկատառումներից, որ մեր փորձի պայմաններում եթե գործեր տրանսդեզամինացման մեխանիզմը, ապա պերօքսիսոմալ II և III ֆրակցիաներում տրանսդեզամինացման արգելակիչների (ԳԵՖ, NH_2OH) առկայության պայմաններում ամոնիակագոյացման պրոցեսը պետք է նվազեր: Ստացված արդյունքները ամփոփված են աղյուսակ 3-ում և 4-ում: Բերված տվյալներից պարզ երևում է, որ բորբոսասնկային էքստրակտը, որտեղ բացակայում է L-ամինաթթվային օքսիդազը,

Աղյուսակ 3.

Asp. niger R-3 բորբոսասնկի L- ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա ԳԵՖ-ի ազդեցությունը (մկմոլ ամոնիակ 1գ միցելում n=5, $p<0.05$)

Սուբստրատ	ԳԵֆ-ի առկայությամբ	ԳԵֆ-ի բացակայությամբ
Էքստրակտ		
L-ալանին	0	0
L-մեթիոնին	0	0
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա		
L-ալանին	16,3±0,5	16±0,5
L-մեթիոնին	13±0,3	13±0,4
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա		
L-ալանին	14±0,1	14±0,2
L-մեթիոնին	12±0,3	12±0,1

Աղյուսակ 1.

α-կետոգլյուտարաթթվի և պիրոխաղողաթթվի ամինացման ակտիվությունները համապատասխանաբար գլյուտամինաթթվի և ալանին դեհիդրոգենազների ազդեցությամբ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում (n=5, p<0,05)

Սուբստարտները և կոֆերմենտները մկմոլերով 3 մլ ինկուբացիոն ծավալում / Ֆրակցիաներ	α-կետոգլյուտարաթթու ՆԱԴH-ի քանակությունը (մկմոլ)		պիրոխաղողաթթու ՆԱԴH-ի քանակությունը (մկմոլ)	
	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո
Վերնստվածք	2,5	2,36±0,1	2,5	2,2±0,2
Միտոքոնդրումներ	2,5	0,7±0,3	2,5	0,32±0,03
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա	2,5	0,9±0,3	2,5	1,1±0,1
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա	2,5	1,2±0,2	2,5	1,3±0,1
Ցիտոզոլ	2,5	հետքեր	2,5	հետքեր

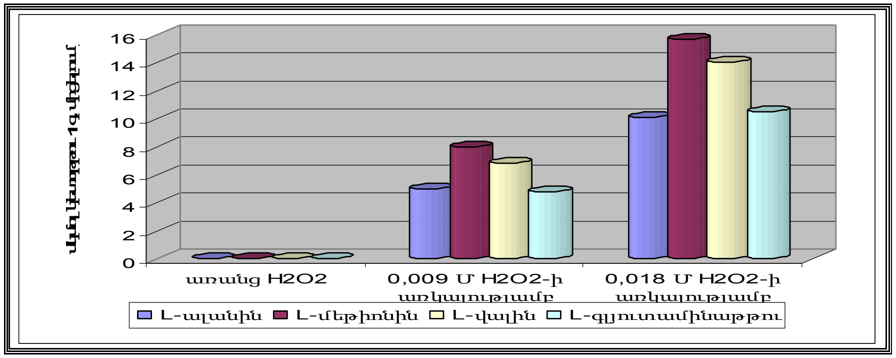
340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում: Ալանին դեհիդրոգենազի ակտիվությունը որոշվել է նույն ձևով, միայն α-կետոգլյուտարաթթվի փոխարեն օգտագործվել է պիրոխաղողաթթու և գլյուտամինաթթվի փոխարեն՝ L-ալանին: Համապատասխան արդյունքները ներկայացված են 1 և 2 աղյուսակներում:

Աղյուսակ 2.

