

УДК 577

И.В. ГОГИНЯН, Дж.А. ВАРДАНЯН, М.А. ДАВТЯН

НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАНСАМИНАЗЫ  
РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ ПЕЧЕНИ КУР

Трансаминаза разветвленных аминокислот печени кур имеет тиоловый характер. Парахлормеркурийбензоат (ПХМБ) ингибирует его активность при концентрациях порядка  $10^{-5}M$ . Карбонильные реагенты в значительной степени ингибируют активность изучаемого фермента в концентрациях, характерных для ингибирования трансаминазного происхождения.

В предыдущих наших исследованиях [1, 2] методом гельфильтрации на сефадексе G-200 было показано наличие в печени кур трех пиков активности трансаминирования лейцина с  $\alpha$ -кетоглутаратом.

Целью настоящего исследования явилось изучение некоторых кинетических свойств трансаминазы разветвленных аминокислот, фильтрующейся с высокомолекулярными белками во фракциях 7-9 (см. [1]) при гельфильтрации бесклеточного экстракта печени кур на сефадексе G-200.

**Материал и методика.** Подготовка ферментного препарата и определение трансаминазной активности осуществлялись по ранее описанному нами методу [1, 2].

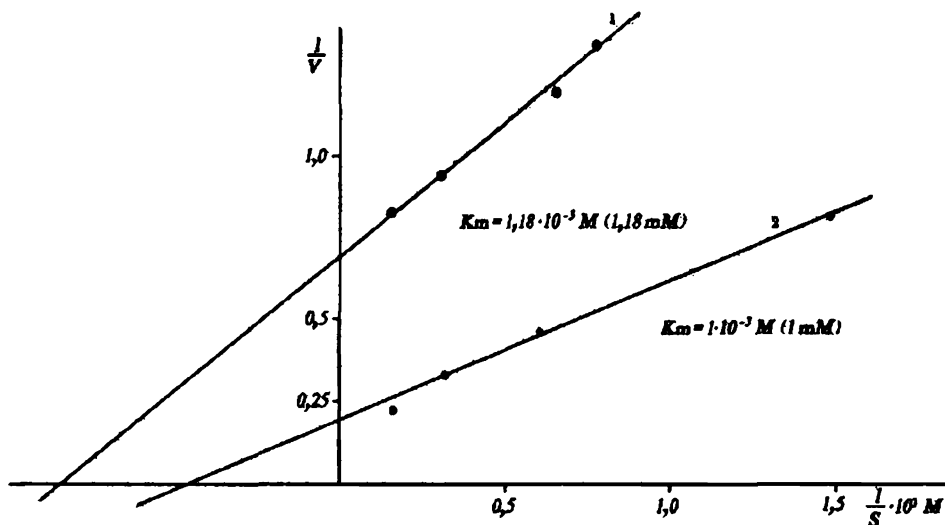
**Результаты и обсуждения.**а) *Константа Михаэлиса.*

Первоначально изучалось влияние различных концентраций субстратов (лейцина и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты) на скорость трансаминирования с последующим определением значения  $K_m$  графическим методом Лайнуивера-Берка.

$K_m$  для лейцина определялась при постоянных концентрациях  $\alpha$ -кетоглутарата и пиридоксальфосфата и изменяющихся концентрациях (от 0,5 до  $25mkM$ ) лейцина. Полученное нами значение  $K_m$  для лейцина ( $1,18mkM$ ) (рис. кр. 1) несколько выше по сравнению с таковым, полученным в отношении  $\Phi I$  печени крысы ( $0,75mkM$ ) [3], что свидетельствует о меньшем сродстве изучаемого нами фермента к лейцину. Следует отметить, что  $\Phi I$

трансаминазы разветвленных аминокислот из дрожжей рода *Candida* обладает еще меньшим сродством к лейцину ( $K_M$   $1,5mM$ ) [4].

