



УДК 577.150.4

ОСОБЕННОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ УРАТОКСИДАЗЫ
НЕКОТОРЫМИ ПУРИНАМИ*Каган З. С., Чернявская М. А., Сурина Т. Я.,
Волкова Т. Ю.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

Изучено ингибирующее действие ряда пуриновых оснований на окисление мочевой кислоты, катализируемое уратоксидазой из печени свиньи. Показано, что сродство фермента к субстрату (величина K_m) зависит от концентрации поливалентного иона буфера, но не от его природы. Ксантин, гипоксантин, гуанин и аденин — обратимые ингибиторы уратоксидазы. Характер ингибирования пуриновых оснований зависит от ионной силы буферного раствора: в растворах с ионной силой 0,075—0,08 ксантин и гипоксантин являются конкурентными ингибиторами, а гуанин — ингибитором смешанного типа. При ионной силе 0,15—0,16 ксантин и гипоксантин ингибируют реакцию по смешанному типу, тогда как гуанин — по конкурентному типу. Аденин — неконкурентный ингибитор во всех буферных системах. Показаны спектральные изменения (гипо- и гиперхромные эффекты) для мочевой кислоты и пуриновых оснований при изменении ионной силы растворителя. Рассмотрены таутомерные формы пуриновых оснований с точки зрения их возможного взаимодействия с ферментом. Сделан вывод о лабильности электронной структуры пуриновых аналогов и о необходимости близкого соответствия между структурой ингибитора и субстрата в случае конкурентного ингибитора.

Уратоксидаза (КФ 1.7.3.3) — медьсодержащий фермент, катализирующий необратимое окисление мочевой кислоты в присутствии O_2 с образованием CO_2 , H_2O_2 и аллантина [1—4]. Фермент обладает узкой субстратной специфичностью. Кроме мочевой кислоты окисляются уратоксидазой только 8-аминоксантин и 6-тиомочевая кислота [5—7]. Различные (моно-, ди-, три-) метил-, amino- и азапроизводные пурина могут связываться с ферментом, ингибируя окисление мочевой кислоты [1, 5—8]. Сильными ингибиторами уратоксидазы являются ионы тяжелых металлов, причем, несмотря на наличие Cu^{2+} в ферменте, наибольший ингибирующий эффект оказывает ион Cu^{2+} [1, 2, 5]. Это ингибирование требует присутствия поливалентных ионов и не обнаруживается в среде, содержащей моновалентные ионы. Малер и др. [9, 10] показали, что эффективность ингибирования активности фермента Cu^{2+} зависит от природы используемых ионов.

С целью выявления закономерностей фермент-субстратного взаимодействия и в первую очередь влияния на это взаимодействие структуры пуринового аналога, мы исследовали ингибирование высокоочищенной уратоксидазы из печени свиньи природными производными пурина, наиболее близкими по структуре к мочевой кислоте: ксантином, гипоксантином, гуанином и аденином. Учитывая возможное влияние природы поливалентного иона на ингибирование уратоксидазы и изменение иони-

зации пуриновых оснований при различной ионной силе растворителя [12, 13], был изучен также характер ингибирования активности фермента пуриновыми аналогами в различных буферных системах с разной ионной силой.

Изучение зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента показало, что при изменении концентрации мочевой кислоты от $0,9 \cdot 10^{-5}$ до $6,0 \cdot 10^{-5}$ М эта зависимость выражается гиперболической функцией в боратных и фосфатных буферах (рН 8,5) с ионной силой I 0,15—0,16 и 0,075—0,08. На основании экспериментальных данных были вычислены K_m и V по методу Лайнуивера — Берка (табл. 1).

Таблица 1

Значения констант Михаэлиса и максимальной скорости окисления мочевой кислоты в различных буферных системах

Буферный раствор	$K_m \cdot 10^5$ М	V	
Боратный: 0,1 М; I 0,16, рН 8,5	1,05	0,132	
	0,05 М; I 0,08, рН 8,5	0,65	0,134
	0,05 М + NaCl; I 0,16, рН 8,5	0,75	0,110
Фосфатный: 0,05 М; I 0,15, рН 8,5	1,79	0,088	
	0,025 М; I 0,075, рН 8,5	0,95	0,081

Как было показано ранее [3, 9, 10], при реакции, катализируемой уратоксидазой, накапливается промежуточное соединение, имеющее максимум поглощения при 305—312 нм и сильно поглощающее при 293 нм, т. е. при максимуме поглощения мочевой кислоты. Дальнейшее ферментативное превращение этого промежуточного соединения ускоряется в присутствии бората, чем и объясняются полученные нами данные о том, что при использовании боратного буфера кажущаяся величина V выше, чем при использовании фосфатного буфера.

