

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 579.222: 577.152.35+577.112.083

## АРГІНАЗА І ЛЮДИНИ ІЗ РЕКОМБІНАНТНИХ ДРІЖДЖІВ *Hansenula polymorpha*: ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕНЗИМУ

Н. Є. СТАСЮК<sup>1,2</sup>, Г. З. ГАЙДА<sup>1</sup>, Є. П. КОВАЛЬЧУК<sup>2</sup>,  
О. В. СТАСИК<sup>1</sup>, М. В. ГОНЧАР<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України, Львів;

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;  
e-mail: stasuk\_natalia@ukr.net

Методом афінної хроматографії на синтезованому сорбенті L-аргінін-макропористе скло одержано електрофоретично гомогенні препарати аргінази І людини. Досліджено фізико-хімічні параметри очищеного ензиму: термо- та рН-стабільність, температурний та рН-оптимуми, а також встановлено вплив іонів металів та інших добавок на активність та стабільність ензиму.

Ключові слова: рекомбінантні дріжджі *Hansenula polymorpha*, аргіназа І людини, L-аргінін, афінний сорбент.

Аргіназа (3.5.3.1; L-аргінін-амідиногідролаза) – це ензим, який відіграє вирішальну роль у гідролітичному перетворенні L-аргінину на L-орнітин та сечовину. В організмі людини присутні дві ізоформи аргінази: аргіназа І (знаходиться в цитоплазмі клітин печінки) – функціонує в циклі сечовини і аргіназа ІІ (локалізована в мітохондріях деяких тканин організму людини, особливо в клітинах нирок), яка регулює концентрацію аргінін/орнітин у клітині та не бере участі в циклі сечовини [1–4].

Відомо, що аргіназа може служити ефективним засобом в ензимотерапії деяких видів раку [5–10]. Через високу вартість аргінази І та відсутність вітчизняного препарату, актуальною залишається проблема пошуку альтернативного джерела цього ензиму, дуже перспективного для лікування та діагностики. Природними джерелами аргінази є внутрішні органи ссавців [11], еритроцити крові [12], злоскісні пухлини [5], рослини [13, 14], цвільові гриби [15], а також мікробні рекомбінантні клітини – дріжджі [16–18] і бактерії [10, 19, 20].

Аналіз даних літератури щодо методів одержання очищеної аргінази з різних джерел показав, що виділення ензиму є багатостадійною процедурою, а вихід його внаслідок очищення є зазвичай низьким [11–14, 16, 23, 24]. В останні роки розроблено ефективні підходи для одержання препаратів аргінази І людини

з бактерій [10] методом афінної, а саме, Ni-хелатної хроматографії модифікованої аргінази, що має на N-кінці шість залишків гістидину. Такі технології є зручними, але надто дорогими.

Одним із напрямів одержання препаратів аргінази є створення мікробних рекомбінантних продуцентів ензиму. Раніше ми повідомляли про генно-інженерне конструювання дріжджових надпродуцентів аргінази І людини. Як реципієнтний організм було обрано термотолерантні метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha*, які є добре вивченою ефективною евкаріотичною платформою для експресії різноманітних гетерологічних протеїнів [17, 18].

Іншим напрямом досліджень стала розробка економічно вигідних методів одержання високоочищених препаратів аргінази з клітин дріжджів *H. polymorpha*. Здійснено синтез афінних сорбентів із L-аргініном як лігандом з використанням таких мінеральних матриць: силохрому С-120 амінопропілового, макропористого скла із контрольованим розміром пор (МПС), силохромів С-80 та С-120 [21]. Порівняння різних афінних сорбентів показало, що сорбент аргінін-МПС є оптимальним для виділення аргінази І печінки людини з безклітинних екстрактів (БЕ) рекомбінантного штаму-надпродуцента. Запропоновано спосіб виділення та очищення аргінази, який за допомогою колонкової хроматографії на афінному сорбенті аргінін-МПС дозволяє одержати

препарати ензиму, гомогенні за результатами електрофоретичного аналізу в ПААГ [21]. Запропонований метод очищення аргінази здійснюється лише в одну стадію, з 11%-ним виходом у найактивніших фракціях, тоді як відомі способи одержання ензиму здійснюються в декілька етапів.

Метою нашої роботи є одержання високоочищеного препарату аргінази І методом афінної хроматографії та вивчення фізико-хімічних і ензиматичних властивостей, а також способів його стабілізації при зберіганні.

