

бранного переноса ионов, обуславливающих в известной степени процессы водонакопления в данной биологической системе и ответственных, по-видимому, за формирование определенных звеньев процесса отекообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипенко Ю. В., Каган В. Е., Козлов Ю. П. Биохимия, 48, 435—441, 1983.
2. Бакай Л., Ли Д. В кн.: Отек мозга (под ред. Э. И. Канделя). М., 1969.
3. Владимиров Н. А., Аряков А. И. В кн.: Перекисное окисление липидов и биологических мембранах (под ред. Г. М. Франка). М., 1972.
4. Вагин Ю. Е., Кондратов В. Е., Буракова Е. Б. В кн.: Биокислородные окислители (под ред. И. Н. Ниязова). М., 1975.
5. Зубер В. Л. В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой). Л., 1982.
6. Квитницкий-Рыжов Ю. И. В кн.: Отек и набухание галлиного мозга (под ред. А. М. Гурвич). Киев, 1978.
7. Крекс Е. М., Красильникова В. И., Патрикасон М. В. Журн. эволюц. биологии и физиологии, 4, 211—243, 1968.
8. Романова Л. А., Сталина И. Л. В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В. Н. Ореховича). М., 1977.
9. Bloch M. C., Wirts K. W. A., Scherphof A. I. Biochim. et Biophys. Acta, 233, 61—75, 1971.
10. Ishii S., Halper P., Kelly W. A., Evans J. P. J. Neurosurg. 16, 152—166, 1960.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.

Поступило 27 X 1988 г.

Биол. ж. Армения, № 1, (42), 1989

УДК 577.135.3

ИНГИБИРОВАНИЕ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ КРУННОГО РОГАТОГО СКОТА НЕКОТОРЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

А. А. ДАВТЯН, М. Л. ГЕВОРКЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии
и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Показано, что L-аминокислоты орнитин, лизин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, α-аминоизомасляная кислота и норвалин конкурентно ингибируют аргиназу печени крупного рогатого скота, а α-аминомасляная кислота является ингибитором смешанного типа. Разветвленные аминокислоты являются наиболее эффективными ингибиторами фермента. Установлено также, что в присутствии орнитина чувствительность фермента к воздействию температуры возрастает; это указывает на специфичность взаимодействия указанной аминокислоты с аргиназой.

Վերը լրագրված, որ L-ամինաթթուներ օրնիտինը, լիզինը, վալինը, լեյցինը, իզոլեյցինը, պրոլինը, α-ամինաիզովալաթթվի և նորվալինը մրցակցորեն ազդեցություն են խոչընդոտում ածխածնի արգինազի ակտիվությունը, իսկ α-ամինաբուտիրաթթվի և իսոպրովինի ազդեցությունը միջակայքային ամինաթթուները անդրադառնում են լատենտիզացիոն ինդիկատորների ակտիվացմանը:

Сокращения: АИМК—аминоизомасляная кислота; АМК—аминомасляная кислота

Էֆֆեկտիվ ազդեցությունը օրնիտինի առկայության դեպքում աճում է ֆերմենտի զգայունությանը սերմաստիճանի ազդեցության նկատմամբ, որը վկայում է ազդեցիկների հետ հզված ամինաթթվերի գերազդեցության տարածվածության և առկայության:

It is shown that L-amino acids ornithine, lysine, valine, isoleucine, leucine, proline, α -amino isobutyric acid and norvaline are competitive inhibitors of big-horned cattle liver arginase. γ -amino butyric acid is the inhibitor of mixed type. The branched chain amino acids are most effective inhibitors of this enzyme. It is established that in the presence of ornithine thermosensitivity of arginase increases; it indicates the specificity of interaction of this amino acid with arginase.

Аргиназа — аминокислоты.