В работе [9] Малер и др. установили, что начальная скорость ферментативного этапа окисления мочевой кислоты не зависит от природы и ионной силы буфера. При использовании вместо 0,1 М боратного буфера (рН 8,5) с I 0,16—0,05 М боратного буфера с I 0,08 величина K_m уменьшалась в 2 раза, тогда как значение V практически не изменялось.

Чтобы выяснить, обусловлено ли такое изменение ферментативной реакции специфическим влиянием ионов бора или же действием ионной силы, кинетику реакции изучали в 0,05 и 0,025 М К, Na-фосфатных буферах (рН 8,5), ионная сила которых соответствовала 0,1 и 0,05 М боратным буферам, и в 0,05 М боратном буфере, ионная сила которого была доведена NaCl до 0,16. Показано, что при использовании фосфатных буферов сохраняется та же зависимость, что и в боратном буфере, т. е. с уменьшением ионной силы буфера величина K_m снижается, тогда как V не изменяется. При увеличении ионной силы 0,05 М боратного буфера до 0,16 добавлением NaCl практически не изменяется K_m и незначительно снижается V . Таким образом, при окислении мочевой кислоты уменьшение концентрации поливалентного иона буфера приводит к увеличению сродства фермента к субстрату независимо от природы иона.

Для изучения ингибирования активности уратоксидазы кинетические исследования проводили в присутствии двух или трех концентраций ксантина, гипоксантина, гуанина и аденина. При использовании этих соединений можно проследить значение заместителей при $C_{(2)}$, $C_{(6)}$ и $C_{(8)}$ пуринового кольца для связывания пурина с ферментом и влияние на взаимодействие пуринов с ферментом природы и ионной силы буфера.

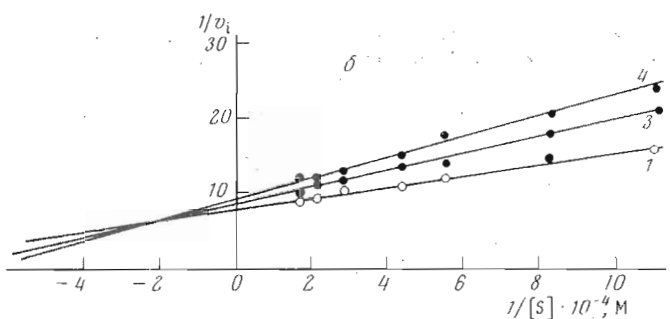
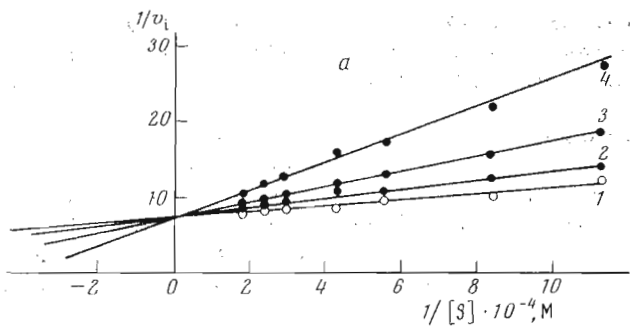


Рис. 1. Влияние гипоксантина на окисление мочевой кислоты уратоксидазой. Боратный буфер: *a* — 0,05 М; рН 8,5; *I* 0,08; *б* — 0,1 М; рН 8,5; *I* 0,16. 1 — без ингибитора; гипоксантин; 2— $0,92 \cdot 10^{-5}$ М; 3— $4,60 \cdot 10^{-5}$ М; 4— $9,20 \cdot 10^{-5}$ М

