

М.А.ДАВТЯН, Г.ДЖ.ХАЧАТРЯН, И.В.ГОГИНЯН

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЕЧЕНИ КУР

Печень кур обладает заметной активностью трансаминирования разветвленных аминокислот с α -кетоглутаратом. Основная ее часть локализована в надосадочной фракции и лишь небольшая — в митохондриях. Наибольшая активность фермента наблюдается при 0,07M концентрации фосфатного буфера. Ионы Mn несколько активируют изучаемый фермент, в то время как Cd^{+2} и Ca^{+2} полностью подавляют исследуемую активность.

В механизмах регуляции метаболических процессов, протекающих в живой клетке, большая роль придается изоферментам.

Сравнительно недавно в различных органах животных были обнаружены изоферменты трансаминаз, катализирующих переаминирование разветвленных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин) с α -кетоглутаратом. Выделенные изоферменты либо проявляют групповую специфичность в отношении всех трех разветвленных аминокислот (Ф1, обнаруженный во всех изученных органах человека и различных животных, и ФШ — из мозга, плаценты и яичников), либо (в редких случаях) строго специфичны к отдельным разветвленным аминокислотам (ФП, выделенный из печени крыс, дрожжей рода *Candida*, специфичный лишь к лейцину) [1-3].

Интерес к изоферментам указанных трансаминаз особенно возрос в связи с имеющимися сообщениями о глубоких сдвигах в их изоферментном спектре при злокачественном росте [4-6].

Следует отметить, однако, что физиологическая роль указанных изоферментов до настоящего времени не выяснена. В выяснении этого вопроса помогут, с одной стороны, исследования возможных (качественных и количественных) сдвигов в указанном изоферментном спектре в зависимости от физиологического состояния организмов и, с другой, — более широкий охват организмов, находящихся на различных ступенях эволюционного развития.

В нашей лаборатории в течение долгих лет ведутся исследования изоферментов трансаминазы разветвленных аминокислот в сравнительно-эволюционном аспекте. В частности, в дрожжах рода *Candida* были обнаружены все три изофермента трансаминазы разветвленных аминокислот: Ф1 и ФШ, специфичные ко всем трем разветвленным аминокислотам, и ФП, специфичный только к лейцину. Выделенные изоферменты напоминают по своим кинетическим и регуляторным свойствам соответствующие ферменты животного происхождения [7,8].

На пути к выяснению физиологической роли выделенных изоферментов были получены интересные данные, согласно которым с увеличением продолжительности выращивания заметно понижается активность одно-

го из трех изоферментов — ФШ, с сохранением таковой у Ф1 и ФП.

При исследовании голодающих дрожжей были обнаружены качественные сдвиги в изоферментном спектре: голодающие дрожжи лишаются изофермента ФШ, сохраняя при этом Ф1 и ФП. При реинкубации голодающих дрожжей в ростовой среде с источником азота и энергии уже к 5 часу происходит восстановление активности ФШ [9].

Цель настоящей работы — исследование ферментов переаминирования разветвленных аминокислот печени кур, занимающих одну из промежуточных ступеней эволюционного развития между одноклеточными (дрожжи) и млекопитающими, тем более что в доступной нам литературе подобные исследования на курах отсутствуют.

Объект и методика. Объектом исследования служила печень (или другие органы) кур, содержащихся в обычных условиях вивариума. Печень (или другие органы) извлекалась, промывалась холодной дистиллированной водой и после измельчения гомогенизировалась в стеклянном гомогенизаторе типа Элведжем-Поттера с тефловым пестиком в среде 0,1MNaNa -фосфатного буфера ($pH7,8$). Гомогенат (30%) центрифугировался при $2-4^{\circ}C$ со скоростью 18000 об/мин (25000G). Полученная надосадочная жидкость служила в качестве ферментного препарата. Выделение митохондрий осуществлялось по методу Шнейдера и Хогбума [10].

Активность фермента определялась инкубированием ферментных препаратов в термостате при $37^{\circ}C$ в среде 0,1MNaNa -фосфатного буфера, $pH7,8$, содержащей 10мкМ лейцина (донор аминокислот), 10мкМ α -кетоглутарата (акцептор аминокислот), 20мкМ пиридоксаль — 5-фосфата. Общий объем инкубационной смеси — 0,75мл. В контрольном варианте исключался донор аминокислот. Реакция останавливалась кипячением инкубационной смеси в водяной бане в течение 5 мин. Трансаминазная активность оценивалась по количеству синтезированной глутаминовой кислоты. Активность выражалась в мкМ глутаминовой кислоты на 1г свежей ткани. Количественное определение аминокислот проводилось методом нисходящей бумажной хроматографии [11].

Результаты и обсуждение. На первом этапе мы исследовали наличие и уровень активности трансаминарования разветвленных аминокислот в различных органах кур.

Полученные данные (табл.1) свидетельствуют, что наибольшей активностью трансаминарования лейцина с α -кетоглутаратом обладают скелетная мышца, почки и поджелудочная железа. По уровню исследуемой активности различные органы кур можно расположить в следующем убывающем ряду: скелетная мышца > почки > поджелудочная железа > сердце > желудок > печень > селезенка > яичники > мозг > легкие.

