

УДК 577.151.01

ИНГИБИРОВАНИЕ ЦИКЛООКСИГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ-1 ИЗБЫТКОМ СУБСТРАТА (МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА)

© 2010 г. Н.А. Трушкин, И.С. Филимонов, П.В. Вржеш*

Международный биотехнологический центр, факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва;
факс: (495)939-5022, электронная почта: peter@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 03.04.10

После доработки 17.06.10

Исследован характер зависимостей начальной скорости, предельного выхода продукта реакции и константы скорости инактивации фермента в процессе реакции для циклооксигеназной реакции фермента PGHS из везикулярных желез барана от концентрации кислорода в отсутствие и в присутствии донора электронов в реакционной среде. Показано, что циклооксигеназная реакция в отсутствие донора электронов в реакционной среде строго подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен в широком диапазоне (5–800 мкМ) концентраций кислорода. В присутствии донора электронов в среде обнаружен эффект ингибирования циклооксигеназной реакции избытком растворенного кислорода: максимальные значения начальной скорости и предельного выхода продукта реакции достигаются при концентрации кислорода в среде 50 мкМ, дальнейшее повышение которой до 500 мкМ приводит к снижению начальной скорости и предельного выхода продукта реакции в 2 раза. Константа скорости инактивации фермента в процессе реакции увеличивается с увеличением концентрации кислорода как в присутствии, так и в отсутствие донора электронов в среде.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: простагландин-Н-синтаза, циклооксигеназная активность, кинетический механизм, кислород, ингибирование субстратом, ферроцианид.

Существование аэробных организмов невозможно в отсутствие молекулярного кислорода, который участвует в разнообразных биохимических реакциях во всех органах и тканях. Его недостаток (гипоксия) или избыток (гипероксия) приводит к развитию патологических процессов. Тем не менее механизм участия молекулярного кислорода во многих ферментативных реакциях исследован недостаточно. Не является исключением и фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS, К.Ф.1.14.99.1), катализирующий циклооксигеназную реакцию с участием двух молекул кислорода. PGHS осуществляет первый этап биосинтеза всех простагландинов, а также тромбоксана A_2 и простациклина I_2 , катализируя превращение молекулы арахидоновой кислоты в простагландин H_2 .

Принятые сокращения: PGHS – простагландин-Н-синтаза, PGG_2 – простагландин G_2 , PGH_2 – простагландин H_2 , DH – восстановленная форма донора электронов, D – окисленная форма донора электронов, AA – арахидоновая кислота, ROOH – перекись, PP – протопорфирин IX, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота, ДЭДТК – диэтилдитиокарбамат.

* Адресат для корреспонденции.

PGHS – Бифункциональный фермент, катализирующий циклооксигеназное окисление арахидоновой кислоты двумя молекулами кислорода с образованием PGG_2 и пероксидазное восстановление перекисной группы PGG_2 в присутствии донора электронов DH с образованием PGH_2 [1]:



Обе реакции протекают на одной молекуле белка на двух близко расположенных активных центрах. Эти реакции гемзависимы и сопровождаются необратимой инактивацией фермента [2]. Кинетическая схема действия фермента, подверженного необратимой инактивации в процессе катализируемой реакции, в общем виде предложена и проанализирована в работе [3]. По отношению к кислороду имелись только оценки константы Михаэлиса K_m для циклооксигеназной реакции: 5 [4] и 10 мкМ [5].

В первом систематическом исследовании кинетики циклооксигеназной реакции PGHS по кислороду [6] концентрацию кислорода варь-

ровали от 5 до 270 мкМ (концентрация растворенного кислорода при атмосферном давлении воздуха при 25°). Было показано, что значение K_m по кислороду не является константной характеристикой фермента PGHS, а существенно зависит от концентрации арахидоновой кислоты и чувствительно к наличию донора электронов. Зависимости скорости циклооксигеназной реакции в двойных обратных координатах от концентрации кислорода в первом приближении были линейны, однако в присутствии донора электронов (L-адреналина) было отмечено небольшое (10%), но воспроизводимое снижение скорости циклооксигеназной реакции в области 50–270 мкМ растворенного кислорода. Отсутствие линейности в двойных обратных координатах было отмечено также в работе [7].