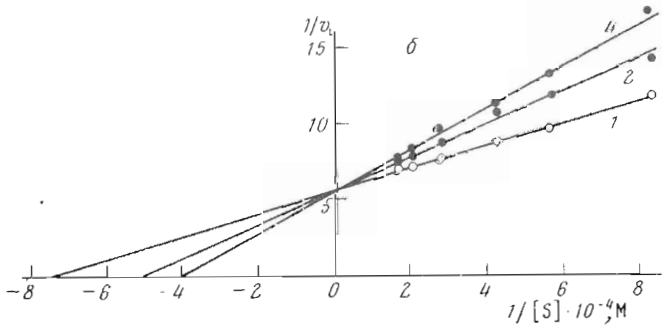
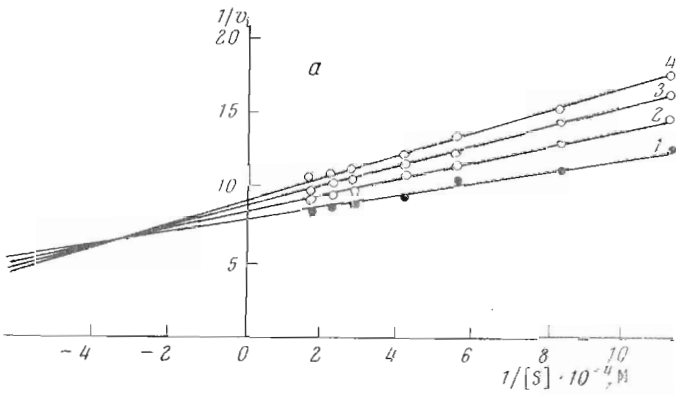


Рис. 2. Влияние гуанина на окисление мочевой кислоты уратоксидазой. Боратный буфер: *a* — 0,05 М; рН 8,5; *I* 0,08; *б* — 0,1 М; рН 8,5; *I* — 0,16. 1 — без ингибитора; гуанин; 2— $6,60 \cdot 10^{-5}$ М; 3— $7,20 \cdot 10^{-5}$ М; 4— $13,2 \cdot 10^{-5}$ М

Влияние ионной силы буферного раствора (рН 8,5) на спектры пуриновых оснований

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Боратный буфер		Фосфатный буфер	
		D (0,1 М, I 0,16)	D (0,05 М, I 0,08)	D (0,05 М, I 0,15)	D (0,025 М, I 0,075)
Мочевая кислота, $6,0 \cdot 10^{-5}$ М	236	0,595	0,550	0,630	0,610
	293	0,740	0,700	0,780	0,760
Ксантин, $8,55 \cdot 10^{-5}$ М	242	0,755	0,770		
	278	0,775	0,790		
Гипоксантин, $9,36 \cdot 10^{-5}$ М	252	1,050	1,100	0,945	0,965
Гуанин, $6,60 \cdot 10^{-5}$ М	248	0,775	0,750	0,750	0,720
	276	0,660	0,590	0,570	0,545
Аденин, $1,23 \cdot 10^{-5}$ М	262	0,615	0,560		

Таблица 3

Константы ингибирования $K_i \cdot 10^5$ М некоторых пуриновых оснований в различных буферных растворах (рН 8,5)

Буферный раствор	Ксантин	Гипоксантин	Гуанин	Аденин
Боратный: 0,1 М; I 0,16 0,05 М; I 0,08 0,05 М + NaCl; I 0,16	0,48	12,2	14,5	68,3
	2,03	3,1	21,0	29,0
	—	10,9	8,4	—
Фосфатный: 0,05 М; I 0,15 0,025 М; I 0,075	—	18,5	17,6	—
	—	2,8	9,6	—

Из полученных данных следует, что ксантин и гипоксантин являются конкурентными ингибиторами (рис. 1, а) при использовании 0,05 М боратного буфера (I 0,08). При использовании 0,1 М боратного буфера (I 0,16) эти ингибиторы действовали по смешанному типу (рис. 1, б). Гуанин, напротив, является ингибитором смешанного типа в 0,05 М боратном буфере и конкурентным ингибитором в 0,1 М боратном буфере (рис. 2). Аденин независимо от ионной силы боратного буфера является некокурентным ингибитором.

