

мутаген *R. ginseng* LGF-73, уступает L-ФАД из *P. ginseng* Py 335 по термостабильности, но стабильнее в более широком диапазоне pH.

Наибольшее стабилизирующее влияние на оба фермента оказывает глицерин, а другие низкомолекулярные спирты менее эффективны. Оба фермента чувствительны к различным реагентам. Интересно также, что субстраты L-Phc и L-Tyr защищают L-ФАД от замкнутости и термической инактивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Evans C. T. and et al. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 25, 406-414, 1987.
2. Gilbert H. A. and Tully M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 131, 557-563, 1985.
3. Inoue S. and et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 141, 165-170, 1986.
4. Gendrot S.A. and et al. Applied Environ. Microbiol., 54, 996-1002, 1988.

Получена 19.07.1994

Биолет. журн. Армении. 2 (48), 1995

УДК 612.173.1.015.1:577.152.273

ИЗБИТОЧНОСТЬ КРЕАТИНКИНАЗЫ ИЗ МНОКАРДА ЧЕЛОВЕКА С ГОМОМЕТАЛЛИЧЕСКИМИ КОМПЛЕКСАМИ МОЛИБДЕНА

Г.С. МЕДИКСТЯН, З.С. МКИТЧЯН, М.Е. ГАЗАРЯНЦ, Ж.И. АКОНЯН, В.Н. ФЕДИН*, Г.А. ПЕВНИСКИИ

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван
*Институт биологической химии СО Российской АН, Новосибирск

Исследовано влияние ряда комплексов молибдена на ферментативную активность креатинкиназы MM миокарда человека. Выявлено четыре соединения, обладающие эффектом по действию, два из которых являются активаторами, остальные ингибиторами фермента. Соединения можно разделить на слабые и сильные ингибиторы. Тип ингибирования носит неконкурентный и бесконкурентный характер. Стойкостью комплексов ингибирования для наиболее сильного ингибитора ($0,6 \text{ мМ}$ – 520 мМ) как же эффективные ингибиторы фермента ненуклеотидной природы обнаружены впервые.

Иսկուզմը արուստագրվելիս կրեատինֆոսֆոտրանսֆերազի ակտիվությունը հնդ մոկոարդիումը հնդ թթվածնի և անօրգանական մոլիբդենի կոմպլեքսների ազդեցությանը: Վերաբերյալ է արվել մոկոարդիումի կրեատինֆոսֆոտրանսֆերազի ակտիվությանը: Երկուսն էլ ակտիվատորներ են, մնացածը՝ ինհիբիտորներ: Կոմպլեքսները կարելի է բաժանել թույլ և թույլ ինհիբիտորների: Ինհիբիտորների ազդեցությունը բնութագրվելով, հայտնաբերվել էր, որ դրանք ոչ կոնկուրենտային և ոչ կոնկուրենտային ինհիբիտորներ են: Ինհիբիտորների թույլ և թույլ ինհիբիտորները առաջին անգամ հայտնաբերվել են: Սույն թվով ակտիվացիայի ենթարկվել են նաև մոկոարդիումի կրեատինֆոսֆոտրանսֆերազի ակտիվությունը:

The influence of various of molybdenum and tungsten complexes on the enzymatic activity of creatine kinase from human heart muscle (MM form) has been studied. Two of them were shown as activators and eleven as inhibitors of the enzyme. For the most effective complexes were estimated $K_{0.5}$ value ($0,6 \text{ mM}$ – 520 mM). Noncompetitive and uncompetitive inhibition respect to reaction's substrates has been detected. Such effective inhibitors of the enzyme of a non-nucleotide nature were found for the first time.

MM-креатинкиназа - миокард человека - комплексы молибдена.

В последнее десятилетие комплексы различных металлов (особенно платины) стали важными терапевтическими средствами. Исследователи обращают все большее внимание на комплексы с новыми неорганическими и органическими лигандами. Хорошо известно, что

большее число ферментов использует ионы различных металлов в качестве кофакторов, стимулирующих их ферментативную активность. Комплексы металлов с различными нуклеофильными лигандами могут быть использованы в качестве хороших моделей комплексов металлов с аминокислотными остатками белков. В последнее время синтезировано большое число комплексов вольфрама и молибдена, содержащих более одного атома металла, а в качестве лигандов-атомов серы, телуридов, аминокислот и т.д. Известны полиядерные тио- и оксотиокомплексы этих металлов, которые в случае с другими переходными металлами практически не изучены. В то же время в литературе отсутствуют данные о биологической активности комплексов полифрама и молибдена.