Для более детального изучения этого феномена в настоящей работе проведено исследование кинетики циклооксигеназной реакции PGHS в расширенном диапазоне концентраций кислорода (5–800 мкМ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были использованы: Tween 20, L-адреналин («MP Biomedicals Inc.», Германия), ферроцианид калия («Merck», Германия), Tris, арахидоновая кислота, хлорид гемина («Sigma Aldrich», США), а также реактивы высокой степени чистоты, произведенные в России. PGHS в виде солилиобилизованного препарата выделяли из микросом свежеполученных везикулярных желез барана описанным методом [8] с незначительными изменениями. Препарат фермента находился в буферном растворе, содержавшем Tris-HCl 50 мМ, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ДЭДТК, 1%-ный (по объему) Tween 20. Во всех кинетических экспериментах использовали стандартный буферный раствор (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1%-ный (по объему) Tween 20).

Ферментативную реакцию проводили в термостатируемой полярографической ячейке при 25°. Реакцию инициировали добавлением фермента. Раствор арахидоновой кислоты (150 мМ) готовили и добавляли в реакционную смесь в виде раствора в этиловом спирте; концентрация арахидоновой кислоты в ячейке во всех экспериментах составляла 100 мкМ. Раствор L-адреналина (0,1 М) готовили растворением навески адреналина в 0,1 М растворе соляной кислоты, раствор ферроцианида калия (0,1 М) и фенола (0,1 М) — в стандартном буферном растворе, раствор хлорида гемина — по навеске (растворяли ее в небольшом количестве 0,1 М NaOH, затем разводили в 20 раз стандартным буферным

раствором). Для определения концентрации аликвоту раствора гемина смешивали с 20%-ным пиридином в 0,1 М NaOH с добавлением дитионита натрия. Концентрацию гемина определяли спектрофотометрическим методом с использованием известных коэффициентов поглощения для восстановленного комплекса гемина с пиридином [9]. Концентрация экзогенного гемина во всех экспериментах в реакционной среде была 2 мкМ.

Поглощение растворенного кислорода в ходе циклооксигеназной реакции измеряли амперометрическим методом с использованием анализатора кислорода Экотест-120/АТС («Эконикс», Россия), снабженного газодиффузионным платиново-серебряным электродом Кларка [10]. Объем реакционной смеси составлял 3,3 мл, концентрация добавляемого раствора фермента — 4,5 мг/мл, итоговая концентрация фермента в ячейке — 10–20 нМ.

Для получения различных концентраций растворенного кислорода (5–800 мкМ) в реакционной среде растворенные в буферном растворе газы замещали аргон-кислородной смесью в заданном соотношении. Для этого 40 мл буферного раствора помещали в снабженную магнитной мешалкой круглодонную колбу объемом 100 мл, вакуумировали с помощью водоструйного насоса и создавали атмосферу аргона либо чистого кислорода. Цикл вакуумирование—заполнение газом повторяли несколько раз. Таким образом получали два раствора — с высокой (~1000 мкМ) и с низкой (~5 мкМ) концентрациями кислорода в зависимости от использования чистого кислорода или аргона соответственно. Все остальные концентрации кислорода получали путем смешения полученных растворов в соответствующих пропорциях.

Полученной смесью заполняли полярографическую ячейку, и проводили реакцию, как описано выше. Концентрацию кислорода в ячейке детектировали полярографическим методом с помощью электрода Кларка.

В ходе эксперимента получали интегральные кривые поглощения кислорода. Математическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета для обработки данных Origin 7.0 («Microcal Software», США). За точку отсчета ($t = 0$) принимался момент начала реакции. Учитывалась присутствующая при полярографическом методе исследования неферментативная реакция, которая была обусловлена поглощением кислорода электродом.