Реакция, катализируемая аргиназой, ингибируется некоторыми природными аминокислотами. В настоящее время установлено, что лизин, орнитин, пролин, изолейцин, валин и лейцин являются эффективными ингибиторами аргиназы печени млекопитающих [8—10, 12, 13]. Однако в отношении характера ингибирования и эффективности взаимодействия этих аминокислот с аргиназой мнения исследователей расходятся. В работе [10] показано, что α -аминокислоты являются неконкурентными ингибиторами аргиназы печени быка. Другие исследователи [12] обнаружили конкурентное ингибирование этого фермента разветвленными аминокислотами и аланином. Лизин, орнитин и пролин, по мнению большинства авторов, являются конкурентными ингибиторами аргиназы печени млекопитающих [1, 7, 11—13]. Как полагает Бедино [6], с помощью орнитина, который является продуктом каталитической реакции, осуществляется аллостерическая регуляция аргиназы печени быка.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния ряда аминокислот на активность аргиназы печени крупного рогатого скота. Определены характер ингибирования и величины констант ингибирования (K_i), изучено также влияние аминокислот-ингибиторов на термостабильность аргиназы.

Материал и методика. Исследования проводили на коммерческом лиофилизированном препарате аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия). Величину K_i определяли по методу Диксона [1]. Средние значения K_i вычисляли на основании 5—7 опытов. Растворы фермента в концентрации $4.2 \cdot 10^{-7}$ М готовили из 0.5 М глицинового буфера (рН 9.5). Активность аргиназы определяли по методу Ратнер, как описано ранее [2].

В работе использовали препараты L-орнитина HCl, L-лизина HCl, L-гистидина HCl и других L-аминокислот, DL-норвалина, DL- α -АМК, DL- α -аланина-DL-пролина, D-аргинина, D-валина, аденина—фирмы Reanal (Венгрия).

Результаты и обсуждение. Изучение влияния различных аминокислот на аргиназу печени крупного рогатого скота показало, что лизин, орнитин, валин, лейцин, изолейцин, норвалин, α -АМК, пролин и α -АИМК снижают активность фермента. Причем все перечисленные аминокислоты, кроме АМК, являются конкурентными ингибиторами этой аргиназы. На рис. 1 даны графики Лайнуивера-Бэрка, демон-

стрирующие конкурентный характер ингибирования аргиназы орнитинном и пролином. Аналогичные зависимости были получены и для других аминокислот. Конкурентный характер ингибирования исследуемы-

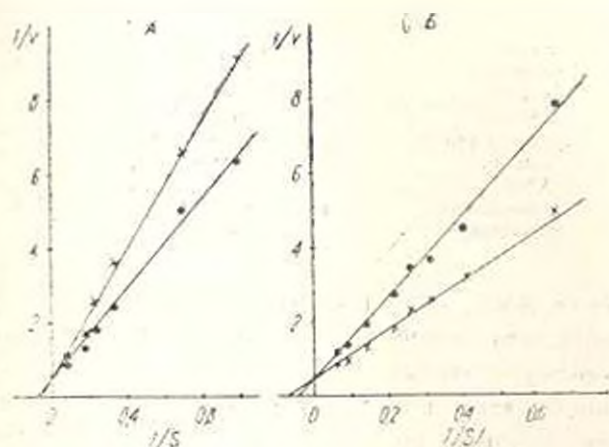


Рис. 1. Определение характера ингибирования аргиназы пролином (А) и орнитинном (В) методом Лайнуивера-Берка. Концентрации пролина—114 и 57 мМ, орнитина—12 и 6 мМ.