В настоящей работе представлены результаты изучения действия некоторых комплексов молибдена на реакцию, катализируемую креатинкиназой миокарда человека. Обнаружено высокое сродство некоторых комплексов к этому ферменту.

Материал и методика. Использовали фосфокреатин ("Серва"), креатин ("Хемлокот"), АДФ, АТФ ("Серва"). Остальные реагенты были аналитически чистыми. Креатинкиназу из миокарда человека получили в том же состоянии [4]. Фермент имел удельную активность 470 ед. активности.

Синтез, выделение характеристик и данные рентгено-структурного исследования комплексов молибдена описаны в работах [5, 6, 7, 8].

Активность креатинкиназы в реакции переноса фосфорной группы от фосфокреатина к АДФ (обратная реакция) тестировали кинетическим методом [2] при 37° согласно [9].

Реакционную смесь (0,15 мл) содержала: 10 мМ Mg-ионы, 0,15 мМ триэтиламинный буфер (рН 6,7), 0,8-8 мМ фосфокреатин, 0,15-1,5 мМ АДФ. Реакцию останавливали добавлением фосфокреатина. Через 1-2 мин реакцию останавливали добавлением 0,2 мл щелочной смеси, содержащей 1 %-ный α -нафтол, 0,1 мМ 0,1 %-ного раствора α -нитрата и 2 мл воды.

Измерения активности фермента в реакции синтеза фосфоратами (прямая реакция) проводили pH-метрически при 30° согласно [9]. Вещества в концентрации согласно [4]. Ошибка определения не превышала 20-30 %.

Результаты и обсуждение. В настоящей публикации приведены результаты исследований влияния следующих комплексов молибдена на креатинкиназную активность: $\text{Mo}(\text{Cl})_4\text{Cl}_4$ (I), $\text{K}_4[\text{Mo}_2\text{Cl}_6]$ (II), $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{Mo}_2\text{S}_4]$ (III), $\text{K}_4[\text{Mo}_2\text{Cl}_6]$ (IV), $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{Mo}_2\text{S}_4 \cdot \text{Vt}_8]$ (V), $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{Mo}_2\text{S}_7 \cdot \text{P}_2]$ (VI), $(\text{NH}_4)_2[\text{Mo}_2\text{S}_{12}]$ (VII), $(\text{NH}_4)_2[\text{Mo}_3\text{S}_{13}]$ (VIII), $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{Mo}_2\text{S}_4]$ (IX).

Следует отметить, что все вышеуказанные комплексы имеют трехмерную, но не плоскую структуру. Мы предположили, что такие комплексы могут взаимодействовать с различными ферментами и воспользовались возможностью проверки этого предположения в случае с креатинкиназой. Необходимо отметить, что в литературе отсутствуют данные о биологической активности каких-либо комплексов молибдена.

Добавление соединений (I) и (II) в реакционную смесь приводило к активации креатинкиназы как в прямой, так и в обратной реакции. Соединение (II) увеличивало начальную скорость реакции на 20-25 %. Эффект активации в случае с комплексом (I) был более выраженным. Он зависел от концентрации комплекса в реакционной смеси и достигал 80-100 % (рис. 1) при концентрации соединения порядка 30 мМ (рис. 1).

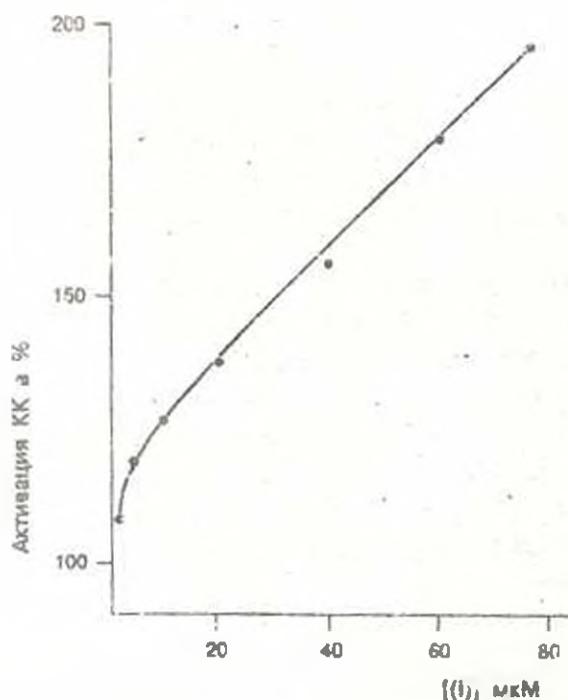


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей креатинкиназной реакции от концентрации комплекса (I). Активность фермента в отсутствие комплекса принята за 100%.

