

Ингибирование аланинаминотрансферазы мышечной ткани гидразидами ароматических кислот

А. Н. БЛАНДОВ, А. Г. ШЛЕЙКИН

shleikin@yandex.ru

*Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО
Институт холода и биотехнологий
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9*

В опытах in vitro изучали кинетику ингибирования фермента мышечной ткани аланинаминотрансферазы гидразидами ароматических карбоновых кислот. Методом Лайнуивера-Берка установлен конкурентный механизм ингибирования активности фермента. Бензгидразид оказался более сильным ингибитором, чем салицилгидразид.

Ключевые слова: аланинаминотрансфераза, конкурентное ингибирование, гидразиды ароматических карбоновых кислот.

It was studied in vitro experiments the kinetics of inhibition of muscle tissue enzyme alanine aminotransferase by hydrazides of aromatic carboxylic acids. The competitive mechanism of enzyme inhibition was shown by Lineweaver-Burke plot. Benzhydrazide was more potent inhibitor than salicylhydrazide.

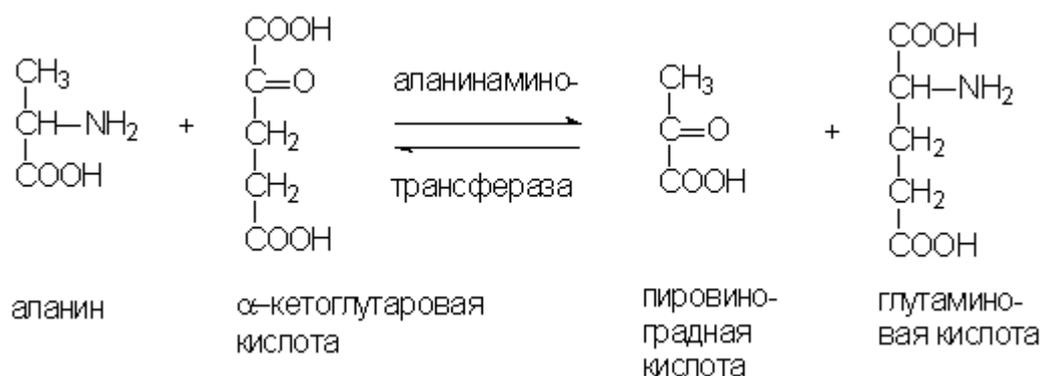
Keywords: alaninaminotranspherase, competitive inhibition, hydrazides of aromatic carboxylic acids.

Аминотрансферазы являются ключевыми ферментами аминокислотного обмена. Будучи широко представленными в различных биологических тканях, эти ферменты проявляют высокую устойчивость при хранении пищевого сырья [1].

В действии аминотрансфераз участвует кофермент пиридоксальфосфат, образующийся из витамина В₆. Ранее было установлено, что применение некоторых лекарственных средств, например гидразида изоникотиновой кислоты (изониазида), приводит к явлениям искусственного гиповитаминоза по витамину В₆ (пиридоксину) [2-4]. Этот факт может быть объяснен структурным сходством изониазида с одной из активных форм витамина В₆ – пиридоксамином. Встраивание структурного аналога кофермента в активный центр пиридоксальсодержащих ферментов вызывает снижение их активности, то есть ингибирование. Ингибиторы, замедляющее протекание ферментативной реакции, делятся на обратимые и необратимые. Необратимые ингибиторы – это

вещества, которые необратимо, ковалентно модифицируют активный центр фермента или всю его молекулу. Обратимые ингибиторы – вещества, временно тормозящие работу фермента, после их удаления или инактивации активность фермента полностью восстанавливается. Обратимые ингибиторы, в свою очередь, делятся на конкурентные и неконкурентные. Неконкурентные ингибиторы действуют не на активный центр фермента, а на удаленный от активного аллостерический центр. Неконкурентное ингибирование не устраняется повышением концентрации субстрата. При их действии максимальная скорость реакции уменьшается, а константа Михаэлиса не изменяется. Конкурентные ингибиторы по своей структуре похожи на субстрат, но при этом не подвергаются ферментативному превращению; они способны встраиваться в активный центр фермента и блокировать его работу. Конкурентное ингибирование можно преодолеть повышением концентрации субстрата. Максимальная скорость реакции при действии конкурентного ингибитора не изменяется, а константа Михаэлиса увеличивается [5].