ми аминокислотами подтверждают также величины констант ингибирования методом Диксона (рис. 2). Значения констант ингибирования аргиназы аминокислотами приведены в табл. 1, из которой видно, что наиболее сильными ингибиторами аргиназы являются разветвленные аминокислоты. Принимая во внимание, что величина K_m для этого

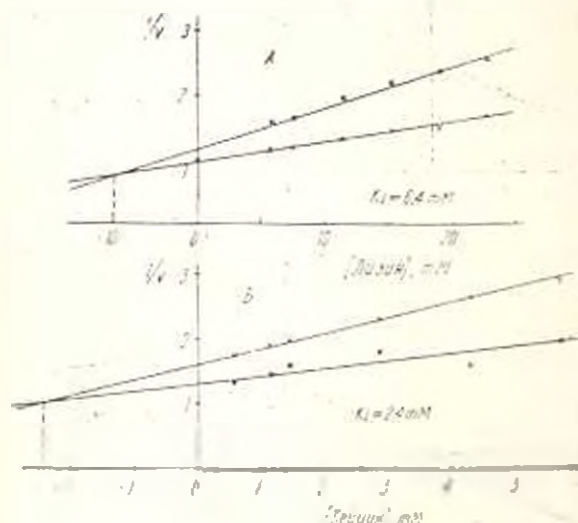


Рис. 2. Графическое определение величин констант ингибирования аргиназы лизинном (А) и лейцином (В) методом Диксона. Концентрации аргинина—6.4 и 3 мМ.

препарата аргиназы, определенная по методу Лайнуивера-Берка, равна 6,8 мМ, можно заключить, что связывание указанных аминокислот с активным центром фермента происходит более эффективно, чем с субстратом.

Таблица 1. Величины констант ингибирования аргиназы аминокислотами (рН 9,5)

Аминокислота	Тип ингибирования	K_i (мМ)
L-лизин	конкурентный	6,1
L-орнитин	конкурентный	3,8
L-вален	конкурентный	1
L-лейцин	конкурентный	2,4
L-изолейцин	конкурентный	1
L-пролин	конкурентный	21
L-АМК	смешанный	28
D,L-норилан	конкурентный	3,4
D,L-АМК	конкурентный	36

Что касается АМК, то она является ингибитором смешанного типа. Эта аминокислота способна взаимодействовать и с чистым ферментом и с фермент-субстратным комплексом. С помощью методов Диксона и Корнш-Боудена показан смешанный характер ингибирования аргиназы печени крупного рогатого скота АМК и определены величины $K_i=28$ мМ и $K_i'=3,8$ мМ для чистого фермента и фермент-субстратного комплекса соответственно (рис. 3). Эти данные показывают, что

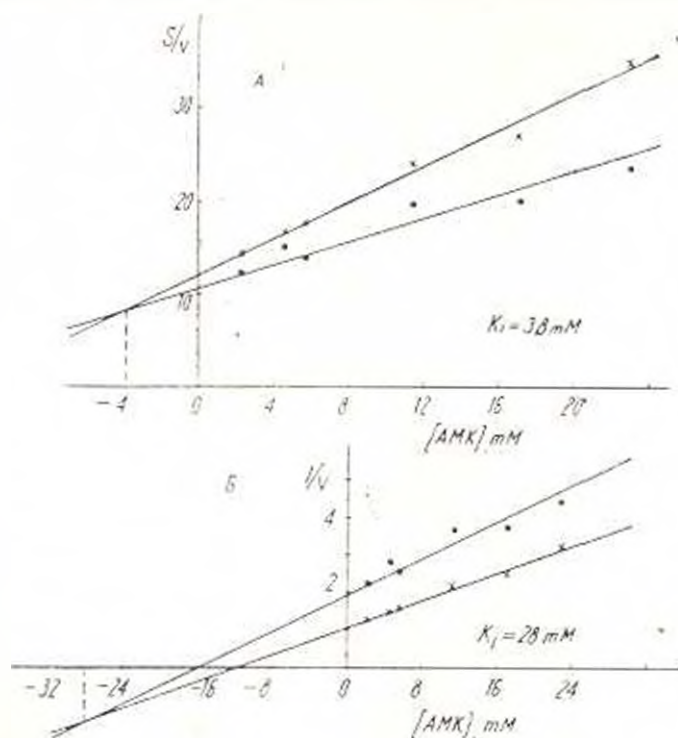


Рис. 3. Определение величин констант ингибирования аргиназы АМК методами Диксона (Б) и Корнш-Боудена (А). Концентрации аргинина в пробах—5,4 и 10,8 мМ.

