

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ КООПЕРАТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИТОРА НАПРОКСЕНА С ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗОЙ-1 МОЖЕТ БЫТЬ ОПИСАНА КАК НЕКОНКУРЕНТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА С ГЕТЕРОГЕННЫМ ПРЕПАРАТОМ ФЕРМЕНТА*

© 2018 И.С. Филимонов¹, А.П. Берзова², В.И. Бархатов¹,
А.В. Кривошей¹, Н.А. Трушкин¹, П.В. Вржещ^{1,2**}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Международный биотехнологический центр, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва,
Россия; электронная почта: biosentr@list.ru

Поступила в редакцию 28.04.17
После доработки 30.08.17

Кинетический механизм действия нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) на главную для них фармакологическую мишень, фермент простагландин-Н-синтазу (PGHS), до сих пор не установлен. Показано, что ингибирование PGHS-1 из везикулярных желез барана представителем НПВП напроксеном не демонстрирует конкурентный по отношению к арахидоновой кислоте характер и не описывается в рамках обычно используемых схем, но может быть описано с учетом наличия отрицательной кооперативности циклооксигеназных активных центров гомодимерного PGHS-1 при связывании напроксена (первая молекула напроксена образует более прочный комплекс ($K_1 = 0,1$ мкМ), чем вторая ($K_2 = 9,2$ мкМ)). Кажущийся неконкурентным наблюдаемый характер взаимодействия напроксена с ферментом объясняется медленной диссоциацией фермент-ингибиторных комплексов. Оказалось, что те же экспериментальные данные описываются и без привлечения представлений о взаимодействии между субъединицами фермента, но в предположении о наличии смеси двух форм фермента с константами ингибирования $K_\alpha = 0,05$ мкМ и $K_\beta = 18,3$ мкМ. Теоретическое рассмотрение и численные расчеты показали, что такое явление кинетической конвергенции двух моделей имеет общий характер: при $K_2 \gg K_1$ порождаемые кооперативной моделью кинетические закономерности (как в состоянии равновесия, так и для кинетики ингибирования) описываются схемой, предусматривающей наличие двух форм фермента с константами ингибирования $K_\alpha = K_1/2$, $K_\beta = 2 \cdot K_2$. При $K_2 \ll K_1$ кооперативная модель проявляет себя как схема одновременного присоединения к ферменту двух молекул ингибитора с наблюдаемой константой ингибирования K ($K = K_1 \cdot K_2$). Сведение отрицательной кооперативности к простой неоднородности препарата фермента по сродству к ингибитору может служить удобным и простым способом для практического описания таких явлений в энзимологии, биотехнологии, фармакологии и других областях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: PGHS-1, COX-1, циклооксигеназа, НПВП, ингибиторы, напроксен, Алив, кинетика, кооперативность, гомодимер.

Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS) (К.Ф. 1.14.99.1, известный также как циклооксигеназа (COX)), играет ключевую роль в развитии воспалительных процессов в организме млекопитающих, катализируя превращение арахидоновой кислоты в простагландин H_2 — исходное соединение в биосинтезе простагландинов, тромбксана и простаглицлина [1]. Изоформа PGHS-1 постоянно присутствует в клетках,

обеспечивая их нормальное функционирование [2], другая изоформа (PGHS-2) нарабатывается в ответ на определенные стимулы, такие как цитокины или факторы роста [3]. Действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), широко используемых в медицине, направлено на ингибирование PGHS [4, 5].

Принято считать, что все ингибиторы PGHS связываются в циклооксигеназном активном центре фермента, проявляя конкурентный механизм действия по отношению к субстрату — арахидоновой кислоте. Об этом однозначно свидетельствуют данные рентгеноструктурного анализа [6, 7] и кинетические эксперименты для

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (Link.springer.com), том 83, вып. 2, 2018.

** Адресат для корреспонденции.

некоторых ингибиторов [8, 9]. Во многих работах исследовали накопление продукта биферментной реакции (простагландина E_2) за 5–15 мин [10–13]. При интерпретации результатов этих экспериментов необходимо учитывать, что фермент PGHS подвержен быстрой инактивации в процессе катализируемых реакций [14–16] и измеряемая величина в этих случаях отражала не скорость ферментативной реакции, а предельный выход продукта реакции.

Фермент PGHS является димером, состоящим из двух идентичных полипептидных цепей с мол. массой 72 кДа [17]. Каждая субъединица фермента имеет два активных центра, в одном из которых протекает циклооксигеназная (окисление арахидоновой кислоты до простагландина G_2 [18]), в другом – пероксидазная (восстановление перекисной группы простагландина G_2 до спиртовой [19]) реакция. В результате двух реакций образуется простагландин H_2 [20], который далее под действием специфических ферментов – конвертаз – превращается в другие физиологически активные соединения, такие как простагландины E_2 , D_2 , $F_{2\alpha}$, тромбоксан A_2 , простагландин [1, 21, 22].

Ранее считалось, что димерная природа PGHS не проявляется в кинетическом механизме действия фермента, хотя приводились свидетельства возможного взаимодействия между активными центрами разных субъединиц или одной субъединицы [23–25]. В последнее время количество подобных работ возросло, и даже делаются выводы о приобретенной [26, 27] или изначальной [28] функциональной асимметрии субъединиц белка в составе димера.

Мы исследовали ингибирование циклооксигеназной активности PGHS по влиянию ингибитора на начальную скорость потребления растворенного молекулярного кислорода в результате циклооксигеназной реакции. С помощью этого метода в настоящей работе проведено исследование кинетики взаимодействия фермента PGHS-1 с ингибитором напроксеном в равновесных условиях. Показано, что конкурентный механизм ингибирования напроксеном не проявляется экспериментально, и при этом ни одна из известных схем ингибирования PGHS, в том числе применявшихся для описания взаимодействия PGHS и напроксена [29], не описывает экспериментальные данные. Учет димерной природы PGHS при описании связывания напроксена позволил адекватно описать получаемые экспериментальные данные. В то же время оказалось, что те же данные описываются без привлечения представлений о кооперативности, но в предположении о наличии в реакционной системе двух форм фермента, разли-

чающихся по чувствительности к ингибитору. Теоретический анализ и численные расчеты показали, что рассматриваемые в настоящей работе кооперативные взаимодействия в случае отрицательной кооперативности (как в состоянии равновесия, так и для кинетики ингибирования) могут быть с высокой точностью описаны как проявление простой неоднородности препарата фермента по сродству к ингибитору.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие реактивы: Tween-20, Tris, напроксен, ЭДТА, диэтилдитиокарбамат натрия («MP Biomedicals Inc.», Германия), арахидоновая кислота, ферроцианид калия, хлорид гемина, гидроксид натрия («Sigma-Aldrich», США), дитионит натрия («Panreac», Испания), хроматографический носитель DEAE Sepharose Fast Flow («Amersham Biosciences», Австрия), соляная кислота («Химмед», Россия). Остальные реактивы высокой степени чистоты были произведены в России.

Получение фермента. Препарат фермента PGHS-1 получали из везикулярных желез барана путем солиubilизации с использованием неионного детергента Tween-20 и очистки с помощью ионообменной хроматографии согласно [17] с незначительными изменениями [30]. Препарат фермента (чистота более 95% по результатам ПААГ-электрофореза) хранили в буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДЭДТК, 0,1% (по объему) Tween-20, 2 мкМ гемина) при $-70\text{ }^\circ\text{C}$ до использования.