Согласно [2], диссоциация MM-димера креатинкиназы до мономеров приводит к увеличению удельной активности фермента в 20-30 раз. Учитывая эти данные, можно предположить, что взаимодействие димера креатинкиназы с соединениями (I) и (II) стимулирует диссоциацию димера до более активных мономерных форм фермента.

В отличие от вышерассмотренных комплексов соединения (III)-(IX) являются ингибиторами креатинкиназы. Эффекты ингибирования соединений (III) и (IV) очень слабые (10-15%). Соединения (V)-(IX) полностью подавляют креатинкиназную реакцию (рис. 2).

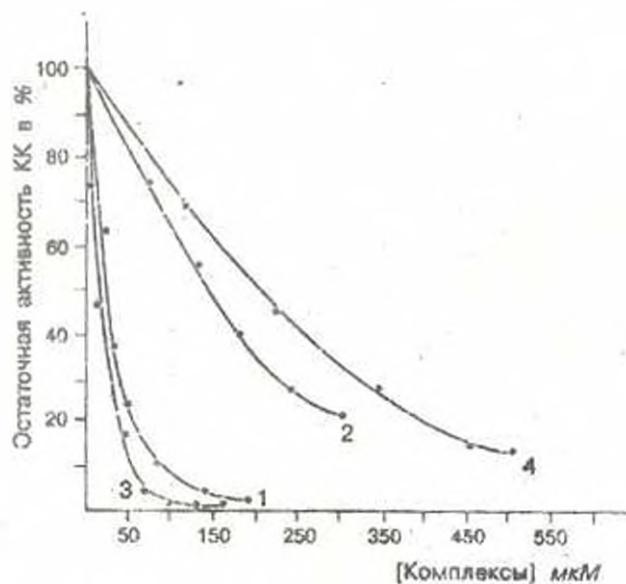


Рис. 2. Концентрационная зависимость ингибирующего действия комплексов молибдена (V)-(IX) на креатинкиназную реакцию: 1 - комплекс (V), 2 - комплекс (VI), 3 - комплекс (VII), (VIII), 4 - комплекс (IX)

Для выяснения механизма ингибирования исследовали влияние различных концентраций комплексов молибдена на начальные скорости креатинкиназной реакции в зависимости от концентраций субстратов. На рис. 3 представлен график двойных обратных величин зависимости начальных скоростей реакции от концентрации $\Delta\text{ЦФ}$ и КФ в присутствии комплекса (УII).

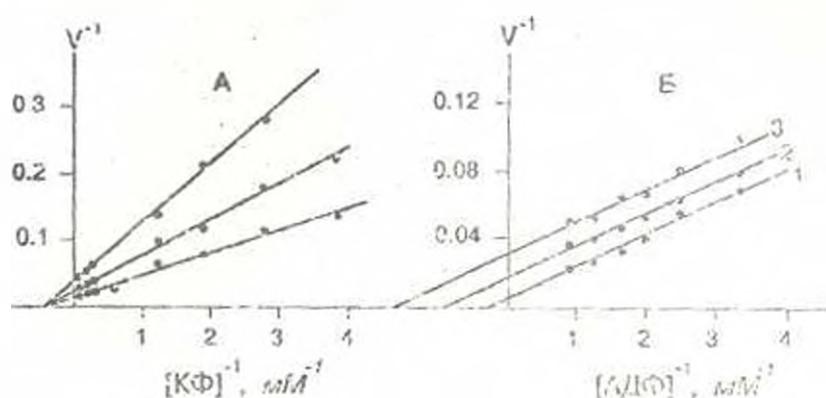


Рис. 3. График двойных обратных величин зависимости начальных скоростей креатинкиназной реакции от концентрации $\Delta\text{ЦФ}$ (А) и креатинфосфата (Б) при различных концентрациях комплекса (VII): 1 - в отсутствие комплекса; 2 - в присутствии 1,45 мкМ (VII); 3 - в присутствии 2,9 мкМ (VII).

Результаты кинетических исследований для всех соединений приведены в таблице.