### Матеріали і методи

Як продуцент внутрішньоклітинної аргінази І печінки людини використовували сконструйовані у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України рекомбінантний штам дріжджів NCYC 495 *H. polymorpha: pGAP1-HsARG1 leu2car1 Sc: LEU2* [17, 18]. Штам містить цільовий ген *HsARG1* під контролем конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази. Вихідний штам зберігали на скосах або чашках Петрі з агаром на мінеральному середовищі такого складу:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г/л;  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  – 3,5 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 г/л;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1 г/л; сахароза – 20 г/л; мікроелементи – 0,5 мг/л; біотин – 1 мкг/л; аргінін та аденін – 1 мМ. Для одержання біомаси клітини пересівали із свіжих чашок у пробірки із мінеральним середовищем, що містило аргінін і аденін (1 мМ) та культивували при 30 °С на шейкері з постійною аерацією (240 об/хв) протягом 1–2 діб. Одержаний інокулят засівали в колби до концентрації клітин 0,01–0,04 мг/мл та культивували на шейкері протягом 1–5 діб в залежності від мети експерименту. Клітини осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хв та потім відмивали водою.

Оптичну густину клітин вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП (кювета 3 мм, світлофільтр № 6) і за калібрувальним графіком визначали суху біомасу їх в 1 мл середовища.

Для одержання безклітинного екстракту (БЕ) відмиті від середовища клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі (діаметр скляних кульок 0,5 мм, 1000 об/хв,  $r_{\text{cep}}$  10 см, 6 хв, 4 °С). БЕ відділяли від осколків клітин центрифугуванням при 15 000 g,  $r_{\text{cep}}$  8 см, 15 хв, 4 °С. Концентрацію протеїну в БЕ визначали методом Лоурі.

Рекомбінантну аргіназу виділяли з БЕ шляхом афінної колонкової хроматографії за

розробленою нами схемою [21]. Для цього на колонку (2 x 10 см), заповнену 15 мл сорбенту аргінін-МПС у трис-буфері з рН 8,8 (ТБ) нанесли БЕ. Сорбент послідовно промивали стартовим буфером ТБ, розчинами 0,1 М NaCl/ТБ і 0,5 М NaCl/ТБ, контролюючи активність аргінази в елюатах. Ензим поступово елюювали розчинами 1 М NaCl/ТБ; 2 М NaCl/ТБ і 25%-го ізопропанолу з 1 М NaCl/ТБ. Ступінь очищення аргінази від баластних протеїнів характеризували за її активністю та концентрацією протеїну в БЕ і у кожній фракції, що збирали. Очистку контролювали електрофоретично в 15% ПААГ з додаванням SDS за методом Леммлі.

Активність аргінази визначали за швидкістю розщеплення аргініну до орнітину та сечовини. Для цього до 200 мкл преінкубованого при 37 °С протягом 10 хв субстрату, що містив 65 мМ L-Arg, 2 мМ манган (II) хлорид у 20 мМ буфері трис-ОН, рН 9,5, додавали 20 мкл досліджуваного зразка (або 20 мкл буфера ТБ для «сліпої» проби). Реакційну суміш інкубували протягом 15 хв при 37 °С. Концентрацію сечовини визначали за інструкцією до «Набору для визначення сечовини» виробництва НВФ «СІМКО», Львів [22].

За одиницю активності аргінази (мкмоль·хв<sup>-1</sup>) обирали таку кількість ензиму, яка забезпечує утворення 1 мкмоль продукту (сечовини) за 1 хв в ензиматичній реакції при 37 °С.

Питому активність аргінази ( $A_{\text{пит}}$ ) розраховували за формулою:

$$A_{\text{пит}} = \frac{C_{\text{сеч}}}{t \cdot C_6} \cdot \left( \frac{V_s + V_e}{V_e} \right)$$

де  $A_{\text{пит}}$  – питома активність ензиму, мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> протеїну;  $V_s$  – об'єм субстратної суміші для аргінази (мл);  $V_e$  – об'єм аліквоти розчину протеїнів, взятої для аналізу, мл;  $t$  – час ензиматичної реакції, хв;  $C_6$  – концентрація протеїну, визначена методом Лоурі в аналізованому розчині, мг/мл;  $C_{\text{сеч}}$  – концентрація продукту (сечовини), мкмоль/мл.

Очищений препарат аргінази з максимальною питомою активністю було використано для вивчення її фізико-хімічних та ензиматичних властивостей.

Досліди проводили в чотирьох–шести повторях. Результати досліджень обробляли статистично із використанням програми Origin 6.0.

