

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЫ-1 НАПРОКСЕНОМ

Берзова А.П.¹, Бархатов В.И.², Митрофанов С.И.³

*1 – Московский физико-технический институт, факультет нано-, био-, информационных и когнитивных технологий, 2 – Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический, 3 – Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия
E-mail: dawqer@mail.ru, barkhatovv@yandex.ru, mitroser04@mail.ru*

Фермент простагландин-Н-синтаза (также называемый циклооксигеназой, далее PGHS) играет важную роль в функционировании организма млекопитающих. Две изоформы (PGHS-1 и PGHS-2) участвуют в поддержании тонуса гладкой мускулатуры, регуляции свёртывания крови, развитии воспаления и других процессах. Фермент существует в виде гомодимера, локализован на мембранах ЭПР и ядра и катализирует две реакции: специфическую – циклооксигеназную и неспецифическую – пероксидазную, причём реакции взаимосвязаны [1,2,3].

Основной интерес к PGHS с точки зрения фармакологии заключается в том, что ингибиторы её циклооксигеназной активности являются нестероидными противовоспалительными препаратами. Ингибиторы обладают разной селективностью по отношению к изоформам фермента, а также различными побочными эффектами.

Во времена открытия PGHS различали необратимые (аспирин и производные) [4] и обратимые конкурентные ингибиторы. В дальнейшем было показано, что некоторые обратимые ингибиторы являются времязависимыми, и была предложена кинетическая схема их действия [5,6].

Мы выбрали для исследований напроксен, широко известный как конкурентный ингибитор, для которого не было сведений о времязависимом связывании. Однако в эксперименте было показано обратное.

Кинетическая схема, отражающая реакцию в присутствии времязависимого ингибитора, не может быть описана целиком в рамках квазистационарного или квазиравновесного приближения. Мы предположили (и в дальнейшем подтвердили правомерность такого предположения), что характеристическое время достижения квазистационара в реакции с субстратом много меньше, чем время достижения равновесия в реакции с ингибитором. Это позволило разделить схему на два участка: связывание фермента с ингибитором и реакция фермента с субстратом.

Связывание фермента и ингибитора после их смешивания можно рассматривать в предстационарном режиме. При последующем добавлении субстрата можно считать, что концентрация фермент-ингибиторного комплекса меняется пренебрежимо мало за время достижения стационарного по субстрату режима, и применять стационарное приближение, учитывая только не связанный с ингибитором фермент. Таким образом, скорость реакции в начальный момент времени после добавления субстрата пропорциональна концентрации активного (свободного от ингибитора) фермента и практически не зависит от концентрации ингибитора.

Эксперимент ставился следующим образом. В буферный раствор добавляли PGHS и напроксен и прединкубировали некоторое время. Далее добавляли субстрат (арахидоновую кислоту) и детектировали скорость поглощения кислорода в процессе реакции. Зависимость начальной скорости реакции от времени прединкубации белка с ингибитором мы приблизили согласно рассчитанному в предстационарном режиме уравнению $E+I \rightleftharpoons EI$ (рис.1). По полученным графикам вычислили равновесную при данной концентрации ингибитора концентрацию активного белка. Мы построили зависимость этой концентрации от концентрации ингибитора (рис.2) и показали, что эта зависимость не описывается простейшей схемой ингибирования ($R^2=0,944$), приведенной выше, а также схемой $E+I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons E^*I$, приведённой в работе [5] для ингибиторов индометацина и флурбипрофена.

Мы предложили другую схему: $EE + I \rightleftharpoons EIE$, $EIE + I \rightleftharpoons EIEI$. Она описала зависимость существенно лучше ($R^2=0,999$). В этом случае равновесная константа связывания первой молекулы ингибитора оказалась равной 54 ± 7 нМ, второй молекулы – $7,2 \pm 3,4$ мкМ. Скорость реакции с субстратом формы EIE составила $20\% \pm 3\%$ от скорости для EE (реакция для IEIE отсутствовала).

Такая схема описывает аллостерический эффект ингибитора. Эта схема также может описывать случай связывания ферментом одной молекулы ингибитора неконкурентно с низкой константой и одной – конкурентно с более высокой, при значительном различии констант. Для определения того, какой из этих механизмов является правильным, требуются дальнейшие исследования.

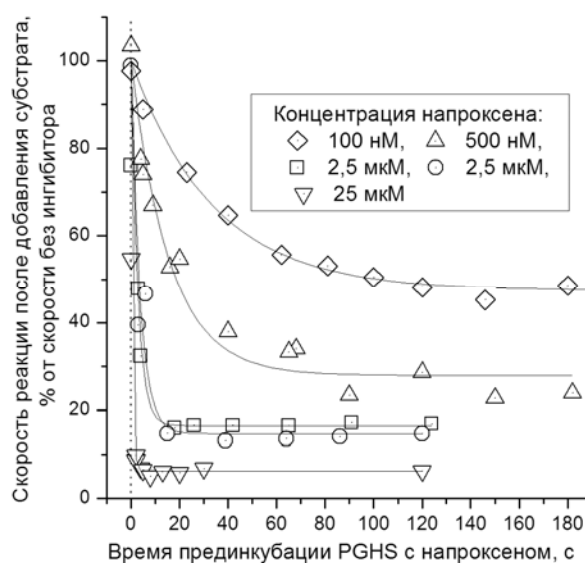


Рис.1. Зависимость скорости реакции после добавления субстрата от времени прединкубации фермента с напроксеном перед добавлением субстрата.

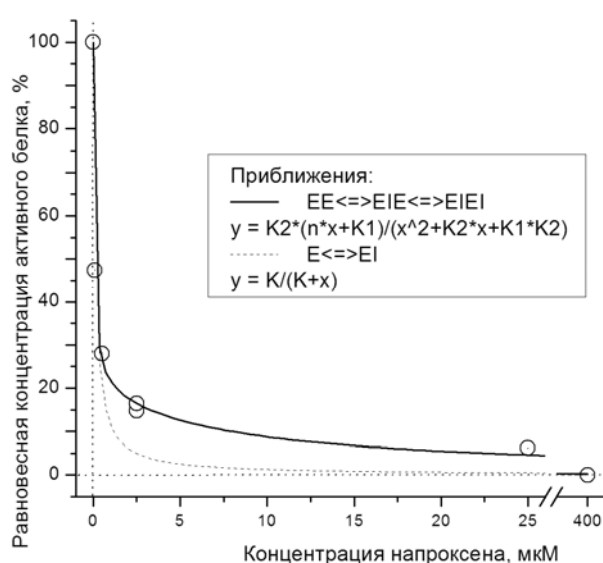


Рис.2. Зависимость равновесной скорости от концентрации напроксена и приближение этой зависимости согласно кинетическим схемам

Литература

1. Tsai AL, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues // Arch Biochem Biophys. 2010 Jan 1;493(1):103-24.
2. Rouzer CA, Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases // Chem Rev. 2003 Jun;103(6):2239-304.
3. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology // Annu Rev Biochem. 2000;69:145-82.
4. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin // Proc Natl Acad Sci USA. 1975 Aug;72(8):3073-6.
5. Callan OH, So OY, Swinney DC. The kinetic factors that determine the affinity and selectivity for slow binding inhibition of human prostaglandin H synthase 1 and 2 by indomethacin and flurbiprofen. J Biol Chem. 1996 Feb 16;271(7):3548-54.
6. So OY, Scarafia LE, Mak AY, Callan OH, Swinney DC. The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin h synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation. J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5801-7.