$K_M$  для  $\alpha$ -кетоглутарата определялась при постоянных концентрациях лейцина и пиридоксальфосфата и изменяющихся концентрациях (от 0,5 до  $25mM$ )  $\alpha$ -кетоглутарата (рис. кр. 2). Полученное нами значение  $K_M$  для  $\alpha$ -кетоглутарата ( $1,0mM$ ) полностью совпадает с таковым в отношении



Кривая Лайнуивера-Берка, определяющая значение  $K_M$ .  
1 — для лейцина, 2 — для  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты.

печени крысы [3], а для  $\alpha$ -кетоглутарата в отношении  $\Phi I$  из дрожжей рода *Candida* составляет  $0,64mM$ , что свидетельствует о большом сродстве дрожжевого фермента к  $\alpha$ -кетоглутарату по сравнению с таковым из печени кур [4].

#### б) Влияние ингибиторов.

В ходе изучения влияния ингибиторов может быть получена ценная информация относительно таких вопросов, как субстратная специфичность ферментов, природа функциональных групп, составляющих активный центр, механизм действия ферментов и участие определенных функциональных групп в поддержании специфической конформации молекулы фермента. В литературе широко представлены подобные исследования относительно трансаминазы разветвленных аминокислот различного происхождения [5–7].

В этой связи нами была проведена большая серия экспериментов по изучению влияния ингибиторов на активность изучаемого фермента. Были использованы как специфические ингибиторы трансаминаз, так и реагенты на те или иные функциональные группы.

Из реagensов, блокирующих SH-группы, нами исследовались ПХМБ и глутатион в различных концентрациях. Как видно из приведенных данных (табл. 1), ингибирование активности изучаемого фермента наблюдается при концентрациях ПХМБ порядка  $10^{-5} M$ .

Таблица 1

Влияние различных концентраций ПХМБ и глутатиона на активность ФІ печени курицы

Концентрация ПХМБ, М	Эффект, %	Концентрация глутатиона, М	Эффект, %
$3 \cdot 10^{-5}$	0	$1,9 \cdot 10^{-2}$	0
$4 \cdot 10^{-5}$	-14,2	$2,8 \cdot 10^{-2}$	-7,2
$5 \cdot 10^{-5}$	-21,4	$3,8 \cdot 10^{-2}$	-13,8
$6 \cdot 10^{-5}$	-57,1	$5,7 \cdot 10^{-2}$	-21,4
$7 \cdot 10^{-5}$	-74,1	$7,7 \cdot 10^{-2}$	-59,2
$1 \cdot 10^{-4}$	-100	$9,5 \cdot 10^{-2}$	-75,0
		$2,0 \cdot 10^{-1}$	-100

Полное ингибирование фермента достигается при концентрации ПХМБ  $1 \cdot 10^{-4} M$ . Это свидетельствует о меньшей чувствительности трансаминазы разветвленных аминокислот печени кур к ПХМБ по сравнению с ФІ дрожжевой трансаминазы разветвленных аминокислот, полное ингибирование последней достигается при концентрации ПХМБ  $5 \cdot 10^{-5} M$  [4].

Следует отметить, что изучаемый нами фермент более чувствителен к действию ПХМБ, чем ФІІ печени крысы (полное ингибирование наступает при  $1 \cdot 10^{-3} M$  концентрации ингибитора) и трансаминаза разветвленных аминокислот бактериального происхождения [3, 5, 6].

Таким образом, SH-группы изучаемого нами фермента, подобно ФІ из печени крысы и дрожжей рода *Candida*, ответственны за ферментативную активность. Данные (табл. 1) свидетельствуют также о небольшой чувствительности изучаемого фермента к глутатиону (полное ингибирование наступает при  $2 \cdot 10^{-1} M$  его концентрации).

Из карбонильных реagensов, блокирующих альдегидную группу пиридоксальфосфата, нами испытывался гидроксилламин.

Как видно из полученных данных (табл. 2), полное ингибирование изучаемой активности гидроксилламином наступает при концентрации его  $2 \cdot 10^{-1} M$ . Подобные результаты были получены в нашей лаборатории при исследовании ФІ и ФІІ дрожжевой трансаминазы разветвленных аминокислот [2].