Таблиця 1. Характеристика хроматографічного очищення аргінази на сорбенті аргінін-МПС

Етапи очищення	V, мл	C <sub>протеїну</sub> , мг/мл	Сумарний протеїн, мг	Активність, А		Вихід, %	Очищення, раз
				*Питома	**Сумарна		
Безклітинний екстракт (БЕ)	25	9,2	230,3	94,1	21668	=100	1
Проскок + промивання, ТБ	40	2,44	97,6	1,48	144,4	0,67	–
Промивання 1: 0,1 М NaCl, ТБ	75	0,14	10,5	2,25	24	0,11	–
Промивання 2: 0,5 М NaCl, ТБ	53	0,19	10,1	28,7	289,4	1,33	–
<i>Елюція 1 М NaCl/ТБ</i>							
1	22	0,048	1,06	5798	6123	28	62
2	21	0,044	0,92	2636	2436	11,2	28
3	30	0,038	1,14	1679	1914	8,8	18
<i>Елюція 2 М NaCl/ТБ</i>							
4	19	0,027	0,51	3759	1928,5	8,9	40
5	16	0,058	0,93	2793	2592	2,0	30
6	20	0,053	1,06	613,2	650	3,0	7
<i>Елюція 25% ізопропанол/2 М NaCl/ТБ</i>							
7	10	0,046	0,46	504,2	232	1,1	–
8	22	0,035	0,77	79	60,5	0,28	–

\*Питома активність аргінази, мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>; \*\*сумарна активність аргінази (мкмоль·хв<sup>-1</sup>), визначена як добуток питомої активності і сумарного протеїну

### Результати та обговорення

Результати хроматографічного очищення аргінази з БЕ штаму надпродуцента за розробленою нами схемою наведено у табл. 1 та на рис. 1. Одержано аналітичну кількість очищеного в 60 разів (за питомою активністю) препарату рекомбінантної аргінази І печінки людини. Вихід очищеного ензиму в найактивніших фракціях (елюатів 1 М NaCl) становить 28 та 11%. Згідно з даними літератури, всі відомі способи виділення та хроматографічного очищення з різних джерел [11–23] здійснюються в декілька етапів, тоді як на афінному сорбенті аргінін-МПС – лише в одну стадію.

Одержані препарати електрофоретично гомогенної аргінази (рис. 2) з питомою активністю близько  $2,6 \cdot 10^3$  мкмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> використовували для імунологічних досліджень, які проводили у відділі сигнальних механізмів клітини ІБК НАН України (дані не представлено), а також для вивчення фізико-хімічних та ензиматичних характеристик аргінази.

Визначення молекулярної маси (*M*) внутрішньоклітинної очищеної рекомбінантної аргінази І людини проводили за порівнянням електрофоретичної рухливості в SDS-ПААГ аргінази і маркерних протеїнів з відомою *M*. За допомогою афінної хроматографії як видно з електрофореграми, одержано електрофоретично гомогенний препарат аргінази І.

Протеїнова зона субодиниць очищеної аргінази, визначена методом SDS-ПААГ (рис. 3), має *M* близько 38 кДа (відповідно *M* тримеру холоензиму – близько 114 кДа), що корелює з даними літератури відносно *M* аргінази із печінки людини [11].

На рис. 4, *A* представлені результати визначення температурного оптимуму активності аргінази: розчин субстрату преінкубували 5 хв при фіксованій температурі (8, 25, 37, 50–100 °С), додавали препарат аргінази та у водяній бані при фіксованій температурі проводили аналіз активності аргінази (протягом 5 хв). Як видно з рис. 4, *A*, оптимальною