Кинетические эксперименты. Во всех экспериментах по измерению циклооксигеназной активности фермента использовали буферный раствор А (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% (по объему) Tween-20), с добавлениями ферроцианида калия (1 мМ) и гемина (2 мкМ). Ферментативную реакцию проводили в закрытой термостатируемой стеклянной ячейке с постоянным перемешиванием при $25\text{ }^\circ\text{C}$. Объем реакционной смеси составлял 1,1–1,5 мл, объем добавляемого раствора фермента (с концентрацией белка 0,5 мг/мл) 10–40 мкл. Растворы арахидоновой кислоты (10–150 мМ) готовили в этиловом спирте; раствор ферроцианида калия (0,1 М) готовили в буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0); напроксен использовали в виде 100 мМ водного раствора натриевой соли, который добавляли перед экспериментом буферным раствором (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0) до удобной для работы концентрации; раствор гемина готовили по навеске (растворяли ее в небольшом количестве 0,1 М NaOH, затем разводили в 20 раз бу-

ферным раствором А). Для уточнения концентрации раствора гемина отбирали из него аликвоту, смешивали с 20%-ным пиридином в 0,1 М NaOH, добавляли дитионит натрия и измеряли концентрацию гемина спектрофотометрическим методом с использованием известных коэффициентов поглощения для восстановленного комплекса гемина с пиридином [31].

Эксперименты по взаимодействию ингибитора и фермента проводили согласно следующей схеме: в реакционную ячейку, содержащую буферный раствор А, ферроцианид калия и гемин в указанных выше концентрациях, последовательно добавляли ингибитор, фермент, а затем, через определенный промежуток времени после добавления фермента (время преинкубации t), в настоящем исследовании достаточный для установления равновесия в системе фермент-ингибитор (не менее 2 мин), инициировали ферментативную реакцию субстратом (арахионовой кислотой). В экспериментах, соответствующих нулевому времени преинкубации t , изменяли порядок добавления арахидоновой кислоты и фермента.

При построении кинетических зависимостей учитывали определенное в данной работе «мертвое время» измерительной системы в размере 1 с.

Измерение скорости ферментативной реакции. Скорость циклооксигеназной реакции определяли амперометрическим методом по поглощению кислорода в ходе реакции (арахионовая кислота + $2O_2 \rightarrow$ простагландин G_2). Измерения проводили с помощью амперометрической системы детекции кислорода на приборах Эксперт МТХ-001 («Эконикс эксперт», Россия) и Оху-Graph («Hansatech Instruments Limited», Великобритания), оснащенных закрытыми газодиффузионными платиновыми электродами Кларка [32] (рис. 1).

Относительная активность фермента. Каталитическую активность смеси препарата фермента, подвергшегося в течение времени t (время преинкубации) контакту с ингибитором, оценивали по скорости циклооксигеназного окисления добавленной в реакционную смесь арахидоновой кислоты (рис. 1). Для унификации результатов, полученных в разное время, и для удобства дальнейших расчетов и моделирования использовали понятие относительной активности фермента — значение нормированной скорости (V_{norm}), вычисляемое как отношение скорости ферментативной реакции к скорости реакции в тех же условиях, но в отсутствие ингибитора и, соответственно, при нулевом времени преинкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке, т.е.:

$$V_{norm}(I, t) = \frac{V(S, I, t)}{V(S, 0, 0)}, \quad (1)$$

где S и I — концентрации субстрата (арахионовой кислоты) и ингибитора соответственно. Следует отметить, что значения нормированной скорости оказались не зависящими от использованной концентрации субстрата (рис. 2), и являются функцией концентрации ингибитора I и времени преинкубации t (поэтому здесь и далее во всех формулах, содержащих V_{norm} , в качестве аргумента S не указана). Более подробно интерпретация значения нормированной скорости представлена в разделе «Результаты исследования».

Предельное значение относительной активности фермента $V_{norm}(I)$ определяли как предел $V_{norm}(I, t)$ (1) при $t \rightarrow \infty$ (для получения экспериментальных значений использовали не менее чем 2-минутную преинкубацию фермента и ингибитора в реакционной ячейке, так как этого времени достаточно для практического установления равновесия (рис. 2)):

$$V_{norm}(I) = \frac{V(S, I)}{V(S, 0)}, \quad (2)$$

где $V(S, I)$ соответствует предельному значению $V(S, I, t)$ при $t \rightarrow \infty$, $V(S, 0)$ соответствует $V(S, 0, 0)$.

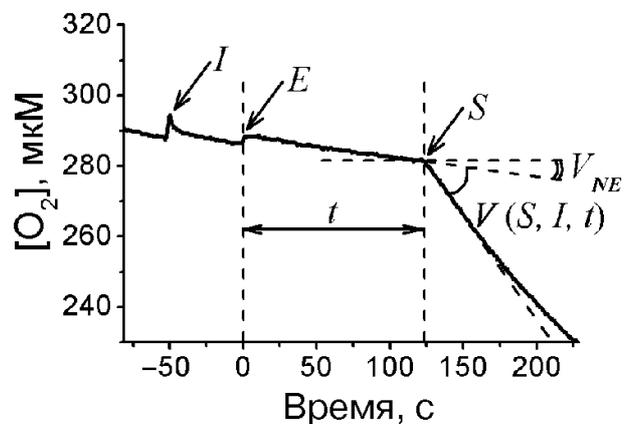


Рис. 1. Определение скорости ферментативной реакции из экспериментальной кривой поглощения растворенного молекулярного кислорода. За точку начала отсчета времени принят момент добавления фермента в реакционную среду. Значение скорости ферментативной реакции соответствует тангенсу угла наклона касательной к экспериментальной кривой, проведенной в момент инициации реакции (для расчетов использовали аппроксимацию начального участка (5–10 с) экспериментальной кривой за вычетом скорости неферментативной реакции). t — время преинкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке, I — ингибитор, E — фермент, S — субстрат, V_{NE} — скорость неферментативной реакции, $V(S, I, t)$ — скорость ферментативной реакции, стрелками отмечены моменты добавления соответствующих реагентов

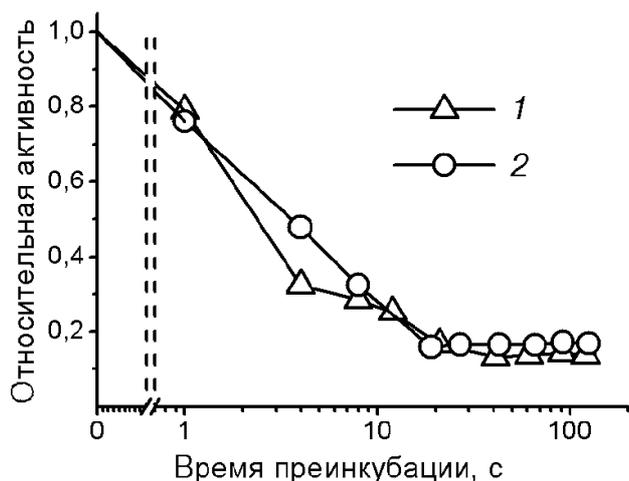


Рис. 2. Зависимость относительной активности (V_{norm}) от времени преинкубации (t) PGHS-1 с напроксеном для двух концентраций арахидоновой кислоты 5 и 100 мкМ (1 и 2 соответственно). Концентрация напроксена 2,5 мкМ

Математическая обработка экспериментальных данных. Анализ и графическое представление данных, полученных в ходе кинетических экспериментов, проводили с использованием пакета Origin 7.5. Совместную аппроксимацию всего массива данных на рис. 3, а проводили с помощью пакета MatLab.