Изониазид также относится к карбонильным реагентам и образует с карбонильными соединениями гидразон. Антибактериальное действие изониазида обусловлено связыванием карбонильных соединений, играющих важную роль в обмене бактериальной клетки.

Таблица 2

Влияние различных концентраций гидроксилamina и изониазида на ФІ печени кур

Концентрация гидроксилamina, М	Эффект, %	Концентрация изониазида, М	Эффект, %
$0,125 \cdot 10^{-2}$	-17,25	$0,5 \cdot 10^{-2}$	0
$0,25 \cdot 10^{-2}$	-23,4	$1,0 \cdot 10^{-2}$	-10,4
$0,50 \cdot 10^{-2}$	-33,8	$1,5 \cdot 10^{-2}$	-30,2
$0,75 \cdot 10^{-2}$	-39,2	$2,0 \cdot 10^{-2}$	-59,7
$1,00 \cdot 10^{-2}$	-55,4	$2,5 \cdot 10^{-2}$	-70,8
$1,25 \cdot 10^{-2}$	-90,0	$3,0 \cdot 10^{-2}$	-80,1
$2,00 \cdot 10^{-2}$	-100	$5,0 \cdot 10^{-2}$	-100

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о небольшой чувствительности изучаемого фермента к изониазиду по сравнению с ФІ и особенно ФІІ дрожжевой трансминазы разветвленных аминокислот, которые при концентрации изониазида  $1 \cdot 10^{-3}$  М ингибируются на 70% и 89% соответственно.

Научно-исследовательская лаборатория  
сравнительной и эволюционной биохимии

Поступило 13.04.2001

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М.А., Гогинян И.В., Хачатрян Г.Дж., Варданян Дж.А. – Ученые записки ЕГУ, 2000, № 1.
2. Давтян М.А., Хачатрян Г.Дж., Гогинян И.В. – Ученые записки ЕГУ, 1989, № 2.
3. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. – Biochem. et Biophys. Acta, 1968, v. 159, № 2, p. 276.
4. Гогинян И.В., Багдасарян Е.Г., Давтян М.А. – Биол. ж. Армении, 1976, № 9.
5. Ikeda T., Konishi I., Ichihara A. – Enzyme, 1973, v. 15, p. 210.
6. Ichihara A. – Biochem. et Biophys. Acta, 1976, v. 445, № 3, p. 622.
7. Hutson S.M., Berkich D., Drown P., Xu Baiyang, Aschner Michael, La Nowne Kathzyn – J. Neurochem., 1998, v. 71. № 2.

Ի.Վ. ԳՈԳԻՆՅԱՆ, Զ.Հ. ՎԱՐՎԱՆՅԱՆ, Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

ՀԱՎԻ ԼՅԱՐԳԻ ՃՅՈՒՂԱՎՈՐՎԱԾ ԱՄԻՆԱԹՈՒՆՆԵՐԻ  
ՏՐԱՆՍԱՄԻՆԱԶԻ ՈՐՈՇ ԿԻՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ամփոփում

Պարզվել է, որ հավի լյարդի ճյուղավորված ամինաթթուների տրանս-ամինազը ունի թիոլային բնույթ: Պարաքլորմերկուրիբենզոատը արգելակում է

Ֆերմենտի ակտիվությունը  $10^{-5}M$  կոնցենտրացիայի սահմաններում:

Կարբոնիլային ռեագենտները նույնպես զգալի արգելակում են ուսումնասիրվող ֆերմենտի ակտիվությունը տարբեր օրգանիզմներից անջատված տրանսամինազներից բնորոշ կոնցենտրացիաների դեպքում:

I.V. GOGINIAN, J.H. VARDANIAN, M.A. DAVTIAN

## SOME KINETIC PROPERTIES OF BRONCHED CHAIN AMINO ACIDS TRANSAMINASE OF CHICKEN LIVER

### Summary

The transaminase of bronched chain amino acids of chicken liver was proved to have a thioline character. PCMB inhibits the enzyme activity in the boundaries of  $10^{-5}M$  concentration.

Carbonyl reagents also considerably inhibit the above-mentioned enzyme activity in concentrations, characteristic for transaminases eliminated from different organisms.