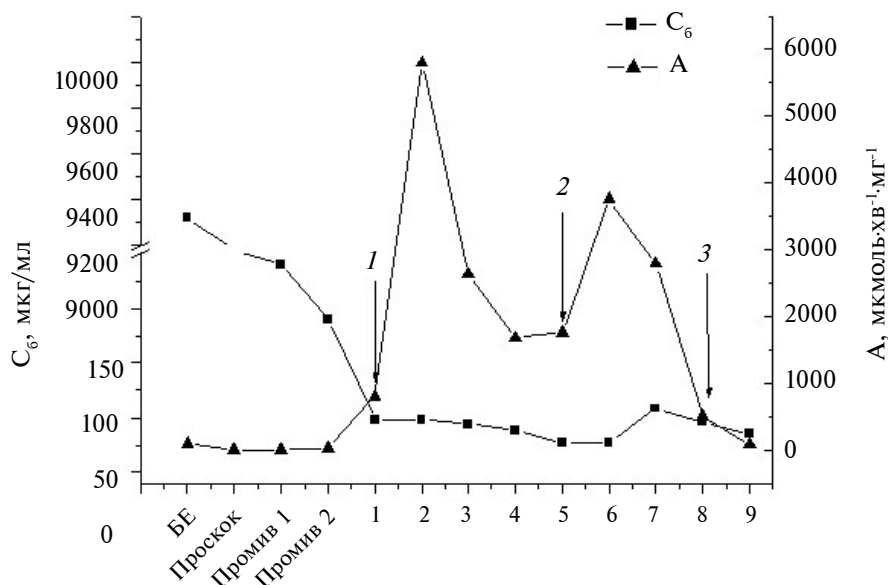


Рис. 1. Профіль елюції аргінази в умовах очищення на афінному сорбенті аргінін-МПС (1–9 фракції елюатів). Стрілками вказано зміну елюентів: 1 – 1 М NaCl/ТБ, 2 – 2 М NaCl/ТБ, 3 – 25%-ний ізопропанол/2,0 М NaCl/ТБ

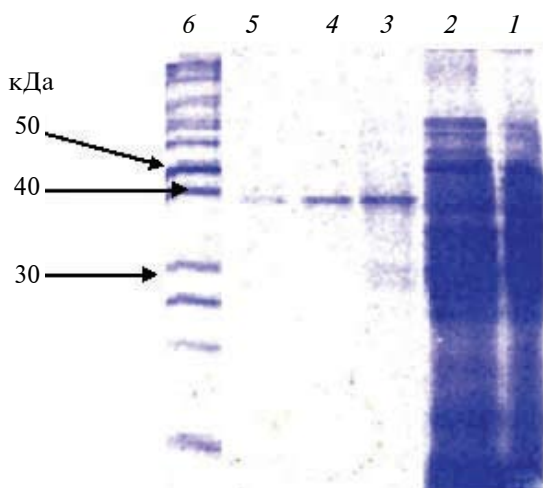


Рис. 2. Електрофоретична характеристика в 12%-ому SDS-ПААГ препаратів аргінази під час очищення: 1 – БЕ до нанесення на колонку, 2 – проскок; 3 – елюат №2 (1 М NaCl/ТБ), 4 – елюат №1 (1 М NaCl/ТБ), 5 – елюат №4 (2 М NaCl/ТБ), 6 – маркери-протеїни з відомою М

температурою для максимальної ензиматичної активності є 60 °С, а при 80 °С ензим майже повністю інактивується. Слід зазначити, що активність при 60 °С є в 2 рази вищою, ніж за стандартних умов вимірювання при 37 °С.

Для дослідження термостабільності аргінази розчин препарату преінкубували протягом 5 хв при фіксованій температурі (8–100 °С), потім відразу ж охолоджували на льоду і про-

водили аналіз активності при 37 °С. Як показано на рис. 4, очищений препарат ензиму є термостабільним в межах від 50 до 60 °С.

На рис. 4,Б представлено дані про рН-залежність активності аргінази. Для визначення рН-стабільності, препарат ензиму преінкубували протягом 60 хв при кімнатній температурі в буферах різного складу: 50 мМ фосфатному, з рН від 7,4 до 8,0; 50 мМ ацетатному, рН від 3,5 до 5; 50 мМ боратному з рН 9,2 і 10,0, після чого аналіз активності проводили у стандартних умовах. Під час встановлення рН-оптимуму дії ензиму, реакційну суміш для визначення активності аргінази готували в зазначених вище буферах. Як видно з рис. 4,Б, ензим є максимально активним в межах рН 9,0–9,5 і достатньо стабільним при рН 7,0–10,0. Як показано у табл. 2, рН-оптимум для очищених препаратів аргінази із різних джерел знаходиться в межах від 9,0 до 10.

Для вивчення впливу 1 і 10 мМ інгібіторів та іонів різних металів на активність аргінази (рис. 5) ензим із досліджуваною сполукою інкубували 30 хв в 20 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0. Як видно з рис. 5, SDS, солі Hg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> і Cu<sup>2+</sup> є інгібіторами аргінази, лише іони Mn<sup>2+</sup> при концентрації 10 мМ виявляють суттєвий активуючий вплив на ензим. Незначно інгібують аргіназу 1 та 10 мМ дитіотреїтол (ДТТ), сполуки Ca<sup>2+</sup> та Cr<sup>3+</sup>. Наші експериментальні дані (табл. 2) відповідають літературним характеристикам аргінази, виділеної із різних джерел.