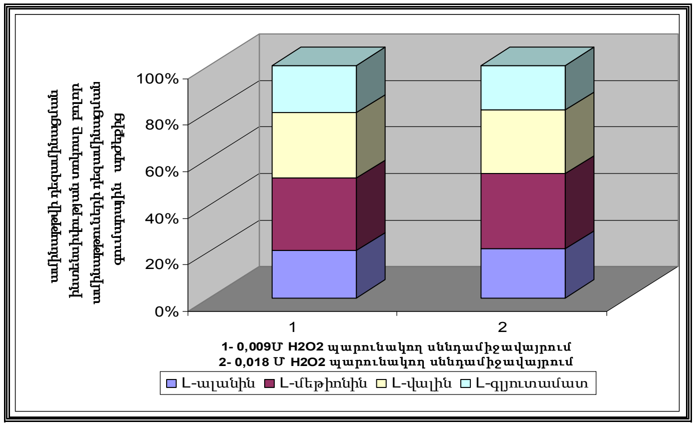
Գլյուտամինաթթվի և ալանինի դեզամինացման ակտիվությունները Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում (n=5, p<0,05)

Սուբստարտները և կոֆերմենտները մկմոլերով 3 մլ ինկուբացիոն ծավալում / Ֆրակցիաներ	L -գլյուտամինաթթու ՆԱԴ-ի քանակությունը (մկմոլ)		L -ալանին ՆԱԴ-ի քանակությունը (մկմոլ)	
	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո
Վերնստվածք	2,5	2,4±0,4	2,5	2,3±0,5
Միտոքոնդրումներ	2,5	2,1±0,02	2,5	2,1±0,6
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա	2,5	2,6±0,01	2,5	2,2±0,3
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա	2,5	2,4±0,02	2,5	2,5±0,1
Ցիտոզոլ	2,5	2,4±0,1	2,5	2,3±0,3

Տվյալներից պարզ երևում է, որ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի էքստրակտից անջատված բոլոր ֆրակցիաները L-գլյուտամինաթթվի կամ L-ալանինի ներկայությամբ ինկուբացնելիս ՆԱԴ-ից ՆԱԴH-ի գոյացում տեղի չի ունենում, այլ ընդհակառակը ՆԱԴH-ի քանակությունը գնալով պակասում է: Այսպես մինչև ինկուբացիան և ինկուբացիայից հետո ֆրակցիաներում ՆԱԴ-ի քանակությունը չի փոխվում (2,5 մկմոլ 3մլ ինկուբացիոն ծավալում): Մինչդեռ ՆԱԴH-ի քանակությունը ինկուբացիայի ժա-



Գծապատկեր 4, **Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը տարբեր L-ամինաթթուների դեզամինացման ինտենսիվության վրա**

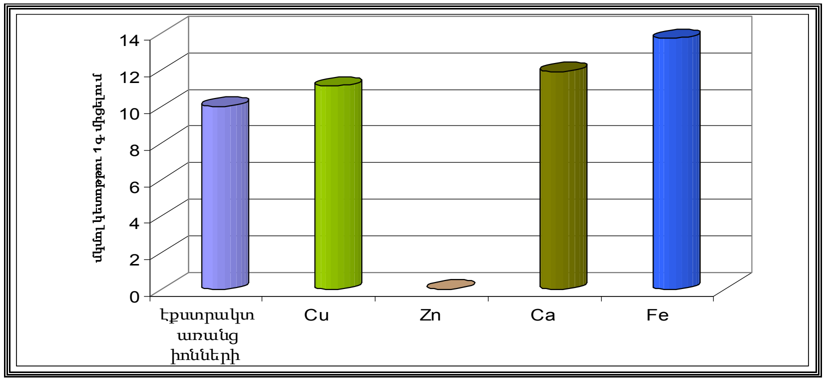


Գծ. 5, H_2O_2 տարբեր կոնցենտրացիաներ պարունակող սննդամիջավայրերում աճեցված A. niger բորբոսասնկերում տարբեր ամինաթթուների դեզամինացման ինտենսիվության տոկոսը բոլոր ամինաթթուների դեզամինացման գումարային ակտիվությունից