Чтобы выяснить, связано ли изменение типа ингибирования с влиянием ионной силы или же с природой используемого буфера, была изучена кинетика ингибирования уратоксидазы гипоксантином и гуанином в 0,05 и 0,025 М фосфатных буферах и в 0,05 М боратном буфере, ионная сила которого была доведена NaCl до 0,16. Как видно из рис. 1, а и 3, а, гипоксантин является конкурентным ингибитором при I 0,075—0,08 независимо от природы используемого буфера, тогда как гуанин (рис. 2, а и 4, а) в этих же условиях действует по смешанному типу ингибирования. При увеличении ионной силы указанных буферов тип ингибирования изменялся так же, как в 0,1 М боратном буфере (рис. 1, б; 2, б; 3, б, в; 4, а, б).

Следует подчеркнуть, что ингибирование уратоксидазы ксантином, гипоксантином, гуанином и аденином в 0,1 и 0,05 М боратных буферах (рН 8,5) обратимо.

Для выявления влияния ионной силы растворителя на электронную структуру пуриновых соединений были получены УФ-спектры поглощения мочевой кислоты, ксантина, гипоксантина, гуанина и аденина в 0,1 и 0,05 М боратных и 0,05 и 0,025 М фосфатных буферах. В УФ-спектрах данных соединений отсутствовали бато- и гипсохромные сдвиги в $\lambda_{\text{макс}}$,

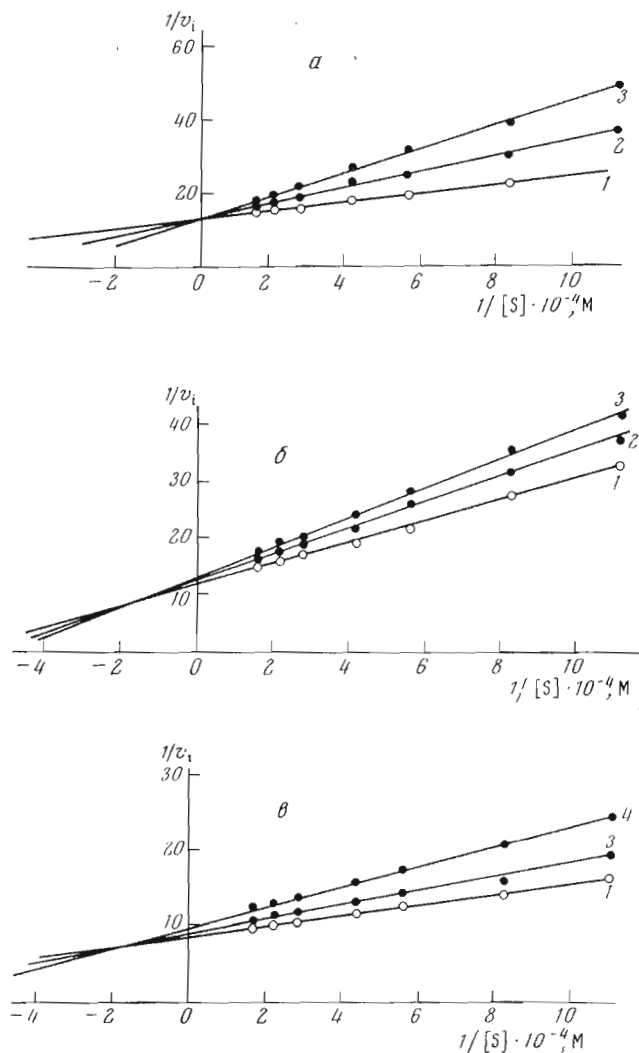


Рис. 3. Влияние гипоксантина на окисление мочевой кислоты уратоксидазой. Фосфатный буфер: *a* — 0,025 М; pH 8,5; *I* 0,075; *б* — 0,05 М; pH 8,5; *I* 0,15; *в* — 0,05 М обратный буфер (pH 8,5) + NaCl, *I* 0,16; *I* — без ингибитора; гипоксантин: *2*— $2,30 \cdot 10^{-5}$ М, *3*— $4,60 \cdot 10^{-5}$ М, *4*— $9,20 \cdot 10^{-5}$ М

которые могли бы свидетельствовать о переходе одной таутомерной формы в другую [14]. УФ-спектры характеризовались наличием гипер- и гипохромных эффектов, что указывало на изменение характера распределения электронных плотностей в изучаемых соединениях в пределах одной таутомерной формы при изменении ионной силы буферных растворов, причем в тех условиях, при которых для ксантина и гипоксантина выявлялись гиперхромные эффекты, для гуанина наблюдались гипохромные эффекты. В табл. 2 представлены УФ-спектры мочевой кислоты, гипоксантина, гуанина и аденина в 0,1 и 0,05 М боратных буферах. Изменения в спектрах этих соединений в 0,05 и 0,025 М фосфатных буферах аналогичны.