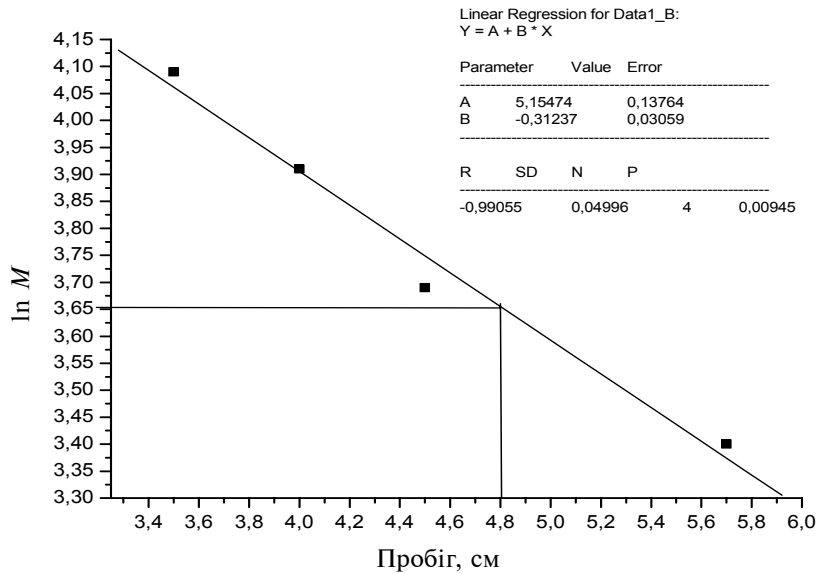


Рис. 3. Визначення  $M$  субодиноць аргінази за електрофореграмою в 12%-му SDS-ПААГ. За результатами електрофоретичного аналізу  $M$  субодиноці гомотримеру холоензиму становить 38 кДа

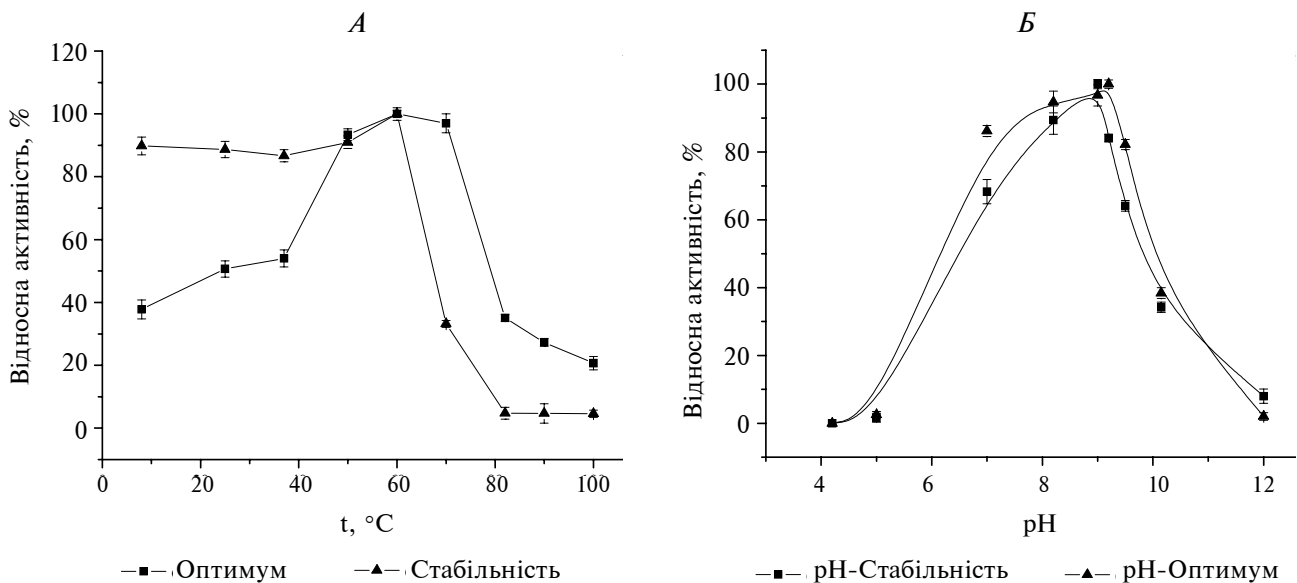


Рис. 4. Визначення температурного оптимуму та термостабільності (А), а також рН-оптимуму і рН-стабільності (Б) очищеної аргінази. За 100% прийнято максимальну активність ензиму

Основними критеріями ефективності технології виділення та очищення будь-якого ензиму є вихід високоочищеного препарату та стабільність його під час зберігання. Відомо, що гліцерол та іони  $Mn^{2+}$  стабілізують аргіназу І людини [23], тому було досліджено їхній вплив на її активність (рис. 6). Препарат ензиму до визначення активності преінкубували в трис-буфері, рН 8,0, протягом 12 год при кімнатній температурі з різними концентра-

ціями гліцеролу та  $Mn^{2+}$ . Як видно з рис. 6, А, додавання гліцеролу до 10% і іонів  $Mn^{2+}$  до 10–20 мМ підвищує активність аргінази і стабілізує ензим під час зберігання. Дослідження температурного режиму (рис. 6, Б) дозволило встановити оптимальні умови зберігання аргінази у присутності сполук мангану та гліцеролу.