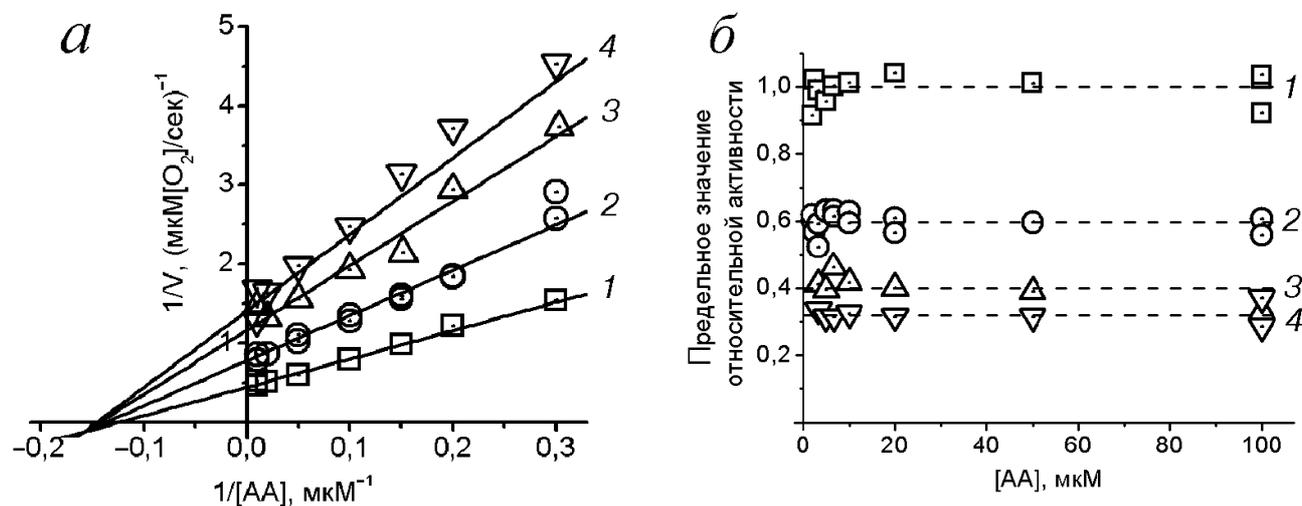


Рис. 3. Зависимость предельного значения скорости циклооксигеназной реакции (V) от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах (а) и предельного значения относительной активности (V_{norm}) (б) от концентрации арахидоновой кислоты для концентраций напроксена 0, 0,07, 0,15 и 0,2 мкМ (1–4 соответственно). Во всех экспериментах время преинкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке составляло 3 мин. Линии на рис. 3, а соответствуют аппроксимации экспериментальных данных методом нелинейной регрессии согласно уравнению для общего случая смешанного ингибирования (4). Штриховые линии на графике 3, б соответствуют средним значениям относительных активностей, полученных для одной концентрации напроксена. Относительную активность (см. раздел «Материалы и методы») определяли как отношение скорости ферментативной реакции к теоретической скорости реакции в тех же условиях, полученной при аппроксимации экспериментальной зависимости методом нелинейной регрессии согласно уравнению Михаэлиса–Ментен в отсутствие ингибитора

Множественные аппроксимации экспериментальных данных на рис. 4 осуществляли путем нахождения глобального минимума соответствующих сумм квадратов отклонений в пространстве искомых параметров. Для этого проводили перебор случайным образом сгенерированных наборов параметров с последовательным сужением объема пространства поиска. На заключительном этапе в узком диапазоне определяли экстремум с помощью функции *leastsq* пакета *optimize* библиотеки *scipy* [33] на языке программирования *Python*. Доверительные интервалы оценивали независимо для всех искомых параметров путем симуляций (более 50 000) с использованием 6% стандартных отклонений для V_{norm} . Дисперсия для всех параметров составила не более 15%.

При аппроксимации экспериментальных зависимостей скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты при различных концентрациях напроксена (рис. 3, а) определяли значения искомых величин при минимальном значении суммы квадратов отклонений скоростей (Sum):

$$Sum = \sum_j (V_j^{theor} - V_j^{exp})^2, \quad (3)$$

где V_j^{exp} – экспериментально определенное значение скорости циклооксигеназной реакции;

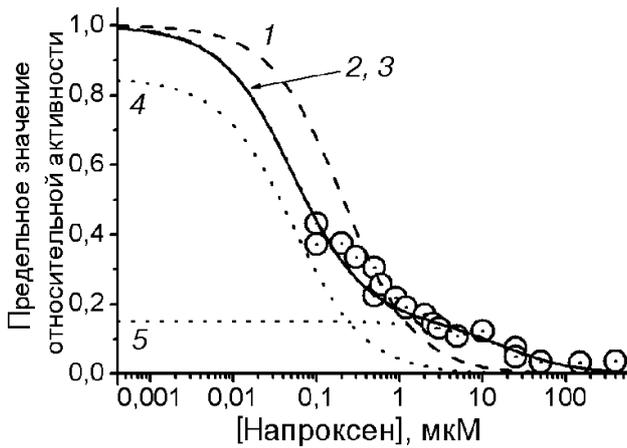


Рис. 4. Зависимость предельного значения относительной активности ($V_{norm}(I)$) от концентрации напроксена. Во всех экспериментах время преинкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке составляло 2 мин, концентрация арахидоновой кислоты 100 мкМ. Линии на графике соответствуют аппроксимации экспериментальных данных с использованием уравнения (8) – линия 1, уравнения (13) – линия 2, уравнения (18) – линия 3. Найденные в ходе аппроксимации значения параметров K , K_1 , K_2 , K_α , K_β , γ и χ приведены в таблице. Для наглядности на графике приведены точечные линии, построенные с использованием уравнения (18) для констант $K_\alpha = 0,05$ мкМ (линия 4), $K_\beta = 18,3$ мкМ (линия 5) и $\chi = 0,178$ отдельно для каждого слагаемого, входящего в это уравнение

V_j^{theor} – соответствующее теоретически рассчитанное значение скорости циклооксигеназной реакции, вычисляемое по формуле для общего случая смешанного ингибирования:

$$V = \frac{V_M \cdot S}{K_M \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_i^*}\right)}. \quad (4)$$

Численные значения констант, найденные в ходе аппроксимаций экспериментальных данных, представленных на рис. 4, с использованием уравнений (8), (13) и (18)

Простая модель (7)						
K , мкМ	–	–	Q	n	p	–
0,21	–	–	7,77	21	1	–
Кооперативная модель (9)						
K_1 , мкМ	K_2 , мкМ	γ	Q	n	p	F
0,10	9,2	0,307	1,38	21	3	41,67
Двухферментная модель (14)						
K_α , мкМ	K_β , мкМ	χ	Q	n	p	F
0,05	18,3	0,178	1,38	21	3	41,67

Суммирование происходит одновременно по всем результатам (j) всех серий экспериментов с различными значениями концентрации ингибитора.