АМК предпочтительнее связывается с фермент-субстратным комплексом. По-видимому, конформационные изменения, происходящие в аргиназе в результате образования фермент-субстратного комплекса, со-

здают благоприятные условия для связывания этой аминокислоты с аргиназой.

Оксипролин, норлейцин, ГАМК, цистеин, фенилаланин в концентрациях 23 мМ в растворе не снижают активность аргиназы, а цитруллин, треонин, серин, тирозин, триптофан, гистидин в тех же концентрациях даже несколько повышают ее (табл. 2).

Таблица 2. Влияние аминокислот на активность аргиназы (концентрации аминокислот—23 мМ, рН 9,5)

Аминокислота	Актив- ность, %	Аминокислота	Актив- ность, %
L-оксипролин	100	L-триптофан	120
L-цистеин	100	L-цитруллин	128
D,L-фенилаланин	100	L-треонин	146
D,L-норлейцин	100	β-гистидин	128
ГАМК	100	L-тирозин	138
L-серин	120		

В одной из работ [12] было показано, что аланин конкурентно ингибирует аргиназу печени быка ($K_i = 17,3$ мМ). Однако в наших экспериментах добавление 23 мМ аланина не влияло на активность аргиназы. В присутствии 120 мМ аланина активность фермента снижается на 35%, а при наличии 240 мМ на 50%. Таким образом, аланин является очень слабым ингибитором аргиназы печени крупного рогатого скота.

Дипептид, содержащий ингибирующие аминокислоты аланил-пролин, не оказывает влияния на активность аргиназы. В присутствии 57 мМ его в растворе лишь несколько увеличивается активность фермента (на 25—30%). D-аргинин не гидролизруется этим ферментом, а D-валин не оказывает ингибирующего влияния.

Некоторыми авторами было обнаружено конкурентное ингибирование аргиназы печени быка аденином с константой ингибирования 0,7 мМ [11] и 14 мкмоль [14]. Однако в наших экспериментах аденин в концентрации 4,6 мМ в растворе не оказывал влияния на исследуемый фермент.

На основании полученных результатов можно заключить, что наличие аминогруппы в α-положении, по-видимому, является необходимым условием для обеспечения связывания аминокислот в активном центре фермента. ГАМК по нашим, а также литературным данным [12], не ингибирует аргиназу печени быка. Отсутствие ингибирования аминокислотами не в α-положении показано и в работе [10]. α-Кетокислоты, соответствующие этим аминокислотам, также не влияют на аргиназу печени быка [12].

В процессах связывания аминокислот с каталитическим участком фермента важную роль играет длина углеродной цепочки. Удлинение ее на один углерод существенно изменяет ингибиторные свойства аминокислоты. Так, аланин ингибирует аргиназу только при высоких концентрациях (см. выше). АМК является ингибитором смешанного типа ($K_i = 28$ мМ), норвалин конкурентного ($K_i = 3,4$ мМ), а норлейцин не влияет на активность фермента. Высокое сродство разветвленных ами-

нокислот к аргиназе может свидетельствовать о том, что в составе активного центра ее имеется гидрофобный участок, с которым легко связываются боковые цепи этих аминокислот.

Важное значение в процессах связывания ингибиторов с аргиназой, по-видимому, имеет и заряд боковой цепи аминокислоты. Как показано в работе [12], диаминамасляная и диаминопропионовая кислоты являются конкурентными ингибиторами аргиназы печени быка. Таким образом, наличие аминокислотной группы в боковой цепи аминокислоты не мешает связыванию ее в активном центре фермента, в то время как появление полярной OH-группы (треонин, оксипролин), по нашим данным, приводит к потере ингибиторных свойств. Полученные данные позволяют предположить, что в процессах связывания субстрата и аминокислот-ингибиторов в активном центре аргиназы, кроме заряженных групп фермента, обеспечивающих связывание соответственно гуанидиновой и карбоксильной групп, участвуют также функциональная группа, образующая связь с α -аминогруппой, а также гидрофобные аминокислотные остатки. Дальнейшие исследования в этом направлении, очевидно, позволят получить новые сведения об особенностях строения и функционирования активного центра аргиназы.