Аминотрансферазы катализируют межмолекулярный перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты, причем коферментом в этой реакции служит пиридоксальфосфат, который выполняет роль промежуточного акцептора аминогруппы. В частности, аланинаминотрансфераза (АлАТ) [КФ 2.6.1.2] катализирует реакцию переаминирования между аланином и α -кетоглутаровой кислотой:



По количеству образовавшейся пировиноградной кислоты можно судить об активности фермента. Пировиноградную кислоту в эксперименте определяют фотоколориметрически по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, приводящей к образованию окрашенного 2,4-динитрофенилгидразона:

исходной субстратной смесью ставят аналогичные опыты с ее разведениями в 2, 3, 4 и 5 раз (всего 20 пробирок).

Активность аланинаминотрансферазы выражают в единицах. За 1 единицу принимают образование 1 мкмоль пировиноградной кислоты за 1 мин. Количество пировиноградной кислоты находят по калибровочной кривой, построенной с помощью ряда стандартных растворов разных концентраций, содержащих динитрофенилгидразоны пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. Скорость реакции рассчитывают по формуле:

$$V = \frac{C}{M \cdot t}$$

где С – концентрация пировиноградной кислоты в мкмоль/л (мкм/л);

М – навеска мышечной ткани в г;

t – время инкубации (30 мин).

Средние величины получали из трехкратного определения показателей в параллельных опытах.