При аппроксимации экспериментальной зависимости предельного значения относительной активности от концентрации напроксена (рис. 4) определяли значения искомых величин при минимальном значении суммы квадратов отклонений относительных величин (Q):

$$Q = \sum_j \frac{1}{(V_{norm_j}^{exp})^2} \cdot (V_{norm_j}^{theor} - V_{norm_j}^{exp})^2, \quad (5)$$

где $V_{norm_j}^{exp}$ – экспериментально определенное предельное значение относительной активности фермента; $V_{norm_j}^{theor}$ – соответствующее теоретически рассчитанное предельное значение относительной активности фермента, вычисляемое по формуле (8) при поиске параметров аппроксимации для простой модели (7) взаимодействия фермента и ингибитора, (13) – для кооперативной модели (9), и (18) – для двухферментной модели (14).

Поскольку для дискриминации рассматриваемых моделей ингибирования критичной является область высоких концентраций ингибитора и, соответственно, малых значений экспериментально определяемых величин (рис. 4), то при планировании соответствующих экспериментов путем использования различных концентраций фермента была обеспечена оптимальная относительная погрешность относительной активности фермента (~6%), что, в свою очередь, нашло отражение в алгоритме аппроксимации (5).

В работе также проводили дополнительную проверку соответствия предлагаемых моделей

экспериментальным данным по критерию Фишера. Для сравнения моделей использовали следующую формулу [34]:

$$F = \frac{(Q_1 - Q_2)(n - p_2)}{Q_2(p_2 - p_1)}, \quad (6)$$

где Q_1 и Q_2 — сумма квадратов отклонений для модели 1 и модели 2 соответственно, n — количество экспериментальных точек, p_1 и p_2 — количество параметров для модели 1 и 2 соответственно.

Полученное значение F сравнивали с критическими значениями F для $(f_1; f_2)$ степеней свободы (где $f_1 = p_2 - p_1; f_2 = n - p_2$) при уровнях значимости 0,05 и 0,01. Если значение F не превышало критическое, тогда принималась нулевая гипотеза (модель 2 не описывает экспериментальные данные принципиально лучше, чем модель 1). В противном случае нулевая гипотеза отвергалась.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные результаты. Кинетика взаимодействия PGHS-1 с напроксеном. Как видно из представленных результатов экспериментов по взаимодействию напроксена с PGHS-1 (рис. 2), экспериментально определяемая относительная активность фермента медленно снижается в процессе инкубации с ингибитором, что свидетельствует о наличии медленных процессов в механизме взаимодействия напроксена с ферментом. Эксперименты показали (рис. 2 и 3, б), что относительная активность PGHS-1 в присутствии напроксена не зависит от концентрации арахидоновой кислоты. Это говорит о том, что быстрые обратимые и конкурентные по отношению к арахидоновой кислоте стадии взаимодействия PGHS-1 с напроксеном отсутствуют.

Другими словами, применяемая в настоящей работе процедура определения относительной активности PGHS-1 не вносит изменения в систему фермент-ингибитор, в условиях определения активности субстрат не успевает вытеснить ингибитор из циклооксигеназных центров связывания (т.е. процесс измерения не вносит изменений в исследуемую систему). Таким образом, в нашей системе для «медленного» ингибитора напроксена значение относительной активности является функцией концентраций активных центров, не занятых ингибитором в момент добавления арахидоновой кислоты. Это обстоятельство было использовано при сопоставлении экспериментальных результатов и теоретических моделей.

Значения относительной активности в условиях экспериментов по преинкубации PGHS-1 с напроксеном не зависели также и от используемой в эксперименте концентрации фермента (данные не представлены).

Зависимость предельного значения скорости циклооксигеназной реакции и предельного значения относительной активности от арахидоновой кислоты для различных концентраций напроксена. Из рис. 3, а видно, что линии, соответствующие аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению для общего случая смешанного ингибирования (4), пересекаются практически на оси абсцисс. Можно сделать вывод, что в данных условиях наблюдается отсутствие конкурентности по отношению к субстрату при ингибировании PGHS напроксеном. Для определения вида зависимости скорости циклооксигеназной реакции от концентрации напроксена проводили эксперименты по ингибированию при постоянной концентрации субстрата (рис. 4).

На рис. 3, б представлена зависимость полученного из данных рис. 3, а предельного значения относительной активности (V_{norm}) от концентрации арахидоновой кислоты для различных концентраций напроксена. Показано, что V_{norm} практически не зависит от концентрации арахидоновой кислоты в диапазоне от 10 до 100 мкМ, что подтверждает данные рис. 2. Также на рис. 3, б добавлены штриховые прямые, параллельные оси абсцисс, ординаты которых представляют собой средние значения относительных активностей для соответствующих концентраций напроксена.

Зависимость предельного значения относительной активности PGHS-1 от концентрации напроксена. Предельное значение относительной активности представляет собой равновесную характеристику и соответствует относительной активности имеющихся активных форм фермента после установления равновесного состояния в системе фермент-ингибитор.

На рис. 4 представлена зависимость предельного значения относительной активности PGHS-1 от концентрации ингибитора в широком диапазоне при постоянной концентрации субстрата. Для большей наглядности и удобства анализа экспериментальные данные представлены в полулогарифмических координатах. Штрихованная линия на рисунке проведена на основании экспериментальных данных в соответствии с простой моделью (7) взаимодействия фермента и ингибитора (рис. 4, линия 1), сплошная линия соответствует кооперативной модели (9), учитывающей взаимодействие между циклооксигенажными активными центрами двух субъединиц в составе димера белка (рис. 4,

линия 2). Штрихпунктирная линия (практически совпавшая со сплошной линией 2) соответствует двухферментной модели (14), согласно которой результат взаимодействия PGHS-1 с напроксеном можно рассматривать, как проявление наличия двух форм фермента, одновременно присутствующих в реакционной смеси, и различающихся по значениям констант ингибирования (0,05 и 18,3 мкМ) (рис. 4, линия 3). Для наглядности, на графике точечными линиями отмечены условные кривые ингибирования, соответствующие взаимодействию напроксена с каждой из двух, введенных для формального соответствия эксперименту, «воображаемых» форм фермента по отдельности (рис. 4, линии 4 и 5).

Из рис. 4 видно, что простая модель (7) не описывает совокупность экспериментальных данных (рис. 4, линия 1). В то же самое время, экспериментальные данные одинаково хорошо описываются с использованием кооперативной (9) и двухферментной моделей (14) (рис. 4, линия 2 и 3 соответственно). Об этом также свидетельствуют большие значения сумм квадратов отклонений теоретически рассчитываемых значений от экспериментальных для простой модели в сравнении с таковыми значениями для кооперативной и двухферментной, и совпадение значений сумм квадратов отклонений в случае кооперативной и двухферментной моделей (таблица). Для полученных экспериментальных данных аппроксимации с использованием кооперативной и двухферментной моделей практически не различаются (линии 2 и 3 на рис. 4 практически совпадают во всем диапазоне значений I), и численные значения констант диссоциации подчиняются соотношению: $K_\alpha = K_1/2$, $K_\beta = 2K_2$ (см. раздел «Теоретические результаты»).