Таким чином, внаслідок досліджень із штаму генетично модифікованих дріжджів

Таблиця 2. Фізико-хімічні характеристики аргінази

Джерело виділення	M, кДа	pH <sub>опт</sub> *	t <sub>ст</sub> **	Вплив іонів металів:		Література
				Інгібітори	Активатори	
Печінка людини	107	9,3	55	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[11]
Печінка корови	120	9,2	63	Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[13, 23]
Печінка кроля	110	9,0	50	Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[24]
Печінка щура	118	9,4	55	Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[25]
Еритроцити крові людини	107	9,1	55	Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[12]
Нирка щура	116	9,4	60	Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[25]
Насіння гороху <i>Vigna satjang</i>	210	10,0	60	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[13]
Насіння сої <i>Glycine max</i>	240	9,5	45	Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[14]
Бактерії <i>Bacillus brevis Nagano</i>	180	10,0	—	Fe <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[19, 20]
Рекомбінантні дріжджі <i>S. cerevisiae</i>	120	9,5	35	Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	[16]
Рекомбінантні дріжджі <i>H. polymorpha</i>	114	9,2	60	Hg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Дані авторів статті

Примітка: \*\* t<sub>ст</sub> – температурна стабільність, pH<sub>опт</sub> – pH-оптимум

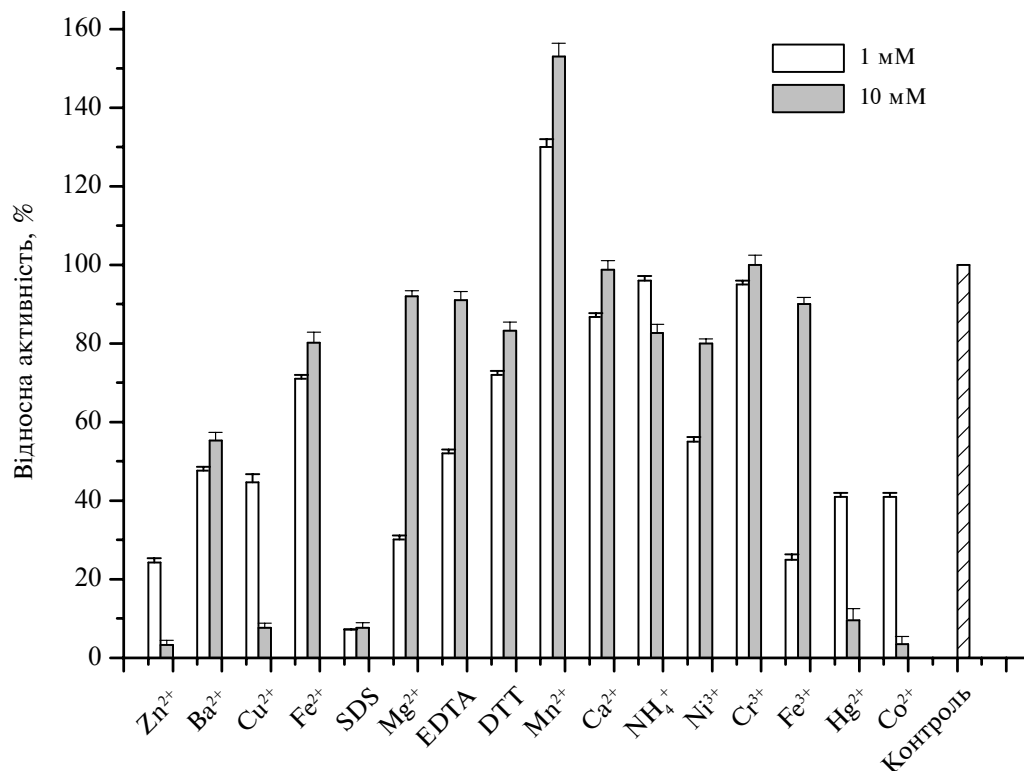


Рис. 5. Дослідження впливу іонів металів та інгібіторів на активність аргінази. За 100% прийнято активність препарату ензиму без добавок