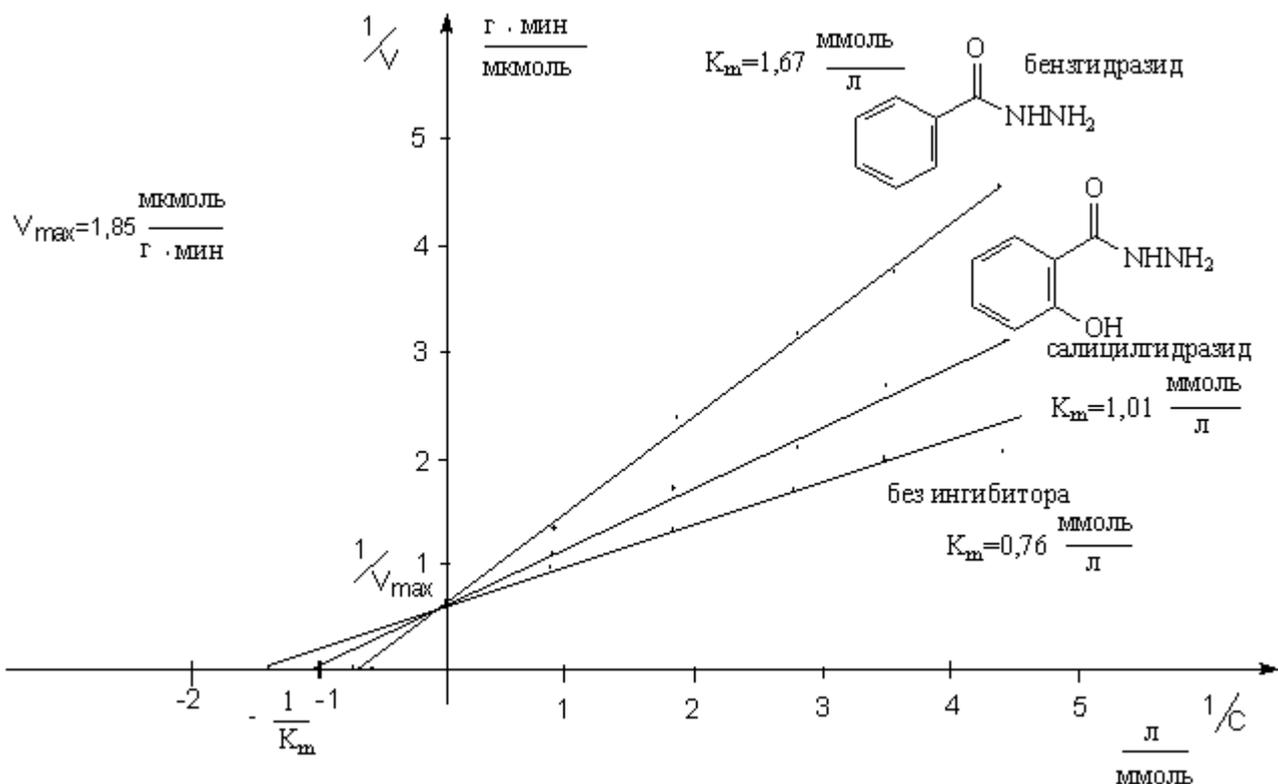
Результаты и обсуждение

Результаты экспериментального определения скорости АлАТ реакции при различных концентрациях субстрата, необходимые для построения графика Лайнуивера-Берка, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Величины скоростей аланинаминотрансферазной реакции (v) при заданных концентрациях субстрата (с) и их обратные значения

С, мкм/л	1/С	V, мкм/мин			1/V		
		2	3	4	2	3	4
1,00	1,00	1,112	0,777	0,972	0,902	1,287	1,030
0,50	2,00	0,820	0,486	0,639	1,220	1,573	1,565
0,33	3,00	0,625	0,347	0,514	1,601	2,885	1,947
0,25	4,00	0,514	0,278	0,402	1,947	3,597	2,487
0,20	5,00	0,486	0,222	0,347	2,095	4,504	1,900



Расчет величин максимальной скорости реакции (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) графическим методом методом Лайнуивера - Берка

Как видно из представленных на рисунке данных, константа Михаэлиса в контрольном опыте (без ингибитора), составила 0,76 мкм/л. В присутствии салицилгидразида значение K_m возросло до величины 1,01 мкм/л, что свидетельствует об ингибирующем действии данного соединения. Бензгидразид в той же концентрации оказывает более выраженный ингибирующий эффект, что приводит к увеличению K_m до 1,67 мкм/л. На графике Лайнуивера - Берка кинетические кривые, полученные в контрольном опыте и в присутствии ингибиторов, пересекают ось ординат в одной точке, что свидетельствует о конкурентном механизме ингибирования [4].

Ранее нами было показано, что активность АлАТ может служить показателем свежести рыбного сырья [5]. Полученные результаты свидетельствуют о возможном влиянии химических добавок, в частности, консервантов, или образующихся из них вторичных метаболитов, на ферментативную активность пищевых систем, что необходимо учитывать при интерпретации данных энзиматических исследований, используемых в анализе пищевого сырья и контроле качества пищевых продуктов.

Выводы

1. Установлено, что исследованные соединения — бензгидразид и салицилгидразид являются конкурентными ингибиторами аланинаминотрансферазы.

2. Бензгидразид обнаруживает более значительную ингибирующую активность, чем салицилгидразид, что может объясняться влиянием *орто*-гидроксильной группы.

Список литературы

1. Шлейкин А.Г., Соколовский В.В. Определение активности аланинаминотрансферазы как тест оценки качества рыбного сырья // Повышение эффективности применения искусственного холода в решении задач агропромышленных объединений. Л.: ЛТИХП. — 1986, — С. 94—95.
2. Selikoff I.Y., Robitzek E.H. Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid // American College of Chest Physician CHEST. — 1952, — V. 21. — № 4, — P. 385—438.
3. Healy D. The Psychopharmacologists: interviews. London: Chapman & Hall. — 1996, — P. 8.
4. Weissmann Myrna M. Treatment of depression: bridging the 21st century: Washington, D.C. — 2001, — P. 10—11.
5. Lehninger. Principles of Biochemistry: fourth edition, New York. — 2005, — P. 202—213.