Исходные экспериментальные кривые поглощения кислорода получали в виде $G(t) = S_0 - S(t)$, где S_0 — исходная концентрация субстрата (кислорода), $S(t)$ — текущая. При условии мало-

го расходования субстратов ферментативной реакции $G(t)$ аппроксимировали согласно уравнению

$$G(t) = P_{\infty}(1 - e^{-\Lambda t}) + \mu t. \quad (3)$$

Функция (3) отражает вклад ферментативной реакции, сопровождающейся необратимой инактивацией фермента (первое слагаемое) [11], и неферментативной реакции, присутствующей и после полной инактивации фермента [12] (второе слагаемое, μt). Для каждой обработанной таким образом кривой определяли следующие параметры: $V_0 = P_{\infty}\Lambda$, где V_0 — начальная скорость ферментативной реакции, P_{∞} — предельный выход продукта реакции, Λ — константа скорости инактивации фермента в ходе реакции. Представленные на рисунках интегральные кривые — исходные экспериментальные кривые за вычетом функции вклада неферментативной реакции: $P(t) = G(t) - \mu t$.

При концентрации кислорода в среде < 50 мкМ описанный метод определения характеристик реакции некорректен в силу значительного расходования субстрата. Для этой области концентраций кислорода предельный выход продукта реакции и константа инактивации определены не были, а начальная скорость была вычислена как тангенс угла наклона касательной к кривой $G(t)$ в точке начала реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние донора электронов на кинетику циклооксигеназной реакции. На рис. 1 представлены типичные интегральные кривые поглощения кислорода ферментом PGHS в присутствии и в отсутствие донора электронов. При условиях малого расходования субстратов кривые хорошо аппроксимируются уравнением (3). Во всех экспериментах наличие в среде реакции донора электронов приводило к повышению V_0 и P_{∞} и в малой степени влияло на Λ . Для кривой в присутствии и в отсутствие донора электронов $V_0 = 0,41$ и $0,25$ мкМ O_2/c , $P_{\infty} = 18,6$ и $7,8$ мкМ O_2 , $\Lambda = 0,032$ и $0,022$ с $^{-1}$ соответственно. Концентрация кислорода на момент начала реакции составляла 270 мкМ.

Влияние концентрации кислорода в среде на кинетику циклооксигеназной реакции. В отсутствие донора электронов предельный выход продукта реакции практически не изменяется при варьировании концентрации кислорода в среде от 50 до 800 мкМ, в то время как начальная скорость реакции и константа скорости инактивации фермента в процессе реакции изменяют-

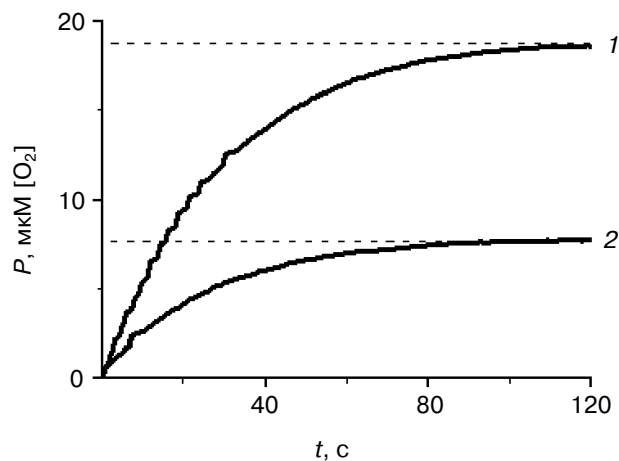


Рис. 1. Интегральные кривые поглощения кислорода ферментом PGHS в присутствии (1) и в отсутствие (2) донора электронов. Условия: [PGHS] = 10 нМ, $[O_2] = 270$ мкМ. 1 и 2 — [ферроцианид] = 1000 и 0 мкМ соответственно

ся существенно (типичные кривые представлены на рис. 2).

В присутствии донора электронов зависимость формы интегральной кривой от концентрации кислорода принципиально иная (рис. 3). При повышении концентрации кислорода в среде от 50 до 800 мкМ начальная скорость циклооксигеназной реакции уменьшается более чем в 2 раза, предельный выход продукта также уменьшается.