Чтобы обсудить полученные кинетические данные об ингибировании уратоксидазы, были рассмотрены таутомерные формы пуриновых оснований. В структуре мочевой кислоты имеются три карбонильные и четыре иминогруппы, способные к ионизации, что обеспечивает существование

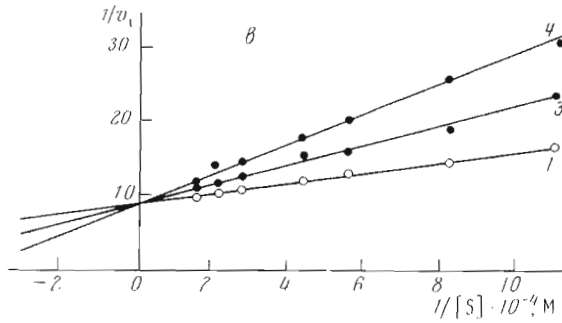
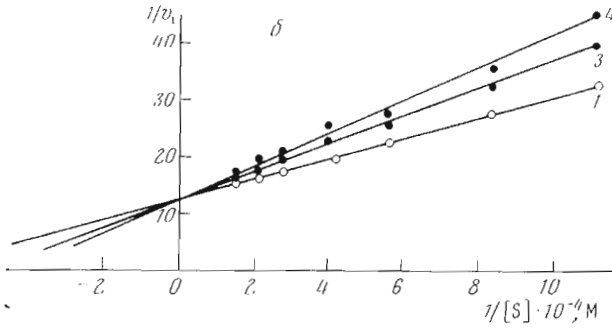
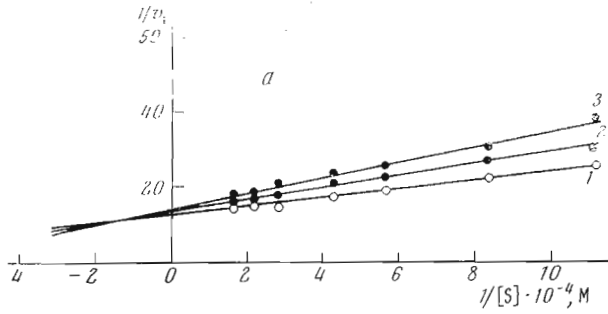
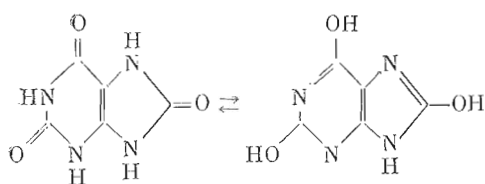
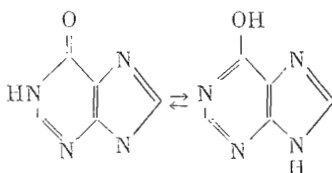


Рис. 4. Влияние гуанина на окисление мочевой кислоты уратоксидазой. Фосфатный буфер: *a* — 0,025 М; pH 8,5; *1* — 0,075; *б* — 0,05 М; pH 8,5; *1* — 0,15; *в* — 0,05 М боратный буфер (pH 8,5) + NaCl; *1* — 0,16. *1* — без ингибитора; гуанин: *2* — $3,30 \cdot 10^{-5}$ М, *3* — $6,60 \cdot 10^{-5}$ М, *4* — $13,20 \cdot 10^{-5}$ М