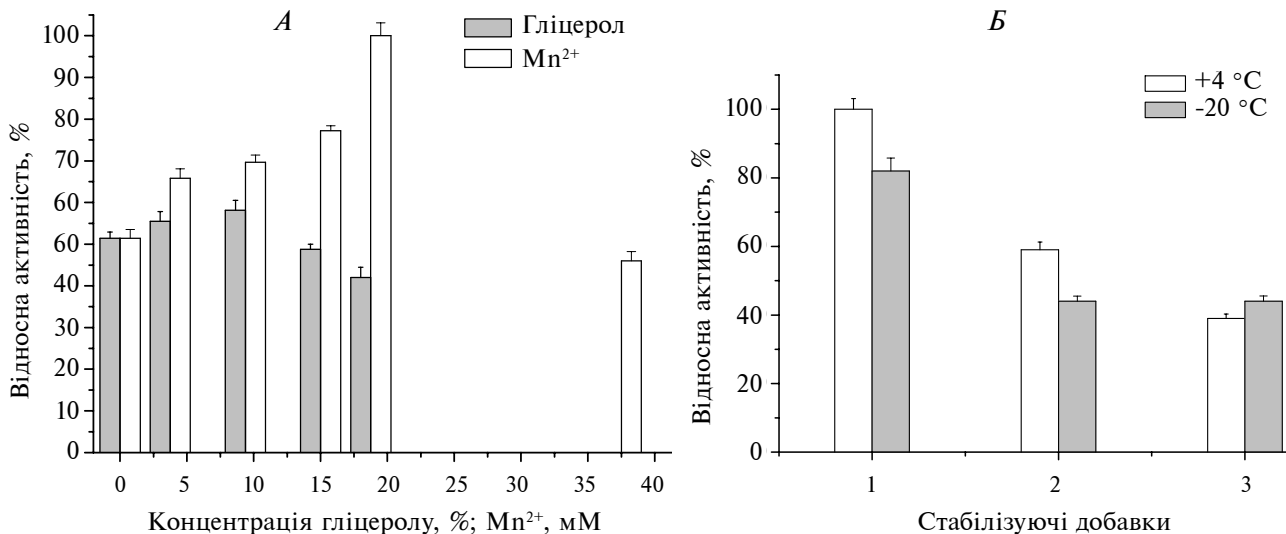


Рис. 6. Дослідження впливу гліцеролу та іонів  $Mn^{2+}$  на активність очищеного препарату аргінази під час зберігання. За 100% прийнято зразок з максимальною активністю. А – протягом 12 год при 24 °С, Б – протягом тижня при різних температурах, у присутності 1 мМ  $Mn^{2+}$  та 10%-го гліцеролу (1); 10%-го гліцеролу (2); контрольна проба без добавок (3)

*H. polymorpha* – надпродуцента аргінази І людини, за одну стадію колонкової хроматографії на синтезованому нами афінному сорбенті аргінін-МПС одержано високоочищений препарат ензиму, гомогенний за результатами електрофоретичного аналізу ПААГ у денатуруючих умовах. Одержаний препарат високоочищеної рекомбінантної аргінази І людини було використано для вивчення фізико-хімічних характеристик, а саме визначено *M* субодиниці ензиму (38 кДа), що відповідає *M* тримеру холодензиму із печінки людини – близько 114 кДа. Показано, що рекомбінантна аргіназа є термостабільною (при 70 °С зберігається до 30% ензиматичної активності), з температурним оптимумом 50–70 °С. Встановлено рН-стабільність та рН-оптими рекомбінантного ензиму (рН 7–10). Досліджено вплив металів та інших добавок на активність ензиму: показано, що 10%-ний гліцерол і 10–20 мМ  $Mn^{2+}$  підвищують активність аргінази і стабілізують ензим під час зберігання.

**АРГИНАЗА І ЧЕЛОВЕКА  
ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ  
*Hansenula polymorpha*: ВЫДЕЛЕНИЕ  
И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНЗИМА**

Н. Е. Стасюк<sup>1,2</sup>, Г. З. Гайда<sup>1</sup>,  
Е. П. Ковальчук<sup>2</sup>, О. В. Стасик<sup>1</sup>,  
М. В. Гончар<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;  
<sup>2</sup>Львовский национальный университет  
имени Ивана Франко, Украина;  
e-mail: stasuk\_natalia@ukr.net

Методом аффинной хроматографии на синтезированном сорбенте L-аргинин-макропористое стекло получены электрофоретически гомогенные препараты аргиназы I человека. Исследованы некоторые физико-химические параметры очищенного энзима: термо- и рН-стабильность, температурный и рН-оптимиумы. Изучено влияние ионов металлов и других добавок на его активность и стабильность при хранении.

Ключевые слова: рекомбинантные дрожжи *Hansenula polymorpha*, аргиназа I человека, L-аргинин, аффинный сорбент.