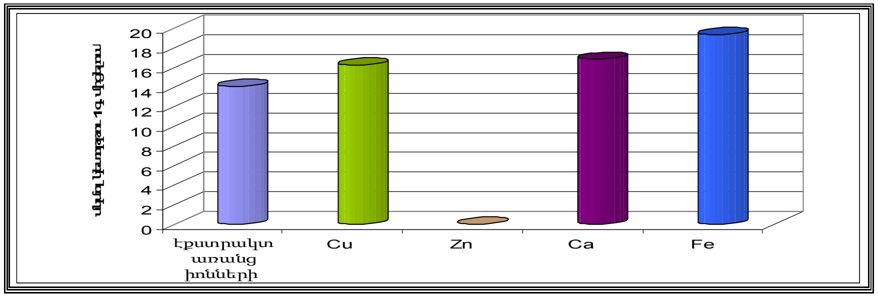
niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազների իզոֆերմենտների գոյության հարցը պարզաբանելու համար հետազոտել ենք տվյալ օբյեկտի էքստրակտում 4 տարբեր ամինաթթուների (L-ալանին, L-մեթիոնին, L-վալին, L-գլյուտամինաթթու) դեզամինացման ինտենսիվությունը սննդամիջավայրում H_2O_2–ի բացակայության և առկայության պայմաններում: Հետազոտության արդյունքները ներկայացված են 4 և 5 գծապատկերներում: Ինչպես և սպասվում էր, առանց H_2O_2 աճեցված բորբոսասնկի էքստրակտում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվություն չի հայտնաբերվել, իսկ H_2O_2–ով ինդուկցումից հետո ֆերմենտի ակտիվություն հայտնաբերվում է: Ընդ որում սնկի աճման միջավայրում H_2O_2–ի կոնցենտրացիան

կրկնապատկելիս (0.009 Մ–ից մինչև 0.018 Մ) զգալի խթանվում է L-ամինաթթվային օքսիդազի ինդուկցիան: Առավել հետաքրքիր է այն, որ ամինաթթուների հերթականությունն ըստ նրանց դեզամինացման ակտիվության (L-մեթիոնին > L-վալին > L-ալանին >L-գլյուտա-մինաթթու) չի փոխվում: Բնականաբար, մնում է նույնը նաև յուրաքանչյուր ամինաթթվի դեզամինացման ինտենսիվության տոկոսը բոլոր ամինաթթուների դեզամինացման գումարային արժեքից: Այս տվյալները վկայում են, որ հետազոտվող բորբոսասնկերում առկա է մեկ ֆերմենտ առանց իզոֆերմենտների:

<u>**Երկվալենտ մետաղական իոնների ազդեցությունը ջրածնի պերօքսիդ պարունակող սննդամիջավայրում աճեցված Asp.niger R-3 բորբոսասնկերի L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա:**</u> Մեր կողմից հետազոտվել է երկվալենտ մետաղների իոնների ազդեցությունը Asp. niger R-3 բորբոսասնկի L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա: Բորբոսասունկն աճեցվել է 0.5%D-գլյուկոզ, 0.1գ L-ալանին, 0.009Մ H_2O_2 և 0,6 մոլ տարբեր երկվալենտ մետաղների (Ca, Zn, Ca, Fe) իոններ պարունակող 100 մլ սննդամիջավայրերում: Ստացված փորձնական տվյալներն ամփոփված են 5 և 6 գծապատկերներում: Արդյունքները ցույց են տալիս, որ փորձարկված մետաղների իոնները որոշակի ազդեցություն են թողնում Asp. niger R-3 բորբոսասնկի L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա: Մասնավորապես, L-ալանինի դեզամինացումն աննշան է խթանվում Cu^{++} իոններով (10%), Ca^{++} իոններով–19% և զգալի է Fe^{++}իոններով ակտիվացումը –37%, մինչդեռ Zn^{++} իոնները լրիվ ընկճում են ֆերմենտի ակտիվությունը: L-մեթիոնինի դեզամինացման վրա հիշատակված իոնների մետաղները թողնում են L-ալանինի դեզամինացմանը նման ազդեցություն: Այսպես, Cu^{++}իոնները, ինչպես L-ալանինի դեզամինացման դեպքում էր, թույլ են ակտիվացնում են L-ամինաթթվային օքսիդազը 15.7%-ով, Ca^{++}իոնների ազդեցության դեպքում և' L-ալանին և' L-մեթիոնին ամինաթթուների դեզամինացումը ակտիվանում է 19-20%-ով, Fe^{++}իոնների դեպքում և' L-ալանինի, և' L-մեթիոնինի դեզամինացումը խթանվում է 37%-ով, Zn^{++}իոնների դեպքում և' L-ալանինի, և L'-մեթիոնինի դեզամինացումը լրիվ արգելակվում է:



