

4. Попадюк С. С. Дослідження генетичного потенціалу та природної резистентності гуцульської породи коней: Автореф. дис. канд. с.-г. наук / С. С. Попадюк; Львівська держ. акад. вет. мед. ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2002. – 16 с.
5. Функциональная морфология иммунной системы / Бородин Ю. И., Григорьев В. Н., Летагин А. Ю. и др. – Новосибирск: Наука, 1987. – 240 с.

УДК. 577.1

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ, РИБОЗО-5-ФОСФАТИЗОМЕРАЗЫ, РИБУЛОЗО-5-ФОСФАТЭПИМИРАЗЫ ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС

Кубышин В. Л., Томашева Е. В.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь.

Неокислительные реакции, катализируемые транскетолазой (ТК), рибозофосфатизомеразой (Ри-5-ФИ) и рибулозофосфатэпимеразой (Ру-5-ФЭ) имеют фундаментальное значение в общем метаболизме растений и животных. Исследования указанных ферментов в своей основе ориентированы на их выделение и очистку из одной ткани и в одном эксперименте.

Описанные в литературе методы изолирования Ри-5-ФИ [1, 2], Ру-5-ФЭ [3] и ТК [4] из тканей животных очень трудоемки, длительны и сложны в исполнении. Метод выделения препаратов изомеразы/эпимеразы не гарантирует полного исключения ТК активности [5]. Даже при аффинной хроматографии [6] не удастся полностью разделить транскетолазу и изомеразу/эпимеразу. Это послужило предпосылкой для разработки простого, быстрого и эффективного метода изолирования изомеразы/эпимеразы и ТК из печени крыс.

В нашей работе предлагается метод фракционирования полиэтиленгликолем (ПЭГ) ТК, Ри-5-ФИ, Ру-5-ФЭ из печени крыс с последующей ионообменной хроматографией ферментных препаратов, пригодных для определения ксилулозо-5-фосфата (К-5-Ф) и общих фосфопентоз (ФП) в растворах и экстрактах тканей различных биологических объектов.

Печень крыс (25 г), отмытая от крови перфузией холодным физиологическим раствором, гомогенизировали на холоде (+4°C) в 50 мМ трис-НСl буферном растворе рН 7,5 в соотношении 1:5 (масса/объем). После экстракции белков в течение одного часа гомогенат центрифугировали при 30 000 g. В осветленный раствор порционно вносили ПЭГ (6 кДа) до 6%-го насыщения. Через 15 мин высаливания раствор

центрифугировали 30 мин при 15 000 g. Второе высаливание проводили при 12%-м насыщении ПЭГ. Режим центрифугирования тот же. Распределение специфической активности ферментов при фракционировании указано в таблице.

Насыщение ПЭГ белково-го экстракта, %	Активность ТК, %	Активность изомер-зы/эпимеразы фосфопентоз, %
6 (осадок)	0,5	4,1
6-12 (осадок)	90,5	9,3
6-12 (супернатант)	5	86,5

Представленные в таблице данные характеризуют эффективное разделение исследуемых ферментов на стадии фракционирования ПЭГ.

Осадок, полученный при 12%-м насыщении ПЭГ, растворяется в 0,01 М трис-НСI буферном растворе рН 7,4 и наносится на колонку 3×8 см заполненной фосфоцеллюлозой и уравновешенной этим же буферным раствором. Скорость потока 5-7 мл за 10 мин. ТК связывается ионообменником и после промывки (около 1,5 л буферного раствора) фермент элюируется стартовым буферным раствором, содержащим 10 мМ пирифосфата натрия. Фракции белка, определяемые при 280 нм, собираются на коллекторе и с наибольшей ферментативной активностью объединяются, концентрируются на ультрафильтраторе. В полученный ферментный препарат добавляют 25% глицерина и хранят при -5°C. После проведенной стадии очистки транскеталаза практически не содержит пентозофосфатметабилизирующую активность.

Супернатант, полученный после второго высаливания ПЭГ, используют для выделения и очистки Ри-5-ФИ, Ру-5-ФЭ, которых в растворе содержится около 86% от исходной активности в гомогенате. Дальнейшее овьшение концентрации ПЭГ не способствовало высаливанию белков, к тому же увеличилась вязкость раствора, которая не давала возможности получить осадок при центрифугировании.

Для удаления ПЭГ и дальнейшей очистки Ри-5-ФИ, Ру-5-ФЭ используется ионообменник ДЭАЭ, которым заполняется колонка 3х8 см, уравновешенная 10 мМ трис НСI буферным раствором рН 7,5. Пентозофосфаты, содержащиеся в Ри-5-ФИ, Ру-5-ФЭ, связываются с ионообменником и отмываются от ПЭГ и балластных белков исходным буфером. Элюцию ферментов проводили с использованием 0,1М (NH₄)₂SO₄ в рабочем буферном растворе. Скорость элюции 5-7 мл за 10 мин. В собранных фракциях определяли оптическую плотность при 280 нм и измерили ферментативную активность Ри-5-ФИ, которая ниже Ру-5-ФЭ активности в печени крыс в четыре раза. Собранные фракции объединили и после диализа против 50 мМ трис-НСI буферного раствора рН 7,6 концентрировали при помощи ультрафильтрато-

ра. Ферментативный препарат может храниться в замороженном состоянии без изменения активности свыше 3 месяцев.

Выделенные ферментные препараты пригодны для определения концентрации К-5-Ф и суммы ФП в экстрактах тканей животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rutner A.C. // *Biochem.* 1970. Vol. 9. N 1. P. 178-184.
2. Domagk G.F., Alexander W. R., Doering K. M. // *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 1974. Bd 355. S. 781-786.
3. Wood T. // *Biochim. et Biophys. Acta E.* 1979. Vol. 507. P. 352-362.
4. Sasajima K., Yoneda M. // *Agricult. and Biol. Chem.* 1974. Vol. 38, N 7. P.1297-1303.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980.
6. Paoletti F., Aldinucci D. // *Arch. Of Biochem. And Biophys.* 1986. Vol. 245, N 1. P. 212-219.

УДК 577.164.11

АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА В₁ ПРИ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ У МЫШЕЙ

Кудырко Т. Г., Русина И. М., Колос И. К., Макаричов А. Ф.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси
г. Гродно, Республика Беларусь

В предыдущих исследованиях [1] нами было установлено, что фосфорилированные производные тиамин проявляют антигипоксическую активность при гиперкапнической гипоксии у мышей. В частности, введение тиаминмонофосфата (тмф) и аденозин-тиаминтрифосфата (аттф) в дозах 30 мг/кг массы увеличивало продолжительность жизни животных соответственно на 34-36% и 14%. Сукцинат – известный антигипоксический агент, вводимый в дозе 200 мг/кг, обладал менее выраженным эффектом по сравнению с тмф. При использовании сочетания сукцината с тмф антигипоксическое действие составило 50%.

В настоящей работе исследовалась антигипоксическая активность нефосфорилированного тиамин и его комбинации с сукцинатом. Эксперимент проводили на белых мышках-самцах массой 29-32 г. Для развития гипоксии животные опытной группы сажались поодиночке в стеклянные банки объемом 0,32 л с крышками-закрутками [2]. Формирование экспериментальных групп осуществлялось методом случайного отбора без предварительного ранжирования животных по степени устойчивости к гипоксии. Вещества вводили однократно внутривентриально в объеме 1 мл, тиамин в дозе 100 мг/кг массы, сукцинат –