При сравнении полученных данных с имеющимися в литературе сведениями можно заметить, что характер ингибирования этими аминокислотами аргиназ, выделенных из печени разных млекопитающих, различен. Так, АМК, по нашим данным, — ингибитор смешанного типа, а Гласс и Ноке показали конкурентный характер ингибирования аргиназы печени крысы этой аминокислотой [9]. Для аргиназы печени овцы Гласс является ингибитором смешанного типа, тогда как, по нашим, а также литературным данным [12], эта аминокислота является одним из неэффективных конкурентных ингибиторов аргиназы печени быка. Для одной из форм аргиназы печени человека оригинал является ингибитором смешанного типа [5], хотя аргиназа печени быка конкурентно ингибируется этой аминокислотой [12]. Очевидно, это можно объяснить различиями в строении активного центра печеночных аргиназ у млекопитающих. При совместном введении этих аминокислот ингибирующее влияние их суммируется. В присутствии одновременно двух или трех аминокислот-ингибиторов в растворе активность фермента снижается суммарно — на столько, на сколько снижает ее каждая из аминокислот в отдельности при добавлении к нативному ферменту. Очевидно, все эти аминокислоты связываются с одним и тем же участком в активном центре фермента. Этот факт представляет существенный интерес, так как присутствие в клетке небольших количеств нескольких из этих аминокислот может привести к значительному ингибированию активности фермента, что указывает на возможную роль их в процессах регуляции активности аргиназы в клетках печени.

Было изучено также влияние этих аминокислот на термостабильность аргиназы. В экспериментах по изучению термостабильности, проведенных нами ранее, были использованы относительно высокие концентрации фермента — $8,3 \cdot 10^{-6}$ М [3] (температура полуинактивации — 74°). При концентрации аргиназы $4,2 \cdot 10^{-7}$ М температура полуинакти-

вазии снижается до 70° (рис. 4). В результате нагревания величина K_m фермента несколько уменьшается (после инкубации аргиназы при 65° в течение 10 мин величина K_m составляет 5 мМ). Это свидетельствует о том, что воздействие температуры приводит к таким изменениям конформации вблизи активного центра, которые увеличивают срод-

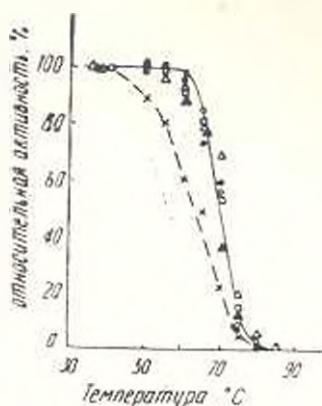


Рис. 4. Термоллабилизация аргиназы печени крупного рогатого скота в присутствии аминокислот-ингибиторов. ● — контроль, Δ — лизин, (22 мМ), □ — валин (6,2 мМ), ○ — пролин (60 мМ), х — орнитин (24 мМ), ▲ — АМК (20 мМ). Растворы аргиназы с аминокислотой инкубировали на водяной бане в течение 10 мин при соответствующей температуре, затем охлаждали и определяли активность

ство фермента к субстрату, хотя скорость реакции снижается. Как видно из рис. 4, лизин, валин, АМК и пролин не влияют на чувствительность аргиназы к воздействию температуры. Однако добавление орнитина в раствор делает фермент более лабильным. При выдерживании аргиназы при 53° в присутствии орнитина в течение 10 мин активность снижается на 20%, тогда как без него при этой температуре сохраняется 100% активности. Температура полуинактивации снижается в присутствии орнитина до 64°, что свидетельствует о специфическом взаимодействии этой аминокислоты с аргиназой. Возможно, кроме активного центра орнитин способен связываться с аргиназой и в других участках макромолекулы, что может вызвать изменения в структуре фермента, отражающиеся на его термостабильности. Возможно также, что при нагревании сродство фермента к орнитину возрастает, что также может привести к резкому падению активности аргиназы в данных условиях. Следует отметить, что, по нашим данным [3], в присутствии орнитина в большей степени, чем в присутствии других аминокислот наблюдается частичная защита аргиназы от инактивации при взаимодействии с трипсином.