Գծապատկեր 6 **L-ալանինի դեզամինացման ինտենսիվության վրա երկվալենտ մետաղների իոնների ազդեցությունը Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում**



Գծապատկեր 7. **L-մեթիոնինի դեզամինացման ինտենսիվության վրա երկվալենտ մետաղների իոնների ազդեցությունը Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում**

Գրականության մեջ հայտնի տվյալներում Anacystis nidulans կանաչ ջրիմուռների L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությունը ճնշվում է մետաղների կատիոններով՝ (Cu^{++}, Zn^{++}, Fe^{++}, Ca^{++}, Mg^{++}) [Pictorius, Voss 1986]: Streptomyces բակտերիաների տարբեր շտամների L-գլյուտամինաթթվի օքսիդազը մետաղների իոնների նկատմամբ ցուցաբերում է տարբեր զգայնություն: Str. sp. x-119-6, sp. A-7700, St. cattley platensis NTU 3304 շտամների նշված ֆերմենտի ակտիվությունը, մինչդեռ St.Cattley ֆերմենտի ակտիվության վրա ոչ մի ազդեցություն չեն թողնում [Виноградов 1980]: Մեր փորձարարական և գրականության տվյալներից բխում է, որ մետաղների իոնների նկատմամբ L-ամինաթթվային օքսիդազի զգանության տեսակետից նկատվում է մեծ խայտաբղետություն: Այնպես որ, մետաղների իոնների նկատմամբ զգայնության դրսևորման ընդհանուր օրինաչափություններ չեն նկատվում: Բայց հետաքրքիրն այն է, որ մետաղների իոնների ազդեցության պայմաններում առանձին ամինաթթուների (L-ալանին, L-մեթիոնին) դեզամինացման ակտիվացման տոկոսը մնում է նույնը: Այս տվյալները նույնպես խոսում են այն մասին, որ մեր կողմից հետազոտված օբյեկտում գոյություն ունի L-ամինաթթվային օքսիդազի միայն մեկ ֆերմենտ և բացակայում են իզոֆերմենտները:

<u>**Գլյուտամինաթթվի և ալանինի դեհիդրոգենազների գոյության հարցը Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում**</u>**:** Հարց է առաջանում Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում պերօքսիսոմալ L-ամինաթթվային օքսիդազով ամոնիակագոյացումից բացի ամինաթթուներից NH_3–ի առաջացման այլ մեխանիզմների գոյության մասին: Մասնավորապես, հետաքրքիր է հետազոտել գլյուտամինաթթվի և ալանին դեհիդրոգենազների գոյության հարցը: Այդ նպատակով α-կետոգլյուտարաթթվի ամինացումը գլյուտամինաթթվի դեհիդրոգենազի ազդեցության տակ որոշելու համար 1մլ բորբոսասնկային պերօքսիսոմալ ֆրակցիան, որը պարունակում է 0.6-1մգ սպիտակուց, ինկուբացվել է 30 մկՄոլ α-կետոգլյուտարաթթվի, 2.7 մկմոլ ածխածնաթթվային ամոնիակի և 2.5 մկմոլ ՆԱԴH-ի առկայությամբ՝ 1 ժամ տևողությամբ: Ինկուբացիոն միջավայրի ծավալը կազմել է 3մլ 0.1Մ Ka/Na ֆոսֆատային բուֆերում pH=7.4: Գլյուտամինաթթվի դեզամինացման ակտիվությունը որոշելու համար α-կետոգլյուտարաթթվի փոխարեն վերցվել է L-գլյուտամինաթթու և հանվել քացախաթթվային ամոնիումը, ինչպես նաև ՆԱԴH-ի փոխարեն վերցվել է ՆԱԴ: Ֆերմենտային ակտիվությունը որոշվել է ՆԱԴH-ի կամ ՆԱԴ-ի քանակության նվազումը չափելով