Таблица. Тип и константы ингибирования (K_i) для комплексов молибдена

Комплексы молибдена	Тип ингибирования по отношению к $\Delta\text{ЦФ}$	Тип ингибирования по отношению к КФ	
		K_i , мкМ	K_i
(У)	неконкурентный	32	неконкурентный
(УI)	неконкурентный	520	неконкурентный
(УII)	бесконкурентный	0,6	неконкурентный
(УIII)	неконкурентный	67	бесконкурентный
(IX)	бесконкурентный	150	смешанный

В литературе отсутствуют данные о неконкурентных и бесконкурентных по отношению к субстратам фермента ингибиторах. Такой случай ингибирования креатинкиназы без конкуренции ингибитора и субстратов за фермент в данном случае выявлен впервые. По-видимому, креатинкиназа обладает участками, способными эффективно взаимодействовать с соединениями типа (VI)-(IX), при этом обращает на себя внимание наличие одинаковых структурных фрагментов - $[\text{Mo}_2(\text{N}_2\text{-S}_2)_2]$ - в этих кластерных анионных т-комплексах.

Следует особо подчеркнуть, что сродство комплексов молибдена к креатинкиназе очень высокое, оно сравнимо со сродством к киназе субстратов, или примерно на порядок выше сродства природных лигандов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меликсетян Г.О., Мкртчян Э.С., Акопян Ж.И. Вопр. мед. хим., 33, 112-116, 1987
2. Невзвский Г.А., Агкизова В.И., Тобрик О.И., Мколучи Э.С., Акопян Ж.И. Биохимия, 48, 339-349, 1983.
3. Федти В.В., Герасько А.О., Миронюк Ю.В., Федоров В.В. Журн. теор. химии, 33, 2864-2871, 1988.
4. Dixon M., Webb E.C. Enzymes, 2nd Edition. Longmann Group Ltd., 1979.
5. Eisner A.H., Rosenberg H. Biochem. J., 51, 606-610, 1952
6. Fedin V.P., Sokolov M.P., Mironov Ye. V., Kosciol B.A., Sokolov S.V., Fedorov V.V. Izv. Vuz. Chim. Acta, 167, 39-44, 1990
7. Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie, ed. G. Brauer. Ferdinand. Enke Verlag, 1978.
8. Hughes H.N. The Inorganic Chemistry in Biological Progress. John Wiley and Sons, Ltd. 1-400, 1981
9. Meliksetyan G.A., Anikova V.N., Lavrik O.I., Mkrtychyan Z.S., Nersisova L.S., Akopyan J.I. FIPS Len., 149, 36-40, 1982.

Получено 10.03.1991

Биолог. журн. Армении 2 (48), 1995

УДК 612.173.1.015.1:577.152.273

ВЛИЯНИЕ ГОМОМЕТАЛЛИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ВОЛЬФРАМА НА КРЕАТИНКИНАЗУ ММ

Г.О. МЕЛИКСЕТЯН, Э.С. МКРТЧЯН, М.Г. ГАЗАРЯНЦ, Ж.И. АКОПЯН, В.П. ФЕДИН*, Г.А. НЕВИНСКИЙ*

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

*Институт биохимической химии СО Российской АН, Новосибирск

Исследовалось влияние комплексов вольфрама на креатинкиназу ММ из миокарда человека и скелетной мышцы кролика. Все соединения оказались ингибиторами фермента с K_i 1,4 - 430 мкМ. Качественные исследования выявили бесконкурентный и неконкурентный характеры ингибирования по отношению к природным субстратам АДФ и креатинфосфату. Такие эффективные ингибиторы нуклеотидной природы обнаружены впервые.

Исследовано впливання комплексів вольфраму на активність креатинкінази ММ із міокарда людини та скелетної м'язової кролика. Всі сполуки виявилися інгібіторами ферменту з K_i 1,4 - 430 мкМ. Якісні дослідження виявили бесконкурентний та неконкурентний характер інгібування по відношенню до природних субстратів АДФ та креатинфосфату. Такі ефективні інгібітори нуклеотидної природи виявлені вперше.

The influence of tungsten complexes on creatine kinase MM activity from human heart muscle and rabbit skeletal muscle had been studied. All of them had been identified as the inhibitors of enzyme with K_i 1,4 - 430 mkM. The uncompetitive and non-competitive type of inhibition had been observed in respect to substrates ADP and creatinphosphate. Such effective inhibitors of the enzyme of a non-nucleotide nature are found for the first time.