Бедню [6] обнаружены отклонения от гиперболической кинетики у аргиназы печени быка при pH 9,5 в присутствии орнитина. В наших экспериментах, однако, ни в присутствии орнитина, ни в присутствии какого-либо другого ингибитора отклонений от гиперболической кинетики каталитической реакции аргиназы не обнаружено (рис. 1). Возможно, дополнительное взаимодействие орнитина с аргиназой и имеет место, но оно не отражается на кинетике каталитической реакции в данных условиях.

1. Аалчуджян Н. Х. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1983.
2. Геворкян М. Т., Закарян А. К., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44—49, 1974.
3. Геворкян М. М., Чубарян С. В., Туманян Т. Р., Торчян Р. О. Биолог. ж. Армении, 32, 4, 314—318, 1986.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 2, 1982.
5. Bascut L., Cabetto J., Velliz M., Gonzales A. Biochim. biophys. acta, 128, 1, 149—154, 1966.
6. Bedino St. Ital. J. Biochem., 26, 4, 264—276, 1977.
7. Bertho J., Colombo J.—P., Bachmann C. Biochem. J., 175, 2, 449—454, 1978.
8. Carvajal N., Cederbaum S. D. Biochim. biophys. acta, 870, P 34, 2, 161—184, 1986.
9. Glass R. D., Elex W. E. J. Biol. Chem., 248, 16, 5785—5789, 1973.
10. Hunter A., Downs C. E. J. Biol. Chem., 157, 2, 427—446, 1945.
11. Pace C. A., Mead-R. A. Biochim. biophys. acta, 658, 2, 410—412, 1981.
12. Patk W. K., Nockumson S., Kim S. Biochem. Med., 19, 1, 39—46, 1978.
13. Rao R. V. R., Reddi R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 19, 62—70, 1973.
14. Rosenfeld J. L., Dutta S. P., Chheda G. B., Tritsch G. L. Biochim. biophys. acta, 410, 1, 184—186, 1973.

Получено 9.XI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, № 1, (42), 1987

УДК 615.214.21

РЕЗЕРПИНОПОДОБНЫЕ ПСИХОТРОПНЫЕ СРЕДСТВА И ПОИСК НЕИРОЛЕПТИКОВ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОХИНОЛИЗИДИНА

Э. М. АРЗАНУНЦ

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Миджояна
АН АрмССР, Ереван

Описаны известные психотропные средства, близкие к резерпину по структуре или механизму действия. Приведены также потенциальные нейротропические вещества—октагидроиндохинолизидины, содержащие в структуре, как и резерпин, индольный фрагмент.

Ներկայացված են նյութեր պսիխոտրոպ երբեք, որոնք կառուցվածքով և ազդեցության մեխանիզմով մոտ են ռեզերպինին: Տեղեկատվ են նաև պոտենցիալ նեյրոտրոպիկ սիտակոնիզիդիններ, որոնք կրկին կառուցվածքով, ինչպես և ռեզերպինը, պարունակում են ինդոլային ֆրագմենտ:

The known psychotropic drugs, which are close in structure or mechanism of action to reserpine, have been reviewed on a comparative aspect. Potential neurotropic substances—octahydroindolizidines, containing in their structure, similar to reserpine, an indole fragment, have also been described.

Сокращения: 5-ОТФ—5-кетотрифенилфам; 5-ОТ—серагонин; ИА—нораздрепалин.