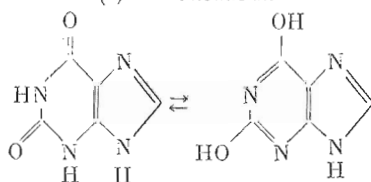
различных таутомерных форм, константа равновесия между которыми зависит от экспериментальных условий, в частности от pH среды [15, 16]. Мочевая кислота взаимодействует с уратоксидазой в форме лактама, причем при pH 7,0 диссоциирует NH-группа в положении 9 ($pK_{(9)} 5,75$) и атом азота имеет отрицательный заряд при одновременной повышенной электронной плотности атома кислорода при $C_{(2)}$, $C_{(6)}$ и $C_{(8)}$ [16]. Наличие различных таутомерных форм показано для всех пуриновых оснований [12]. Квантово-механическими расчетами доказано распределение электронных плотностей в таутомерных формах пуриновых оснований [12, 16]. Пюльман и Накаяма [16] определили места протонирования в пуриновых основаниях и сделали вывод о преобладании таутомерных форм (1):



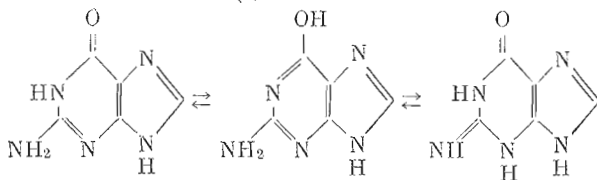
(I) Мочевая кислота



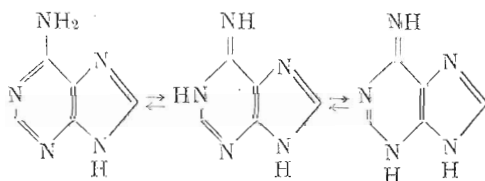
(I) Гипоксантин



(I) Ксантин



(I) Гуанин



(I) Аденин

Полученные нами УФ-спектры поглощения мочевой кислоты и пуриновых оснований, указывающие на изменения в электронной структуре этих соединений при использовании в качестве растворителей буферных растворов различной ионной силы, согласуются с данными работы [13]. Например, для аденина при $I = 0$ $pK_a = 4,18$, при $I = 1$ $pK_a = 4,35$. На ионизацию пуриновых оснований влияет не только ионная сила раствора, но и структура, заряд катиона и аниона [12, 13].

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что сильными ингибиторами уратоксидазы будут соединения, в структуре которых имеется распределение электронных плотностей такое же, как в мочевой кислоте (например, ксантин, гипоксантин, хлорпроизводные пурина, 2,8-диазагипоксантин и 8-азаксантин). 2,8-Диазагипоксантин, 2-азагипоксантин и 8-азаксантин в положениях 2 и 8 содержат атом N с неподеленной парой электронов. Поэтому с атомом N в положениях 2 и 8 могут образовываться связи (как и в субстрате) с ферментом, тогда как 8-азагипоксантин, у которого в положении 2 кольца находится СН-группа, не ингибирует ферментативную реакцию, что подтверждается данными Ивата и др. [8]. Ксантин и гипоксантин по данным одних авторов [5, 7, 9] являются сильными конкурентными ингибиторами уратоксидазы, тогда как по данным других авторов [8] они вообще не являются ингибиторами. Возможно, это

объясняется тем, что фермент, полученный из почки быка, отличается по свойствам от уратоксидазы из печени свиньи.

Нами было показано, что наиболее сильным ингибитором уратоксидазы является ксантин (табл. 3), структура которого наиболее близка к структуре мочевой кислоты. Электронная структура пуриновых оснований лабильна. Так, например, распределение электронных плотностей в молекуле мочевой кислоты, ксантина, гипоксантина и аденина меняется при изменении ионной силы буферного раствора. Характер распределения электронных плотностей в молекуле мочевой кислоты при $I = 0,075-0,08$ благоприятствует фермент-субстратному взаимодействию, практически не изменяя скорости распада комплекса фермента с продуктами реакции. Эти изменения определяют также характер взаимодействия указанных ингибиторов с ферментом, который не зависит от природы поливалентного иона. По-видимому, условием действия фермента является близкое соответствие между структурой субстрата или пуринового аналога и структурой активного центра на сравнительно большом участке фермента, поэтому конкурентный ингибитор должен удовлетворять этим требованиям. Возможно, что активный центр уратоксидазы имеет внутри «полости» или «складки», которые содержат дополнительные группы, влияющие на тип ингибирования, вызывая пространственные затруднения или электростатическое отталкивание при взаимодействии ингибитора с ферментом, причем активность данных групп в значительной мере может зависеть, например, от ионной силы буферных растворов. Данное предположение может объяснить наличие двух типов ингибирования (конкурентного и смешанного) для одних и тех же соединений — ксантина, гипоксантина и гуанина при изменении ионной силы буферных растворов. Неконкурентный тип торможения для аденина указывает на то, что данное соединение не связывается с контактным участком активного центра; это подтверждает наше предположение о существенном влиянии электронной структуры ингибитора на его ингибиторную активность и тип ингибирования. При взаимодействии ингибитора с ферментом наличие NH_2 -группы при $\text{C}_{(6)}$ в молекуле пурина делает невозможным взаимодействие ингибитора с контактной площадкой активного центра фермента.