Теоретические результаты. Ниже рассмотрены три кинетические схемы взаимодействия фермента с ингибитором. Решение для всех схем приведено для состояния равновесия и в предположении, что концентрация ингибитора много больше концентрации фермента (т.е. изменением концентрации ингибитора при взаимодействии с ферментом можно пренебречь, $I = \text{const}$). Приведены выражения только для форм фермента, содержащих незанятые сайты связывания (потенциально активные формы фермента), выражения для полностью неактивных фермент-ингибиторных комплексов могут быть легко получены из уравнения материального баланса по ферменту. Во всех рассматриваемых случаях в качестве предельного значения относительной активности будем использовать величину $V_{norm}(I)$, определяемую в соответствии с уравнением (2).

Скорость реакции, катализируемой каждой из форм фермента, можно выразить как произведение концентрации этой формы и соответствующей наблюдаемой каталитической константы скорости, зависящей от концентрации субстрата ($k^{cat}(S)$). Поскольку $V_{norm}(I)$ не является функцией концентрации субстрата и времени (рис. 2 и 3, б), то с использованием решений для концентраций интермедиатов можно получить общие выражения для скорости ферментативной реакции в случае простой (7), кооперативной (9) и двухферментной (14) моделей, как линейную комбинацию концентраций интермедиатов, содержащих незанятые активные центры фермента.

Простейшая кинетическая схема взаимодействия фермента с ингибитором (простая модель). Простейшая кинетическая схема обратимого взаимодействия ингибитора (I) с активным центром мономера (E):

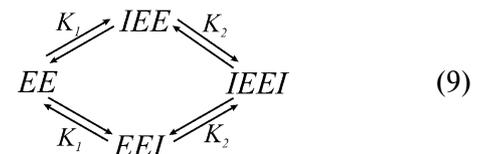


дает:

$$V_{norm}(I) = \frac{K}{K + I}, \quad (8)$$

где K – равновесная константа (константа диссоциации, константа ингибирования).

Кинетическая схема взаимодействия гомодимерного фермента с ингибитором с учетом кооперации активных центров (кооперативная модель). В настоящем разделе приведено равновесное решение для кинетической схемы обратимого взаимодействия ингибитора (I) с активными центрами гомодимерного фермента (EE) с учетом возможного кооперативного взаимодействия активных центров фермента (9). Это взаимодействие выражается в том, что кинетические константы, описывающие взаимодействие ингибитора со свободной формой фермента (EE), в общем виде отличаются от кинетических констант, описывающих взаимодействие ингибитора с димером фермента, один из активных центров которого занят ингибитором (EEI или IEE).



С учетом того, что IEE и EEI являются одним и тем же соединением (кроме того, в силу симметрии системы их концентрации равны

друг другу), обозначив сумму концентраций EEI и IEE через EEI^* , получим:

$$EE(I) = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot EE_0}{I^2 + 2 \cdot K_2 \cdot I + K_1 \cdot K_2}, \quad (10_1)$$

$$EEI^*(I) = \frac{2 \cdot K_2 \cdot I \cdot EE_0}{I^2 + 2 \cdot K_2 \cdot I + K_1 \cdot K_2}, \quad (10_2)$$

где K_1, K_2 – равновесные константы (константы диссоциации, константы ингибирования), EE_0 – общая концентрация димеров фермента.

Для скорости ферментативной реакции:

$$V(S, I) = 2 \cdot k_1^{cat}(S) \cdot EE(I) + k_2^{cat}(S) \cdot EEI^*(I), \quad (11)$$

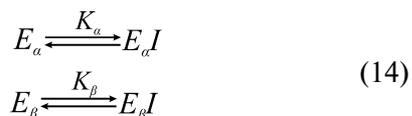
$$V(S, 0) = 2 \cdot k_1^{cat}(S) \cdot EE_0, \quad (12)$$

где $k_1^{cat}(S)$ и $k_2^{cat}(S)$ – наблюдаемые каталитические константы скорости ферментативной реакции для свободного мономера в комплексах EE и IEE (или EEI), соответственно. Коэффициент 2 в уравнениях (11) и (12) отражает то, что в составе полностью свободного димера фермента оба мономера проявляют каталитическую активность. Введем обозначение $\gamma = k_2^{cat}(S)/k_1^{cat}(S)$ – отношение активности свободного мономера в комплексе IEE (или EEI) к активности мономера в комплексе EE , тогда с учетом (2) и (10) – (12):

$$V_{norm}(I) = \frac{K_2 \cdot (K_1 + \gamma \cdot I)}{I^2 + 2 \cdot K_2 \cdot I + K_1 \cdot K_2}. \quad (13)$$

Стоит заметить, что результаты приведенных экспериментов (рис. 2 и 3, б) позволяют считать, что рассчитываемое в рамках кооперативной модели значение γ не зависит от S .

Кинетическая схема в случае одновременного взаимодействия двух форм фермента с ингибитором (двухферментная модель). В настоящем разделе приведено равновесное решение для случая, когда в реакционной среде присутствуют две формы фермента (E_α и E_β), каждая из которых независимо взаимодействует с ингибитором (I) согласно простейшей кинетической схеме обратимого взаимодействия ингибитора с активным центром (14). При этом равновесные константы ингибирования (K_α и K_β) для этих ферментов в общем случае различны. Из:



получим:

$$V(S, I) = k_\alpha^{cat}(S) \cdot E_\alpha(I) + k_\beta^{cat}(S) \cdot E_\beta(I) \quad (15)$$

$$V(S, 0) = k_\alpha^{cat}(S) \cdot E_{\alpha 0} + k_\beta^{cat}(S) \cdot E_{\beta 0}, \quad (16)$$

где $k_\alpha^{cat}(S)$ и $k_\beta^{cat}(S)$ – наблюдаемые каталитические константы скорости ферментативной реакции для E_α и E_β , соответственно. Введем:

$$\chi = \frac{k_\beta^{cat}(S) \cdot E_{\beta 0}}{k_\alpha^{cat}(S) \cdot E_{\alpha 0}}, \quad (17)$$

где χ – отношение активностей двух ферментов E_α и E_β . Стоит заметить, что результаты приведенных экспериментов (рис. 2 и 3, б) позволяют считать, что рассчитываемое в рамках двухферментной модели значение χ не зависит от S . Тогда с учетом (2) и (15) – (17):

$$V_{norm}(I) = \frac{1}{(1 + \chi)} \cdot \frac{K_\alpha}{K_\alpha + I} + \frac{\chi}{(1 + \chi)} \cdot \frac{K_\beta}{K_\beta + I}. \quad (18)$$

Аппроксимация экспериментальных данных и сравнение моделей. Уравнения (8), (13) и (18), соответствующие простой, кооперативной и двухферментной моделям, были использованы для аппроксимации экспериментальных зависимостей относительной активности от концентрации напроксена (рис. 4).

Найденные в ходе аппроксимации экспериментальных зависимостей значения констант для трех кинетических моделей представлены в сводной таблице.