Эти данные в основном совпадают с таковыми, полученными при изучении указанной активности в различных органах крыс, за исключением высокой активности печеночной ткани у кур по сравнению с крысами, у которых, согласно мнению большинства исследователей, печень обладает наименьшей активностью. Последний факт авторы пытаются объяснить нуждой организма в сохранении незаменимых аминокислот (в данном случае разветвленных), так как в противном случае они расщепились бы в печени, не успев распределиться потоком крови по организму [5,12,13]. Однако с указанных позиций несколько труднее объяснить наличие специфичного только к лейцину изофермента трансаминазы разветвленных аминокислот в печени крыс.

Наши дальнейшие исследования были продолжены на печени кур. Первоначально была установлена внутриклеточная локализация ферментов переаминирования разветвленных аминокислот. Методом Шнейдера [10] с использованием 0,2M сахарозы были выделены митохондриальная

и надосадочная фракции, в которых определялось наличие исследуемой активности. Полученные данные представлены в табл.2.

Таблица 1
Трансаминаза разветвленных аминокислот различных органов кур (активность в мкМ глу/1г св. тк.)

Органы	Активность
скелетная мышца	59,8 ± 4,2
почки	53,4 ± 2,1
поджелудочная железа	44,2 ± 3,8
сердце	34,9 ± 4,1
желудок	34,5 ± 1,9
печень	24,3 ± 2,7
селезенка	11,8 ± 1,2
яичники	7,4 ± 1,0
мозг	1,2 ± 0,23
легкие	сл

Оказалось, что основная активность (85%) локализована в надосадочной фракции (25000G) и лишь небольшая (15%) — в митохондриях.

В литературе имеются сообщения о наличии цитоплазматической и митохондриальной трансаминаз разветвленных аминокислот в сердечной мышце свиньи и мыши. Были установлены заметные различия в термостабильности обоих ферментов, а также в их поведении при гельфильтрации и электрофорезе на полиакриламидном геле [14,15].

Таблица 2
Внутриклеточная локализация трансаминазы разветвленных аминокислот печени кур (активность в мкМ глу/1г св.тк.)

Фракции	Активность
Митохондриальная (осадок 5000 G)	10,2 ± 0,53
Цитоплазматическая (надосадок 25000 G)	55,8 ± 3,40

Далее, было изучено влияние некоторых физико-химических факторов (концентрация фосфатного буфера, добавление меркаптоэтанола или ионов тяжелых металлов, температура) на исследуемую активность с целью изыскания оптимальных условий для ее проявления.

Данные табл.3 свидетельствуют о том, что с повышением концентрации фосфатного буфера уровень активности трансминирования лейцина с α -кетоглутаратом в бесклеточном экстракте печени крыс несколько повышается и достигает оптимального значения, начиная с 0,07M его концентрации.

С другой стороны, добавление меркаптоэтанола в концентрации 10^{-3} M и пиридоксальфосфата (10^{-5} M) в комбинации с меркаптоэтанолом не влияет на исследуемую активность.

Согласно литературным данным, добавление меркаптоэтанола не влияет на активность трансаминазы разветвленных аминокислот бесклеточного экстракта печени крыс, в то время как заметно повышает активность отдельных ее изоэнзимов [2].

В условиях нашего эксперимента при хранении бесклеточного экстракта печени кур при $-18-20^{\circ}C$ в течение суток активность трансаминазы разветвленных аминокислот заметно понижается, в то время как при $+2^{\circ}C$ — почти полностью сохраняется (табл.4).

Далее, мы исследовали влияние ионов двух- и трехвалентных

Далее, мы исследовали влияние ионов двух- и трехвалентных металлов (в количестве 5 и 10 мкМ) на активность трансаминирования лейцина с α -кетоглутаратом в бесклеточном экстракте печени кур. Оказа-

Таблица 3
Влияние различных концентраций фосфатного буфера на активность трансаминазы разветвленных аминокислот (активность в мкМ глу/1г св.тк.)

Концентрация фосфатного буфера (М) и добавления	Активность
0,005	18,2 ± 1,1
0,020	22,6 ± 1,8
0,070	32,3 ± 1,7
0,100	31,2 ± 2,06
0,150	33,3 ± 1,9
0,20	30,6 ± 1,4
0,07Мбуф. + меркаптоэтанол (10^{-3} М)	32,7 ± 1,3
0,07Мбуф. + меркаптоэтанол (10^{-3} М) + пиридоксальфосфат (10^{-3} М)	30,6 ± 1,3

Таблица 4
Влияние низких температур на сохранение активности трансаминазы разветвленных аминокислот печени кур (активность в мкМ глу/1г св.тк.)

Варианты	Активность
Исходный бесклеточный экстракт	34,2
Бесклеточный экстракт после хранения при +2°C	28,9
Бесклеточный экстракт после хранения при -24°C	17,7

Таблица 5
Влияние ионов различных металлов на активность трансаминазы разветвленных аминокислот печени кур (активность в мкМ глу/1г св. тк.).