Известно, что уратоксидаза из печени свиньи имеет четвертичную структуру [17] и является димером с M 120 000, состоящим из 4 идентичных субъединиц. С другой стороны, нами показано, что величина K_i исследованных ингибиторов зависит от общей ионной силы буфера, а величина K_m субстрата определяется не общей ионной силой, а концентрацией поливалентного иона. Сопоставляя эти факты, можно предположить, что конформационные изменения молекулы фермента (например, взаимное пространственное расположение субъединиц) также вносят свой вклад в характер ингибирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали очищенный препарат уратоксидазы с удельной активностью 1,8—2,0 мкмоль/мг белка за 1 мин, полученный по методу Робинса и др. [18] с последующей фильтрацией через сефадекс G-100. Препарат хранили при 4° в виде лиофильного порошка. Активность определяли по убыли поглощения мочевой кислоты при 293 нм в кварцевой термостатированной кювете (l 1 см) при $25,0 \pm 0,2^\circ$. Опытная кювета содержала 20—25 мкг ферментного белка и в различной концентрации (от $0,9 \cdot 10^{-5}$ до $6,0 \cdot 10^{-5}$ М) мочевую кислоту; объем смеси доводили до 3 мл соответствующим буфером. Контрольная кювета содержала те же компоненты, кроме субстрата. Реакцию начинали внесением субстрата после предварительной инкубации в течение 5 мин при 25° . Начальную скорость определяли методом экстраполяции. За единицу ферментативной актив-

ности принимали такое количество белка, которое вызывало превращение 1 мкмоль мочево́й кислоты за 1 мин при 25°. Удельную активность выражали в единицах на 1 мг белка. Белок определяли по методу Лоури. Для определения активности использовали 0,1 М боратный буфер (рН 8,5), I 0,16; 0,05 М боратный буфер (рН 8,5), I 0,08; 0,05 М боратный буфер (рН 8,5), ионная сила которого была доведена NaCl до I 0,16; 0,05 М Na, К-фосфатный буфер (рН 8,5), $I = 0,15$ и 0,025 М Na, К-фосфатный буфер (рН 8,5), I 0,075. Расчет ионной силы проводили по формуле $I = \frac{1}{2} \sum CZ^2$, где C — концентрация иона, Z — заряд иона. При оценке кинетических данных использовали средние данные начальных скоростей, полученных из 3—4 опытов. Ошибка определения составляла не более 5%.

Значения K_m и K_i определяли графическим методом двойных обратных величин. Для определения констант ингибирования проводили ферментативную реакцию с использованием различных концентраций субстрата (0,9—6,0·10⁻⁵ М) в присутствии двух или трех концентраций ингибитора.

При конкурентном типе ингибирования K_i рассчитывали по уравнению

$$K_i = \frac{K_m [I]}{K_{mi} - K_m},$$

где $1/K_{mi}$ — отрезок, отсекаемый на оси ординат. При смешанном и неконкурентном типах ингибирования K_i рассчитывали по тангенсу угла наклона

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_m}{V} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right), \text{ откуда } K_i = \frac{K_m [I]}{\left(\operatorname{tg} \alpha - \frac{K_m}{V} \right) V}.$$