Кроме констант $K, K_1, K_2, K_\alpha, K_\beta, \gamma$ и χ , приведены значения вычисляемых по формуле (5) (см. раздел «Методы исследования») сумм квадратов отклонений относительных величин (Q), количество экспериментальных точек (n) и параметров модели (p) для соответствующих аппроксимаций, и значения F , вычисляемые по формуле (6) (см. раздел «Методы исследования») при сравнении простой и кооперативной модели, а также простой и гетерогенной модели.

Если сравнить полученные значения F с критическими значениями F при уровне значимости 0,05 ($F = 3,55$) и при уровне значимости 0,01 ($F = 6,01$), то во всех случаях отвергается нулевая гипотеза, и подтверждается, что кооперативная/гетерогенная модели описывают взаимодействие фермента с напроксеном принципиально лучше, чем простая модель.

Взаимосвязь между кооперативной и двухферментной моделями. Легко убедиться (см. Приложение, в котором приведено строгое доказательство) в том, что выражение для предельного значения относительной активности фермента для кооперативной модели (13) при условии $K_1 \ll K_2$ с точностью до безразмерной величины K_1/K_2 принимает следующий вид:

$$V_{norm}(I) = \left(1 - \frac{\gamma}{2}\right) \cdot \frac{K_1/2}{K_1/2 + I} + \frac{\gamma}{2} \cdot \frac{2 \cdot K_2}{2 \cdot K_2 + I}. \quad (19)$$

Т.е. при условии $K_1 \ll K_2$ правые части (13) и (19) равны друг другу.

В свою очередь, выражение (19) совпадает с аналогичным выражением для двухферментной модели (18) при условии:

$$K_\alpha = K_1 / 2, \quad (20)$$

$$K_\beta = 2K_2, \quad (21)$$

$$\chi = \frac{\gamma}{2 - \gamma}. \quad (22)$$

Полученные в ходе аппроксимации экспериментальных данных значения величин (таблица) хорошо удовлетворяют соотношениям (20)–(22).

Последнее выражение (22) ярко демонстрирует ограниченный характер двухферментной модели по сравнению с кооперативной; двухферментная модель может быть применена только при условии $0 \leq \gamma < 2$, т.е. она неприменима, когда I является сильным активатором кооперативного фермента (занятие одного из двух активных центров гомодимера фермента приводит при $\gamma > 2$ к суммарному выигрышу в каталитической активности димера).

Более того, в случае отрицательной кооперативности при взаимодействии активных центров фермента ($K_1 \ll K_2$, (9)) двухферментная модель (14) также хорошо описывает и кинетику взаимодействия ингибитора для кооперативной модели (см. Приложение, в котором приведены соотношения между элементарными константами для обеих моделей).

Стоит также обратить внимание на случай $K_1 \gg K_2$. Нетрудно убедиться, что в этом случае концентрациями интермедиатов IEE и $E EI$ можно пренебречь во всем диапазоне концентраций I и выражение для $V_{norm}(I)$ будет иметь вид:

$$V_{norm}(I) = \frac{K_1 K_2}{K_1 K_2 + I^2}, \quad (23)$$

демонстрируя положительную кооперативность с коэффициентом Хилла, равным 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ингибиторы PGHS имеют важное фармакологическое значение. Установление циклооксигеназы в качестве мишени действия противовоспалительных нестероидных препаратов [4] было отмечено Нобелевской премией в 1982 г. С тех пор панель НПВП значительно расшири-

лась, разработаны селективные ингибиторы к PGHS-1 и PGHS-2 [5]. Несмотря на это, механизм ингибирования PGHS этими веществами до конца не определен.

Для описания действия НПВП на PGHS используют различные модели. При этом ингибиторы делят на быстрые и медленные, обратимые и необратимые [35]. Наряду с одностадийными [35] для описания механизма взаимодействия НПВП с PGHS применяют двухстадийные модели с быстрой равновесной конкурентной первой стадией и медленной необратимой [36–38] или медленной обратимой [39] второй стадией. В [40] предлагают использовать трехстадийную схему ингибирования. Применение различных методов определения активности фермента и различные условия проведения экспериментов приводят не только к большим различиям в количественных характеристиках свойств ингибиторов, получаемых различными исследователями [41], но и к противоречивой качественной классификации. Так, тот же напроксен относят как к медленным [29, 41], так и к быстрым [35] ингибиторам.

Приведенные в настоящей работе экспериментальные данные (рис. 2 и 3) показывают, что ингибирование напроксеном детектируемой по начальной скорости циклооксигеназной реакции PGHS-1 не носит конкурентного характера по отношению к арахидоновой кислоте. Это находится в кажущемся противоречии с представлениями о том, что напроксен образует комплекс именно с активным центром фермента [6, 7]. Приведенные в настоящей работе экспериментальные результаты свидетельствуют о медленном образовании комплексов фермент-напроксен, что и является причиной кажущихся неконкурентными взаимоотношений напроксена и арахидоновой кислоты (за времена определения начальной скорости циклооксигеназной реакции напроксен не успевает высвободиться из активного центра PGHS-1).

Как следует из данных, представленных на рис. 4, ингибирование PGHS-1 напроксеном не описывается простейшей моделью связывания (7). Для приведения экспериментальных данных в соответствии с кинетической моделью оказалось достаточным учесть димерный характер PGHS-1: как следует из рис. 4, кооперативная модель (9), предполагающая зависимость константы диссоциации комплекса напроксена с активным центром фермента от наличия напроксена в активном центре соседнего мономера (линия 2), хорошо описывает экспериментальные данные.

При этом заслуживает внимания принципиальная невозможность кинетически отличить

схему с различной прочностью связывания первой и второй молекулы ингибитора с димером PGHS-1 (9) и схему, предусматривающую наличие в препарате фермента смеси двух форм фермента с разным сродством к напроксену (14). Это хорошо иллюстрирует рис. 4, на котором линии 2 и 3 совпадают друг с другом.

В работах, касающихся описаний отрицательной кооперативности ферментов и рецепторов, обращали внимание на то, что отрицательная кооперативность трудно отличима от исходной гетерогенности центров связывания [42–46]. В настоящей работе показано, что используемая модель кооперативности (9) при условии $K_2 \gg K_1$ описывается схемой, предусматривающей наличие в препарате фермента смеси двух форм фермента с разным сродством к ингибитору (14), причем во всем диапазоне концентраций ингибитора, как в равновесном состоянии, так и для кинетики ингибирования. Получены необходимые соотношения кинетических и равновесных констант, приводящие к полной конвергенции этих двух моделей.

Таким образом, в нашем случае отрицательная кооперативность при взаимодействии гомодимера фермента с ингибитором ($K_1 = 0,1$ мкМ, $K_2 = 9,2$ мкМ) эквивалентна предположению, что препарат фермента, гетерогенный по сродству к ингибитору, и содержит 85% с $K_\alpha = 0,05$ мкМ и 15% с $K_\beta = 18,3$ мкМ (процентное содержание отражает каталитическую активность компонентов). Это позволяет описать представления [28] о том, что фермент является предсуществующим функциональным гетеродимером. Однако в случае PGHS такие представления не выглядят обоснованными, так как этот белок кодируется уникальной последовательностью ДНК [47], и гетерогенности по другим свойствам для этого фермента ранее не было отмечено. По нашему мнению, характер ингибирования PGHS-1 напроксеном в действительности отражает кооперативное взаимодействие активных центров в димерах фермента, однако в практической работе врачу или фармакологу представление о гетерогенности препарата гораздо проще и привычнее, чем привлечение представлений о кооперативных взаимодействиях. Поскольку обе модели в равной степени описывают наблюдаемые свойства ингибитора, применение двух-ферментной модели можно считать своеобразным «мнемоническим приемом».