Ионы металлов	5 мкМ		10 мкМ	
	Активность	Эффект, %	Активность	Эффект, %
Контроль	25,2	—	25,2	—
Cu^{+2}	0	-100	0	-100
Fe^{+3}	22,4	-10,8	18,4	-27
Mg^{+2}	22,4	-10,8	18,4	-27
Co^{+2}	13,6	-46,0	8,8	-65
Ni^{+2}	22,4	-10,8	18,4	-27
Mn^{+2}	29,3	+16,0	31,3	+24
Cd^{+2}	0	-100	0	-100

лось (табл.5), что ионы Fe, Mn, Ni, Mg не оказывают существенного

влияния на активность фермента, в то время как Co^{+2} ингибирует ее приблизительно на 50%, а Cu^{+2} и Cd^{+2} полностью подавляют исследуемую активность.

Заслуживает внимание небольшое (на 23%) повышение активности изучаемого фермента в вариантах с ионами марганца.

Кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Поступила 28.10.1988

ЛИТЕРАТУРА

1. Ichihara A. Cellular differentiation and isozyme of branched chain amino acid transaminase. - Enzyme, 1973, v. 15, 1-6, p.210 - 223.
2. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. Transaminase of branched chain amino acids. IV. Purification and properties of two enzymes from rat liver. - Biochim. Biophys. Acta, 1968, 159 p. 276 - 284.
3. Гогинян И.В., Багдасарян Е.Г., Давтян М.А. Изоэнзимный спектр и некоторые свойства трансаминазы разветвленных аминокислот *C. guilliermondii* ВКМУ-42. - Биол.Ж.Армении, 1976, 9.
4. Cappuccino C.C., Kadawaki H., Knox W.E. Assay of leucine Aminotransferase in rat tissues and tumores. - Enzyme, 1978, 23, 5, p.328-338.
5. Ichihara A. Isozyme patterns of branched chain amino acid transaminase during cellular differentiation and carcinogenesis. - Ann.N.V. Acad.Sci, 1975, 259, p.347-359.
6. Roth S., Delotto R., Kaji A. Changes in leucine aminotransferase iso zymes viral transformation and its correlation with the isozyme changes occurring during differentiation. - Cancer Research, 1977, 37 p. 1147 - 1153.
7. Гогинян И.В., Давтян М.А. Изоэнзимный спектр трансаминазы разветвленных аминокислот, голодающих по азоту дрожжей. - Уч. зап. ЕГУ, 1987, №3, с. 128 - 131.
8. Давтян М.А., Гогинян И.В., Багдасарян Е.Г. Очистка и некоторые кинетические свойства трансаминазы разветвленных аминокислот дрожжей *C. ВКМ У-42*. - Биол. ж. Армении, №977, т. 25, №1.
9. Schneider W.C., Hogeboom G.H. Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies of the distribution of cytochrome C. In rat liver homogenates., J. Biol.Chem. 1950, v. 183, №1, p. 123.
10. Lissitsky S., Laurent G. Dosage de leucine de l isoleucine et de phenylalanine sur papier. - Bull. Soc. biol., 1955, №37, p. 102.
11. Shinnic F., Harper A. Branched chain amino acid oxidation by isolated rat tissue preparation. - Biochim. Biophys. Acta, №437, p. 477 - 486.
12. Kerbs H., Lund P. . Aspects of the regulation of the metabolism of branched chain amino acids. - Adv. Enzyme Regul., 1977, p. 375-394.
13. Aki K., Ogawa K., Shirai A., Ichihara A. Transaminase of Branched Chain Amino Acids. - j. Biochim., 1967, №62, p. 610 - 617.
14. Montamat E.E., Moreno J., Blanco A. Branched chain aminoacid aminotransferase in mouse testicular tissue., - j. Reprod. Fert., 1978, №53, p. 117 - 123.

Ամփոփում

Հավի լյարդը օժտված է ճյուղավորված ամինաթթուների տրանսամինազայի զգալի ակտիվությամբ: Ակտիվության հիմնական մասը լոկալիզացված է վերնըստվածքային ֆրակցիայում և միայն աննշան մասը միտոքոնդրիաներում: Ֆերմենտի ամենաբարձր ակտիվությունը դիտվել է ֆոսֆատային բուֆերի 0,07 M կոնցենտրացիայի պայմաններում: Մերկապտոթթանոլը և պիրիդոքսալֆոսֆատը չեն ազդում ֆերմենտի ակտիվության վրա: Mn-ի իոնները որոշ չափով խթանում են հետազոտվող ֆերմենտի ակտիվությունը, իսկ Cd^{+2} և Cu^{+2} -ը լրիվ արգելակում են այն:

S U M M A R Y

Hen's liver possesses a marked activity of transaminase of branched aminoacids with α -ketoglutarate. The major part of the activity is localized in the supernatant fraction and only a small part—in the mitochondria.

The highest activity of the enzyme has been observed in 0,07 *M* concentration of phosphate buffer.