При проведении кинетических исследований использовали аналитически чистые препараты мочево́й кислоты, ксантина, гипоксантина, гуанина и аденина, полученные путем двукратной перекристаллизации из бидистиллированной воды препаратов фирмы «Reanal» (Венгрия). Коэффициенты молярной экстинкции рассчитаны на основании УФ-спектров в 0,02М Na, К-фосфатном буфере (рН 7,0), т. е. в условиях, описанных ранее [19]. Для мочево́й кислоты ϵ_{293} 1,26·10⁴, ксантина ϵ_{270} 1,08·10⁴, гипоксантина ϵ_{250} 1,14·10⁴, гуанина ϵ_{246} 1,04·10⁴ и для аденина ϵ_{261} 1,30·10⁴. Эти значения соответствуют данным работы [19]. Спектры поглощения пуриновых соединений были сняты не менее 4 раз во всех вышеуказанных буферных системах в пределах концентраций, используемых для ингибирования уратоксидазы. Различия в значениях оптической плотности в λ_{\max} составляли $\pm 0,005$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Keilin D., Hartree E. F. (1936) Proc. Roy. Soc., **B119**, 114—143.
2. Davidson J. N. (1942) Biochem. J., **36**, 252—258.
3. Praetorius E. (1948) Biochem. et biophys. acta, **2**, 602—613.
4. Bentley R., Neuberger A. (1952) Biochem. J., **52**, 694—699.
5. Mahler H. R. (1963) in The Enzymes (Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., eds), vol. 8, pp. 285—311, Acad. Press N. Y. and London.
6. Bergmann F., Ungar-Waron H., Kwientny-Govrin N. (1963) Biochem. J., **86**, 292—298.
7. Bergmann F., Kwientny-Govrin N., Ungar-Waron H., Kalmus A., Tamari M. (1963) Biochem. J., **86**, 567—574.
8. Iwata H., Yamamoto I., Gonda E., Morita K., Nakamura M., Sumi K. (1973) Biochem. Pharmac., **22**, 2237—2245.
9. Baum H., Hubscher G., Mahler H. (1956) Biochim. et biophys. acta, **22**, 514—527.
10. Prist D. G., Pitt O. M. (1972) Anal. Biochem., **50**, 195—205.
11. Baum H., Mahler H. R., Hubscher G. (1956) Biochim. et biophys. acta, **22**, 528—540.

12. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шиббаев В. Н. (1970) Органическая химия нуклеиновых кислот, стр. 146—215, «Химия», М.
13. Clauwaert Y., Stockx Y. (1968) Z. Naturforsch., **23b**, 25—32.
14. Bergmann F., Dikstein S. (1955) J. Amer. Chem. Soc., **77**, 691—696.
15. Holiday E. (1930) Biochem. J., **24**, 519—521.
16. Пюльман Б., Пюльман А. (1965) Квантовая биохимия, стр. 80—190, «Мир», М.
17. Pitts O. M., Prist D. G., Fish W. W. (1974) Biochemistry, **13**, 888—892.
18. Robbins K. C., Barnett E., Grant L. H. (1955) J. Biol. Chem., **216**, 27—35.
19. Watanabe Y., Yano M., Fukumo J. (1969) Agric. and Biol. Chem., **33**, 1282—1290.

Поступила в редакцию
29.X.1974

PECULIARITIES OF URATE OXIDASE INHIBITION BY PURINES

IKAGAN Z. S., TCHERNYAVSKAYA M. A., SURINA T. Ya.,
VOLKOVA T. Yu.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The inhibiting effects of several purines on urate oxidation catalyzed by urate oxidase (EC 1.7.3.3) from pig liver have been studied. The enzyme affinity to the substrate (i. e. the value of K_m) proved to be depended on the concentration of polyvalent buffer ions rather than on nature. Xanthine, hypoxanthine, guanine, and adenine were reversible inhibitors for this enzyme. The inhibition type with purines was sensitive to the ionic strength of their the buffer solution. At $\mu = 0.075-0.080$, xanthine and hypoxanthine are competitive inhibitors, guanine is a mixed type inhibitor; at $\mu = 0.15-0.16$ the character of inhibition for these compounds is reversed. Adenine exercised a noncompetitive inhibition in all of the buffer systems. The spectral changes (hyper- and hypochromic effects) were observed for the urate and pyrine bases at different values of ionic strength. The tautomeric forms of the purine bases were taken into account from the viewpoint of their possible interaction with the enzyme. A conclusion was made that the electronic structure of purine analogs is labile, and that the competitive inhibitors possess the structure similar to that of the substrate.