Поскольку вопрос о полном совпадении кинетического поведения двух моделей (9 и 14) выходит за рамки рассмотрения ингибирования PGHS-1 напроксеном и носит общий характер, следует решить вопрос о принципиальной возможности дискриминации таких механизмов на

практике. Как сказано выше, при указанном соотношении констант диссоциации получаемые выражения численно совпадают друг с другом, поэтому повышение точности эксперимента и точности численных расчетов не приведет к успеху в этом деле. Для успешной дискриминации следует обратить внимание на то, что кооперативная модель предусматривает наличие исходно гомогенного препарата фермента, гетерогенность возникает уже на стадии взаимодействия с ингибитором. В отличие от нее двухферментная модель предполагает наличие исходно гетерогенного (по меньшей мере, по силе связывания ингибитора) препарата фермента.

Следует ожидать, что изначальная гетерогенность фермента не может не проявляться в других свойствах фермента (кинетика связывания субстрата или других ингибиторов, чувствительность к pH среды, температуре, ионной силе и пр.), возможно, проявляясь затем в соответствующих экспериментах. В частности, было показано, что взаимодействие PGHS-1 в аналогичных условиях с другими ингибиторами (индометацином и диклофенаком) описывается простым механизмом [48]. Можно предположить, что, если бы гетерогенность фермента имела место в действительности, она проявлялась бы при взаимодействии с разными ингибиторами, а не только с напроксеном. В то же время, есть основания считать, что проявление кооперативных взаимодействий может зависеть от природы связываемого лиганда [23–25]. Более того, любой неоднородный препарат принципиально может быть подвергнут разделению на однородные составляющие. Причем исходная предпосылка гетерогенности – существенное отличие в аффинности к ингибитору – может служить основой для разработки способа разделения такого препарата путем аффинной хроматографии с использованием в качестве активного компонента стационарной фазы того же ингибитора (или его аналога), химически связанного с хроматографическим носителем.

Для характеристики ингибиторов, демонстрирующих подобное поведение при взаимодействии с ферментом, недостаточно приводить часто используемую в литературе (в фармакологии) величину $[I]_{50}$. В работе [49] было предложено использование весьма наглядного понятия – степени кооперативности, фактически представляющей собой величину, равную отношению $[I]_{90}/[I]_{10}$. Данный подход не получил широкого распространения, однако, с нашей точки зрения, для характеристики ингибиторов может быть весьма удобным. Так, в нашем случае для ингибирования в пределах от 90% активности PGHS-1 до 10% необходимо увеличение

концентрации напроксена примерно в 1500 раз (рис. 4, линия 3), в то время как для такого же изменения в случае обычного ингибитора, действующего по простейшему механизму, необходимо увеличение концентрации ингибитора всего в 81 раз (рис. 4, линия 1).

Такое значение степени кооперативности говорит о том, что фармакологическое действие напроксена развивается в гораздо большем концентрационном диапазоне, чем для обычных ингибиторов. Этот факт позволяет назвать напроксен «мягким» ингибитором, развивающим ингибиторное действие в широком диапазоне концентраций и не оставляющим следов своей деятельности после удаления свободной формы

из организма вследствие полностью обратимого характера действия. Несомненно, такие свойства напроксена должны учитываться при его назначении для лечения.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-00737а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Авторы признательны О.А. Пономаревой за помощь в получении препарата фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Samuelsson, B., Goldyne, M., Granstrom, E., Hamberg, M., Hammarstrom, S., and Malmsten, C. (1978) Prostaglandins and thromboxanes, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 997–1029.
- Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 888–894.
- Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines, *J. Biol. Chem.*, **268**, 9049–9054.
- Vane, J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature*, **231**, 232–235.
- Smith, W.L., Meade, E.A., and DeWitt, D.L. (1994) Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **714**, 136–142.
- Picot, D., Loll, P.J., and Garavito, R.M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1, *Nature*, **367**, 243–249.
- Selinsky, B.S., Gupta, K., Sharkey, C.T., and Loll, P.J. (2001) Structural analysis of NSAID binding to prostaglandin H₂ synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations, *Biochemistry*, **40**, 5172–5180.
- Rome, L.H., and Lands, W.E. (1975) Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4863–4865.
- Prusakiewicz, J.J., Duggan, K.C., Rouzer, C.A., and Marnett, L.J. (2009) Differential sensitivity and mechanism of inhibition of COX-2 oxygenation of arachidonic acid and 2-arachidonoylglycerol by ibuprofen and mefenamic acid, *Biochemistry*, **48**, 7353–7355.
- Ku, E.C., and Wasvary, J.M. (1975) Inhibition of prostaglandin synthase by piroprofen: studies with sheep seminal vesicle enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 360–368.
- Ho, P.P., and Esterman, M.A. (1974) Fenoprofen: inhibitor of prostaglandin synthesis, *Prostaglandins*, **6**, 107–113.
- Carty, T.J., Stevens, J.S., Lombardino, J.G., Parry, M.J., and Randall, M.J. (1980) Piroxicam, a structurally novel anti-inflammatory compound. Mode of prostaglandin synthesis inhibition, *Prostaglandins*, **19**, 671–682.
- Ku, E.C., Wasvary, J.M., and Cash, W.D. (1975) Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 641–643.
- Smith, W.L., and Lands, W.E. (1972) Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular glands, *Biochemistry*, **11**, 3276–3285.
- Egan, R.W., Paxton, J.O., and Kuehl, F.A. (1976) Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7329–7335.
- Мевх А.Т., Вржеш П.В., Швядас В.Ю.-К., Варфоломеев С.Д., Мягкова Г.И., Якушева Л.А. (1981) Простагландинсинтетаза. Инактивация эндопероксидпростагландинсинтетазы – лимитирующего фермента синтеза простагландинов, *Биоорг. хим.*, **7**, 695–702.
- Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., and van Dorp, D.A. (1977) Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands, *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315–331.
- Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., and Samuelsson, B. (1974) Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 345–349.
- Wu, G., Vuletic, J.L., Kulmacz, R.J., Osawa, Y., and Tsai, A.L. (2001) Peroxidase self-inactivation in prostaglandin H synthase-1 pretreated with cyclooxygenase inhibitors or substituted with manganese protoporphyrin IX, *J. Biol. Chem.*, **276**, 19879–19888.
- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1973) Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 899–903.
- Helliwell, R.J., Adams, L.F., and Mitchell, M.D. (2004) Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **70**, 101–113.
- Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T., and Hayaishi, O. (1985) Enzymatic formation of prostaglandin F₂ alpha from prostaglandin H₂ and D₂. Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7035–7041.
- Kulmacz, R. J., and Lands, W. E. (1984) Prostaglandin H synthase. Stoichiometry of heme cofactor, *J. Biol. Chem.*, **259**, 6358–6363.
- Swinney, D.C., Mak, A.Y., Barnett, J., and Ramesha, C.S. (1997) Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid, *J. Biol. Chem.*, **272**, 12393–12398.