**HUMAN ARGINASE I FROM THE RECOMBINANT YEAST *Hansenula polymorpha*: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME**

N. Ye. Stasyuk<sup>1,2</sup>, G. Z. Gayda<sup>1</sup>,  
Y. P. Koval'chuk<sup>2</sup>, O. V. Stasyk<sup>1</sup>,  
M. V. Gonchar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology, National Academy  
of Sciences of Ukraine, Lviv;

<sup>2</sup>Ivan Franko L'viv National University, Ukraine;  
e-mail: stasuk\_natalia@ukr.net

**S u m m a r y**

Purified human arginase I preparations homogeneous in SDS-PAAG test were obtained by the affinity chromatography on the synthesized sorbent L-arginine-macroporous glass.

Some physico-chemical characteristics of the isolated arginase preparation have been estimated: thermo- and pH-stability, temperature- and pH-optima of the enzyme. The influence of some bivalent metal ions and other additives on enzymatic activity for stabilization of the enzyme and optimization of its storage conditions was studied.

**Key words:** recombinant yeast *Hansenula polymorpha*, human arginase I, L-arginine, affinity sorbent.

1. Guoyao W. U., Morris S. M. // Biochem. J. – 1998. – **336**. – P. 1–17.
2. Kepka-Lenhart D., Mistry S. K., Wu G., Morris S. M. Jr. // Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2002. – **279**, N 6 – P. 2237–2242.
3. Morris S. M. Jr., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. // Gene. – 1997. – **193**, N 2. – P. 157–161.
4. Visek W. J. // Nutr. – 1985. – **116**, N 1. – P. 36–46.
5. Poremska Z., Luboiński G., Chrzanowska A. et al. // Immunology. – 2003. – **171**, N 3 – P. 1232–1239.
6. Wheatley D. N., Campbell E., Lai P. B. S., Cheng P. N. M. // Gene Ther. Mol. Biol. – 2005. – **9**. – P. 33–40.
7. Garlick P. J., McNurlan M. A. // J. Med. – 1999. – **30**, N 3–4 – P. 131–148.
8. Ensor C. M., Holtsberg F. W., Bomalaski J. S., Clark M. A. // Cancer Res. – 2002. – **62**. – P. 5443–5450.
9. Izzo F., Marra P., Beneduce G. et al. // Clin. Oncol. – 2004. – **22**. – P. 1815–1822.
10. Tsui S., Lam W., Lam T. et al. // Cancer Cell Int. – 2009. – **9**. – P. 1–13.
11. Berüter J., Colombo J. P., Bachmann C. // Biochem. J. – 1978. – **175**, N 2 – P. 449–454.
12. Ikemoto M., Tabata M., Murachi T., Totani M. // Ann. Clin. Biochem. – 1989. – **26**. – P. 547–553.
13. Dabir S., Dabir P., Somvanshi B. // Int. J. Biol. Sci. – 2005. – **1**. – P. 114–122.
14. Downun K. R., Rosenthal G. A., Cohen W. S. // Plant Physiol. – 1983. – **73**. – P. 965–968.
15. O'malley K. L., Terwilliger R. D. // Biochem. J. – 1974. – **143**, N 3. – P. 591–597.
16. Green S. M., Eisenstein E., McPhie P., Hensley P. // Biol. Chem. – 1990. – **265**. – P. 1601–1607.
17. Нагорний В. О., Фаюра Л. Р., Борецький Ю. Р. та ін. // Зб. наук. праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» з'їзду Укр. товариства генетиків та селекціонерів / Алушта, 20–26 вересня, 2007 р. – К.: Логос, 2007. – **2**. – С. 366–371.
18. Білик Б. Л., Ржепецький Ю. А., Красовська О. С. та ін. // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 4. – С. 110–113.
19. Quintero M. J., Muro-Pastor A. M., Herrero A., Flores E. // Bacteriology. – 2000. – **182**, N 4. – P. 1008–1015.
20. Kanda M, Ohgishi K, Hanawa T, Saito Y. // Arch. Biochem. Biophys. – 1997. – **344**, N 1. – P. 37–42.
21. Gayda G. Z., Stasuk N. E., Rzhepetsky Y. A. et al. // Inter. Confer. «Biocatalysis–2009» / Arkhangelsk, Russia, 19–24 June, 2009. – P. 136.
22. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – С. 215–219
23. Bond J. S. // Biochim. Biophys. Acta. – 1973. – **327**, N 1. – P. 157–165.
24. George A. K. Harold J. S. // Biochem. J. – 1973. – **133**. – P. 779–788.
25. Reczkowski R. S., Ash D. E. // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – **312**, N 1 – P. 31–37.

Отримано 21.08.2010