Աղյուսակ 1.

α-կետոգլյուտարաթթվի և պիրոխաղողաթթվի ամինացման ակտիվությունները համապատասխանաբար գլյուտամինաթթվի և ալանին դեհիդրոգենազների ազդեցությամբ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում (n=5, p<0,05)

Սուբստրատները և կոֆերմենտները մկմոլերով 3 մլ ինկուբացիոն ծավալում / Ֆրակցիաներ	α-կետոգլյուտարաթթու ՆԱԴH-ի քանակությունը (մկմոլ)		պիրոխաղողաթթու ՆԱԴH-ի քանակությունը (մկմոլ)	
	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո
Վերնստվածք	2,5	2,36±0,1	2,5	2,2±0,2
Միտոքոնդրումներ	2,5	0,7±0,3	2,5	0,32±0,03
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա	2,5	0,9±0,3	2,5	1,1±0,1
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա	2,5	1,2±0,2	2,5	1,3±0,1
Ցիտոզոլ	2,5	հետքեր	2,5	հետքեր

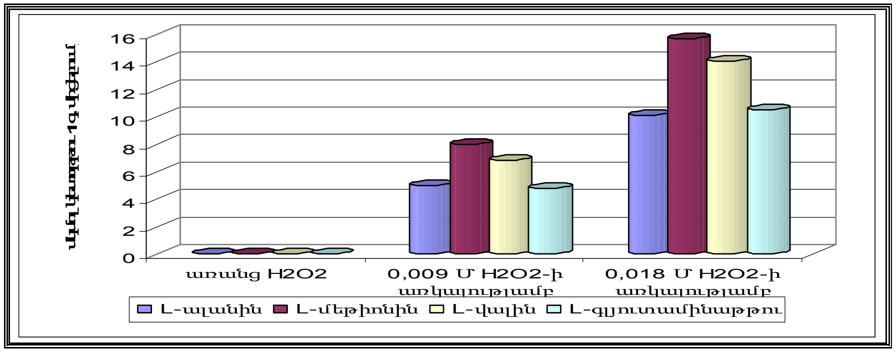
340 նմ ալիքի երկարության պայմաններում: Ալանին դեհիդրոգենազի ակտիվությունը որոշվել է նույն ձևով, միայն α-կետոգլյուտարաթթվի փոխարեն օգտագործվել է պիրոխաղողաթթու և գլյուտամինաթթվի փոխարեն՝ L-ալանին: Համապատասխան արդյունքները ներկայացված են 1 և 2 աղյուսակներում:

Աղյուսակ 2.