25. Yuan, C., Rieke, C.J., Rimon, G., Wingerd, B.A., and Smith, W.L. (2006) Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6142–6147.
26. Dong, L., Vecchio, A.J., Sharma, N.P., Jurban, B.J., Malkowski, M.G., and Smith, W.L. (2011) Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19035–19046.
27. Zou, H., Yuan, C., Dong, L., Sidhu, R.S., Hong, Y.H., Kuklev, D.V., and Smith, W.L. (2012) Human cyclooxygenase-1 activity and its responses to COX inhibitors are allosterically regulated by nonsubstrate fatty acids, *J. Lipid Res.*, **53**, 1336–1347.
28. Dong, L., Sharma, N.P., Jurban, B.J., and Smith, W.L. (2013) Pre-existent asymmetry in the human cyclooxygenase-2 sequence homodimer, *J. Biol. Chem.*, **288**, 28641–28655.
29. Duggan, K.C., Walters, M.J., Musee, J., Harp, J.M., Kiefer, J.R., Oates, J.A., and Marnett, L.J. (2010) Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen, *J. Biol. Chem.*, **285**, 34950–34959.
30. Vrzheschch, P.V., Tsaplina, L.A., and Sakharova, I.S. (2007) Kinetic models of cyclooxygenase and peroxidase inactivation of prostaglandin-H-synthase during catalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 828–834.
31. Falk, J.E. (1964) in *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Vol. 2, Elsevier Amsterdam, New York-London, p. 181.
32. Франк Г.М., Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Ротенберг Ю.С. (1973) *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Наука, Москва.
33. <https://docs.scipy.org/doc/scipy-0.18.1/reference/tutorial/optimize.html>
34. Izquierdo, C., Burguillo, F.J., and Bardsley, W.G. (1987) The non-Michaelian action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates, *Biochem. J.*, **243**, 329–334.
35. Gierse, J.K., Koboldt, C.M., Walker, M.C., Seibert, K., and Isakson, P.C. (1999) Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases, *Biochem. J.*, **339**, 607–614.
36. Rome, L.H., and Lands, W.E. (1975) Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4863–4865.
37. Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Numberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., and Trzaskos, J.M. (1994) Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11202–11206.
38. Ouellet, M., and Percival, M.D. (1995) Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms, *Biochem. J.*, **306**, 247–251.
39. Callan, O.H., So, O.Y., and Swinney, D.C. (1996) 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.*, **271**, 3548–3554.
40. Walker, M.C., Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., Moreland, K.T., Koboldt, C.M., Isakson, P.C., and Gierse, J.K. (2001) A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors, *Biochem. J.*, **357**, 709–718.
41. Ali, M., and McDonald, J.W.D. (1978) Reversible and irreversible inhibition of platelet cyclooxygenase and serotonin release by nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Thromb. Res.*, **13**, 1057–1065.
42. Giudicelli, Y., Agli, B., and Lacasa, D. (1979) Rat adipocyte beta-adrenergic receptors: evidence in favour of the heterogeneity of agonist-binding sites and against negatively cooperation interactions, *FEBS Lett.*, **104**, 431–436.
43. DeMeys, P., Bainco, A.R., and Roth, J. (1976) Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1877–1888.
44. Olsthoorn, A.J., Otsuki, T., and Duine, J.A. (1998) Negative cooperativity in the steady-state kinetics of sugar oxidation by soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Eur. J. Biochem.*, **255**, 255–261.
45. Gennis, L.S. (1976) Negative homotropic cooperativity and affinity heterogeneity: preparation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with maximal affinity homogeneity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3928–3932.
46. Macdonald, J.L., and Pike, L.J. (2008) Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 112–117.
47. DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1412–1416.
48. Бархатов В.И., Ефремов А.А., Кривошей А.В., Филимонов И.С., Вржеш П.В. (2016) Кинетический механизм ингибирования простагландин H синтазы нестероидными противовоспалительными препаратами, *Acta Naturae (русскаяязычная версия, Спецвыпуск)*, **2**, 43.
49. Taketa, K., and Pogell, B.M. (1965) Allosteric inhibition of rat liver fructose 1, 6-diphosphatase by adenosine 5-monophosphate, *J. Biol. Chem.*, **240**, 651–662.

**NEGATIVE COOPERATIVITY OF INTERACTION
OF PROSTAGLANDIN H SYNTHASE-1 WITH COMPETITIVE
INHIBITOR NAPROXEN CAN BE DESCRIBED
AS THE INTERACTION OF A NON-COMPETITIVE INHIBITOR
WITH A HETEROGENEOUS ENZYME PREPARATION**

**I. S. Filimonov¹, A. P. Berzova², V. I. Barkhatov¹,
A. V. Krivoshey¹, N. A. Trushkin¹, and P. V. Vrzhesch^{1,2*}**

¹ *Lomonosov Moscow State University, International
Biotechnological Center, 119991 Moscow, Russia*

² *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering
and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia; E-mail: biocentr@list.ru*

Received April 28, 2017

Revision received August 30, 2017

The kinetic mechanism of interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) with their main pharmacological target, prostaglandin H synthase (PGHS), has not yet been established. In the present work, we show that the inhibition of PGHS-1 from sheep vesicular glands by naproxen (a representative NSAID) shows non-competitive character in relation to arachidonic acid and cannot be described in the framework of commonly used kinetic schemes, but it can be described taking into account the availability of negative cooperativity of cyclooxygenase active sites of PGHS-1 homodimer when binding naproxen (the first molecule of naproxen forms a more stable complex ($K_1 = 0.1 \mu\text{M}$) than the second ($K_2 = 9.2 \mu\text{M}$)). The interaction of the enzyme with naproxen (well recognized as competitive) manifested itself as a noncompetitive interaction due to slow dissociation of the enzyme–inhibitor complexes. The experimental data could also be described in the framework of commonly used kinetic schemes, but with the assumption that there was a mixture of the two enzyme species with inhibition constants $K_\alpha = 0.05 \mu\text{M}$ and $K_\beta = 18.3 \mu\text{M}$. Theoretical analysis and numerical calculations showed that the phenomenon of kinetic convergence of the two models has general nature: when $K_2 \gg K_1$, the kinetic patterns (both for transient kinetics and in a state of equilibrium) generated by the cooperative model are described by a scheme providing the presence of two enzyme forms with inhibition constants $K_\alpha = K_1/2$, $K_\beta = 2 \cdot K_2$. When $K_2 \ll K_1$, the cooperative model manifests itself as the scheme with two inhibitor molecules simultaneously joining to the enzyme with the observed inhibition constant K ($K = K_1 \cdot K_2$). Use of the simple assumption of inhomogeneity of the enzyme preparation in relation to the affinity to the inhibitor instead of the assumption of negative cooperativity can serve as a convenient and easy way for practical description of such phenomena in enzymology, biotechnology, pharmacology, and other fields.

Keywords: PGHS-1, COX-1, cyclooxygenase, NSAIDs, inhibitors, naproxen, Aleve, kinetics, cooperativity, homodimer