

Кооперативные эффекты при ингибировании циклооксигеназы напроксеном

А.П. Берзова², В.И. Бархатов^{1,4}, П.В. Вржещ⁴, С.И. Митрофанов^{3,4}

1 – Московский физико-технический институт, факультет нано-, био-, информационных и когнитивных технологий, 2 – Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, 3 – Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 4 – Московский биотехнологический центр им. Ломоносова, Москва, Россия

Циклооксигеназа (PGHS, EC 1.14.99.1), – мембранно-связанный гемопротейн, активный центр которого находится на поверхности эндоплазматической сети, граничащей с цитоплазмой. Фермент представляет собой гомодимер с молекулярным весом одного мономера около 70 кДа. У млекопитающих циклооксигеназа представлена двумя изоформами [1,2], первая из которых считается конститутивной, а вторая – индуцибельной и, в частности, обуславливает развитие воспаления [1].

Этот фермент катализирует две последовательные реакции, занимающие ключевое место в синтезе простаноидов [3,4]. В процессе циклооксигеназной, специфичной для данного фермента, реакции арахидоновая (и некоторые другие полиненасыщенные) кислота окисляется двумя молекулами кислорода до простагландина G₂. Пероксидазная реакция приводит к восстановлению простагландин G₂ до простагландина H₂ (и многих других гидропероксидов – до соответствующих спиртов) под действием различных восстановителей [5]. В ходе обеих реакций происходит необратимая инактивация фермента.

Действие большинства нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), широко используемых в мире, направлено на ингибирование циклооксигеназы [6]. Наличие побочных эффектов этих препаратов обусловлено неспецифичным подавлением синтеза простагландинов, отвечающих как за воспалительные и болевые процессы, так и за нормальное функционирование организма - поддержание тонуса гладкой мускулатуры, регуляцию свёртывания крови [1]. Это побуждает ученых искать новые ингибиторы с менее выраженными отрицательными эффектами.

Целью данной работы является определение кинетического механизма взаимодействия фермента циклооксигеназы с ингибитором напроксеном.

Мы показали, что при ингибировании циклооксигеназы напроксеном как медленным ингибитором значение начальной скорости циклооксигеназной реакции пропорционально доле не связанного с ингибитором фермента во время реакции. В дальнейшем мы использовали это для определения доли фермента не связанного с напроксеном.

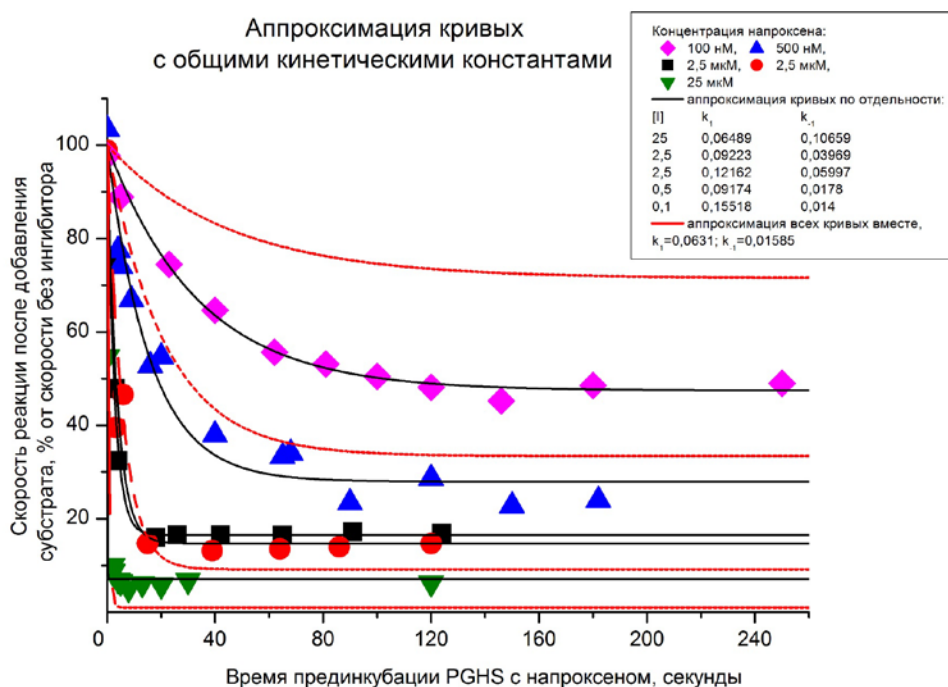


Рис. 1. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от времени прединкубации PGHS с напроксеном при фиксированной концентрации ингибитора.

Красная линия – аппроксимация, сделанная согласно простейшей схеме реакции ингибирования: $E + I \rightleftharpoons EI$. Чёрная линия – аппроксимация, сделанная в соответствии со схемой $EE \rightleftharpoons EIE \rightleftharpoons EIEI$.

Условия: $t=25^{\circ}\text{C}$, буфер трис-Cl 50 мМ pH 8,0, [твин-20]=0,1% (по объему), $[\text{Fe(II)CN}]=1 \text{ мМ}$, $[\text{Hem}]=2 \text{ мкМ}$, $[\text{AA}]=0,1 \text{ мМ}$, PGHS 20 мкл (для (1) и (4) PGHS 10 мкл).

Порядок добавления: $((\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6] \rightarrow \text{Hem}) \rightarrow \text{Napg} \rightarrow \text{PGHS}) \rightarrow \text{AA}$.

Экспериментально получены зависимости долей не связанного с ингибитором фермента от времени прединкубации фермента с ингибитором при фиксированной концентрации ингибитора (рис.1). Полученные результаты говорят о необходимости учитывать кооперативные эффекты между субъединицами белка, влияющие на взаимодействие с ингибитором. В кинетической схеме (1) циклооксигеназа рассматривается как димер, и учитывается кооперативный эффект связывания первой молекулы ингибитора как на каталитическую активность фермента, так и на связывание второй молекулы ингибитора.



Кроме того, получено решение этой схемы, которое описывает поведение системы фермент-ингибитор как в равновесном, так и в предстационарном состояниях для различных начальных условий, соответствующих ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса в предстационарной фазе. В рамках представления о функциональном взаимодействии мономеров фермента при ингибировании напроксеном, получено соответствие экспериментальных зависимостей и теоретических расчетов при условии изменения каталитической активности и сродства к ингибитору одного из мономеров циклооксигеназы после связывания с ингибитором соседнего мономера. На основании результатов эксперимента вычислены значения равновесных констант связывания $K_1 = 0,054$ мкМ, $K_2 = 74$ мкМ.

Список используемой литературы

- [1] W. L. Smith, R. Langenbach, 2001. The Journal of Clinical Investigation, 12, 1491-1495.
- [2] Rome, Lands, 1975.
- [3] Hamberg M., Svensson J., Wakabayashi T., Samuelsson B., 1974 Feb. Proc Natl Acad Sci.;71(2):345-9.
- [4] Nugteren D. H., Hazelhof E., 1973. Biochim Biophys Acta. 20;326 (3):448-61.
- [5] Nugteren D. H., van Dorp D. A., 1965. Biochim Biophys Acta.;98 (3):654-6.
- [6] Жураховская Д.В., Лоскутова Е.Е., Виноградова И.А., 2013. ФГБОУ ВПО РУДН, стр. 1-8.