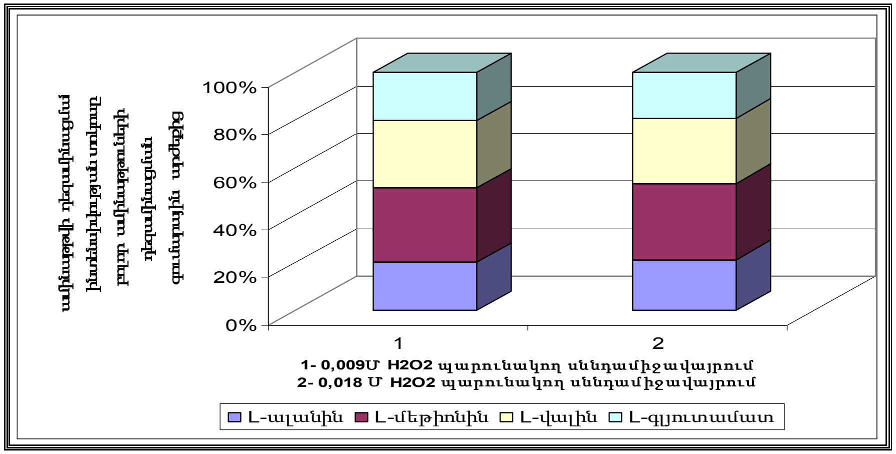
Գլյուտամինաթթվի և ալանինի դեզամինացման ակտիվությունները Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում (n=5, p<0,05)

Սուբստրատները և կոֆերմենտները մկմոլերով 3 մլ ինկուբացիոն ծավալում / Ֆրակցիաներ	L -գլյուտամինաթթու ՆԱԴ-ի քանակությունը (մկմոլ)		L -ալանին ՆԱԴ-ի քանակությունը (մկմոլ)	
	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո	մինչև ինկուբացիա	Ինկուբացիայից հետո
Վերնստվածք	2,5	2,4±0,4	2,5	2,3±0,5
Միտոքոնդրումներ	2,5	2,1±0,02	2,5	2,1±0,6
Պերօքսիսոմալ II ֆրակցիա	2,5	2,6±0,01	2,5	2,2±0,3
Պերօքսիսոմալ III ֆրակցիա	2,5	2,4±0,02	2,5	2,5±0,1
Ցիտոզոլ	2,5	2,4±0,1	2,5	2,3±0,3

Տվյալներից պարզ երևում է, որ Asp. niger R-3 բորբոսասնկերի էքստրակտից անջատված բոլոր ֆրակցիաները L-գլյուտամինաթթվի կամ L-ալանինի ներկայությամբ ինկուբացնելիս ՆԱԴ-ից ՆԱԴH-ի գոյացում տեղի չի ունենում, այլ ընդհակառակը ՆԱԴH-ի քանակությունը գնալով պակասում է: Այսպես մինչև ինկուբացիան և ինկուբացիայից հետո ֆրակցիաներում ՆԱԴ-ի քանակությունը չի փոխվում (2,5 մկմոլ 3մլ ինկուբացիոն ծավալում): Մինչդեռ ՆԱԴH-ի քանակությունը ինկուբացիայի ժա-



Գծապատկեր 4, **Asp. niger R-3 բորբոսասնկերում ջրածնի պերօքսիդի ազդեցությունը տարբեր L-ամինաթթուների դեզամինացման ինտենսիվության վրա**



Գծ. 5, H_2O_2 տարբեր կոնցենտրացիաներ պարունակող սննդամիջավայրերում աճեցված A. niger բորբոսասնկերում տարբեր ամինաթթուների դեզամինացման ինտենսիվության տոկոսը բոլոր ամինաթթուների դեզամինացման գումարային ակտիվությունից

niger R-3 բորբոսասնկերում L-ամինաթթվային օքսիդազների իզոֆերմենտների գոյության հարցը պարզաբանելու համար հետազոտել ենք տվյալ օբյեկտի էքստրակտում 4 տարբեր ամինաթթուների (L-ալանին, L-մեթիոնին, L-վալին, L-գլյուտամինաթթու) դեզամինացման ինտենսիվությունը սննդամիջավայրում H_2O_2–ի բացակայության և առկայության պայմաններում: Հետազոտության արդյունքները ներկայացված են 4 և 5 գծապատկերներում: Ինչպես և սպասվում էր, առանց H_2O_2 աճեցված բորբոսասնկի էքստրակտում L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվություն չի հայտնաբերվել, իսկ H_2O_2–ով ինդուկցումից հետո ֆերմենտի ակտիվություն հայտնաբերվում է: Ընդ որում սնկի աճման միջավայրում H_2O_2–ի կոնցենտրացիան