

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. Павловский 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., Миронов 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., Mirzoyev 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*, Д.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.

Иսսառն արստմանից և ճագարի կմախքային մկաններից ստացված ԱՄ կրկասիմկինազի վրա հետազոտվել են վոլֆրամ արքայածխուղ կապիթրս ճիւղորրոսնների սպիտորրյունը: Ելանարկված Լ որ այդ միացորրյունները օժնված են ֆերմենտային սկարվորրյունը 70-150%-ով ճնշկուր հասկորրյունը: Խոսորրված Լ նշված բնիդրիտորրների կինեարկ մեկասնիզմների օսոոննասիրրյունը:

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.

Креатинкиназа - миокард человека - комплексные соединения вольфрама

Исследование влияния различных комплексов металлов с органическими и неорганическими лигандами на каталитические свойства ферментов представляется интересным не только в связи с присутствием некоторым из них антагонистическим действием и использованием в химиотерапевтической практике, но и для моделирования взаимодействия специфических лигандов с ферментами. Предполагается, что во взаимодействии с соединениями, не являющимися субстратами или их аналогами, активный центр фермента не повреждается.

В предыдущей работе показано активирующее и ингибирующее действие комплексов молибдена на креатинкиназу MM (КК - M_2M_2) из миокарда человека, причем их эффект в ферменту зависит от природы субстратов, что указывает на биологическую роль этих соединений.

В настоящей работе объектом исследования является так называемые комплексные соединения, содержащие один и более атомов вольфрама, а также лигандов, как и в случае с комплексами молибдена, - а именно селеноглицерол, глиоксилимин. Было исследовано их действие на каталитическую активность креатинкиназы MM (КК - M_2M_2) из миокарда человека и детально изучено: MM взаимодействует со следовыми количествами соединений, а также полученных результатов можно считать интересным и важным для выяснения молекулярного механизма и регуляции активности фермента из миокарда человека.

Материалы и методы. Креатинкиназа (КК) из миокарда человека (100) использованы стандартными методами [10].

Креатинкиназа MM из миокарда человека в реакционной смеси имеет удельную активность 470 ед/акт/мг по методу [11] и ее содержание в реакционной смеси методом [12, 13]. Селеноглицерол, глиоксилимин, хлороформат, и другие соединения гевоструктурного молибдена и комплексы вольфрама, полученные реакцией [14, 15], чистота креатинкиназы в реакционной смеси определяли по методу [16]. Обратная реакция получена по методу [17] с использованием хлороформата [18] при 37° С [19].

Реакционная смесь объемом 0,1 мл содержала: 0,01 мМ калий пиридат, 0,1 мМ триэтиламинного буфера (pH 6,7), 0,02 мМ $CaCl_2$, 0,15-1,5 мМ ADP , 1-2 мкМ фермента. Реакцию начинали с добавлением креатинфосфата, сывороточной смеси или щелочного раствора 1 %-ного α -нафталя (0,2 мМ и 0,1 мМ) в том растворе лигандов (0,1 мМ). Затем добавляли 2 мл воды и измеряли на спектрофотометре при 520 нм.

Результаты и обсуждение. Из ряда проанализированных комплексов вольфрама выявлено пять соединений, оказывающих ингибирующее действие на креатинкиназу из миокарда человека. Среди них комплексы $(NH_4)_2[WS_4]$ (I) оказался слабым ингибитором. Комплексы $(Et_4N)_2[WS_7Br_6]$ (II), $(Et_4N)_2[W_2S_4]O_8$ (III) и $(Et_4N)_5[W_3S_21SCl_7N_6]$ (IV) - сильные ингибиторы, так как степень ингибирования достигала 70 %. А комплекс $(NH_4)_2[W_3S_15]NH_4Cl_3$ (V) очень сильный ингибитор, поскольку его присутствие в инкубационной смеси с мишенью фермента приводило к 100 %-ному ингибированию ферментивной реакции (рис. 1).

Как и в случае с комплексом молибдена, комплексы вольфрама обладают небольшим эффектом в отношении фермента, при этом лучшие субстраты АДФ и КФ.

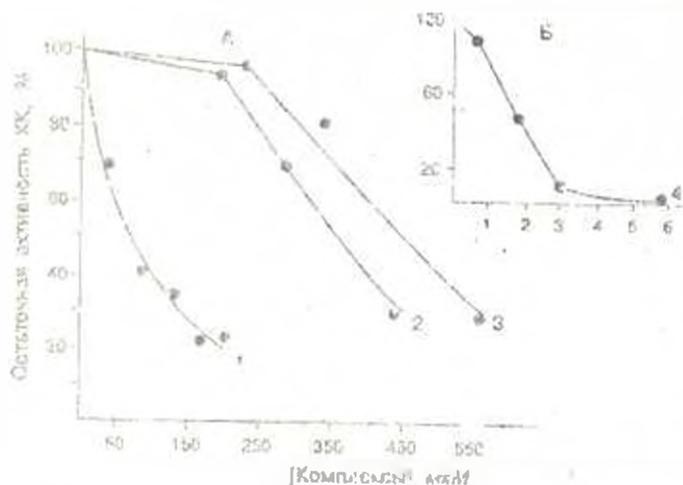


Рис. 10. Влияние концентрации комплексов вольфрама (I-E) на активность креатинкиназы: 1 - комплекс (II), 2 - комплекс (IV), 3 - комплекс (III) и 4 - комплекс (V).

Для выяснения механизма действия исследовали влияние концентрации на изменение скорости креатинкиназной реакции в присутствии варьируемых концентраций АДФ и КФ. Результаты представлены в таблице.

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

Комплексы вольфрама	Тип ингибирования по отношению к АДФ		Тип ингибирования по отношению к КФ	
	K_i мкМ		K_i мкМ	
(II)	бесконкурентный		42	
(III)	бесконкурентный		1530	
(IV)	неконкурентный		10	
			смешанный	
			10	

Константы ингибирования вычислены согласно [5].

Следует отметить, что характер ингибирования комплексами вольфрама идентичен характеру ингибирования некоторыми комплексными соединениями молибдена. Результаты представляют интерес в том плане, что подобные эффективные ингибиторы фермента неспецифической природы выявлены впервые.

Что касается креатинкиназы ММ из скелетных мышц кролика, то из исследованных комплексов вольфрама эффективным оказался только комплекс (V), который вызывал 100 %-ное ингибирование фермента стативной активностью и концентрациях $3,8 - 5,4 \times 10^{-6}$ М и проявил бесконкурентный тип ингибирования по отношению к АДФ. По всей

