

Определение кинетического механизма ингибирования простагландин-Н-синтазы-1 (COX-1) «медленными» ингибиторами на примере индометацина

Нуждина Е.О.¹, Бархатов В.И.², Митрофанов С.И.², Филимонов И.С.²

1 – Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия, 2 – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Международный биотехнологический центр, Москва, Россия

E-mail: nuzhdina.katerina@gmail.ru, barkhatovv@yandex.ru, mitroser04@mail.ru

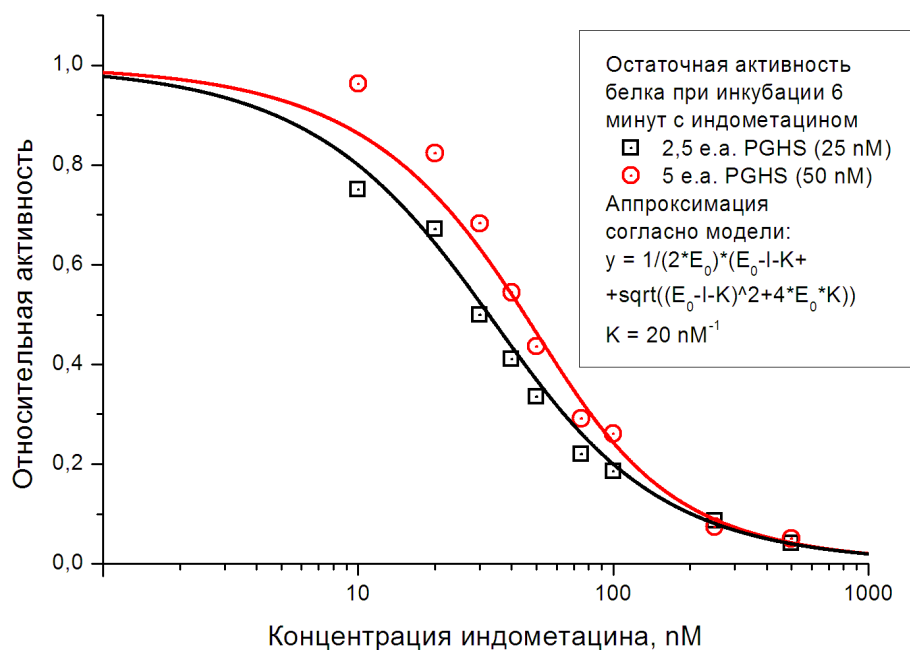
Действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), широко используемых в медицине, направлено на ингибирование фермента простагландин-Н-синтазы (COX, циклооксигеназа, PGHS, К.Ф. 1.14.99.1) [1]. Эта группа лекарственных средств обладает обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным эффектами, уменьшает боль, лихорадку. Несмотря на большое количество известных на данный момент НПВП, молекулярный механизм взаимодействия PGHS с ингибиторами остаётся не полностью изученным.

В данной работе подробно исследован кинетический механизм ингибирования PGHS-1 индометацином. Индометацин – это производное индолоуксусной кислоты, его противовоспалительные свойства известны уже более 30 лет.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика определения кинетических параметров ингибиторов COX на примере напроксена [2].

Мы использовали амперометрический метод для изучения кинетического механизма взаимодействия фермента COX с ингибитором индометацином. Измерения проводили в 50 mM трис-хлоридном буферном растворе, pH=8,0, при температуре 25°C, концентрации ферроцианида калия 1 mM и арахидоновой кислоты 100 μ M. Мы получили экспериментальные зависимости активности препарата фермента от времени инкубации с ингибитором и фермент-ингибиторного комплекса при его диссоциации после разбавления. Также мы получили зависимости равновесных значений активности фермента (после 6 минут инкубации с ингибитором) при различных концентрациях ингибитора и фермента.

Из полученных данных мы сделали вывод, что индометацин является медленным [3] ингибитором, то есть время его взаимодействия с ферментом намного превышает время установления стационарного состояния по субстрату. Взаимодействие является полностью обратимым. Мы определили равновесную константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса как 20 nM, при этом элементарная константа ингибирования составила $80 \text{ (mM}\cdot\text{s)}^{-1}$, а элементарная константа диссоциации $1,6\cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Влияния кооперативных эффектов при связывании индометацина обнаружено не было. Эффективная концентрация ингибитора оказалась близка к концентрации фермента, используемой в экспериментах. Это позволило, проводя эксперимент при разной активности фермента, определить его концентрацию. 10 nM фермента оказались соответствующими активности потребления кислорода 1 μ M в секунду



Фиг.1. Зависимость равновесной активности фермента (в долях от активности без ингибитора) от концентрации индометацина при концентрации фермента 25 nM (соответствует 2,5 единиц) и 50 nM (соответствует 5 единиц активности без ингибитора). Условия проведения экспериментов см. в тексте.

Литература

- [1] Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Vane J.R., Botting R.M., Inflammation Res., 1998, 47 (sup 2), S78-S87
- [2] Аллостерические взаимодействия между субъединицами димерного белка простагландин-Н-синтаза-1 (COX-1) при ингибировании напроксеном. Берзова А.П. и др. XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014». Сборник тезисов докладов. Серия: Физика, с.53
- [3] Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. Blobaum A.L., Marnett L.J., J Med Chem. 2007, 50(7):1425-41