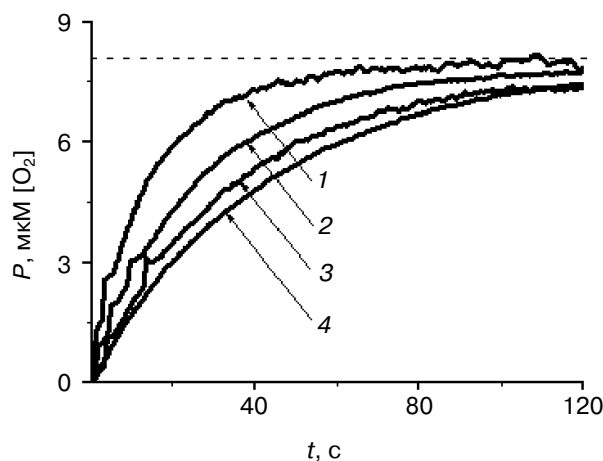


Рис. 2. Интегральные кривые поглощения кислорода ферментом PGHS в отсутствие донора электронов при разных концентрациях кислорода в реакционной среде. Условия: [PGHS] = 10 нМ, [ферроцианид] = 0 мкМ. 1–4 — $[O_2] = 610$, 270, 150 и 50 мкМ соответственно

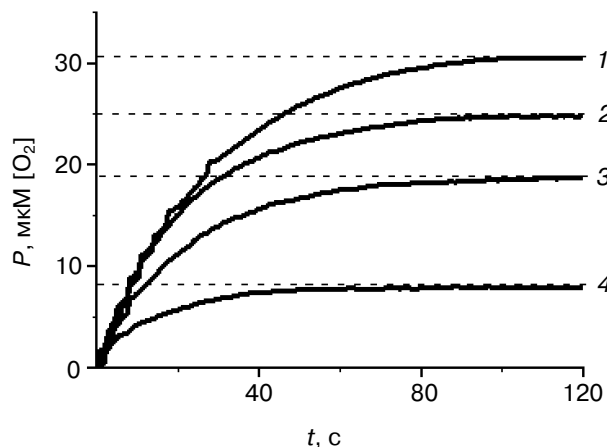


Рис. 3. Примеры интегральных кривых поглощения кислорода ферментом PGHS в присутствии донора электронов при разных концентрациях кислорода в реакционной среде. Условия: $[PGHS] = 10$ нМ, $[ферроцианид] = 1000$ мкМ. 1–4 – $[O_2] = 70, 200, 270$ и 850 мкМ соответственно

Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода. На рис. 4 представлена такая зависимость. В отсутствие донора электронов в реакционной среде зависимость начальной скорости от концентрации кислоро-

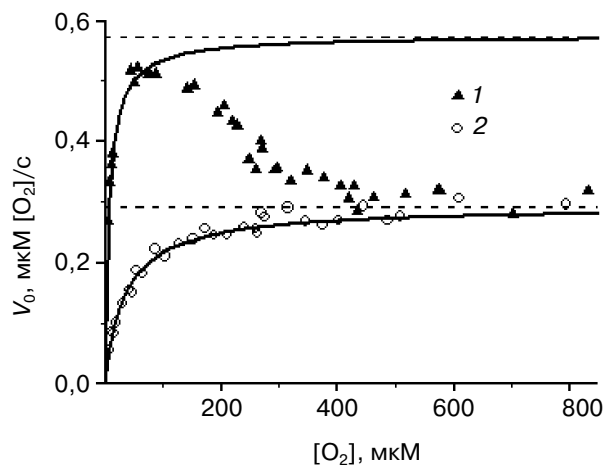


Рис. 4. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода в реакционной среде в присутствии донора электронов (1) и в отсутствие донора электронов (2) в растворе. Сплошные кривые – теоретические зависимости в соответствии с уравнением Михаэлиса–Ментен. Штриховые линии – максимальные скорости для полученных теоретических зависимостей. Условия: $[PGHS] = 10$ нМ, $[ферроцианид] = 1000$ (1) или 0 мкМ (2)

да строго гиперболическая и линейаризуется в двойных обратных координатах (рис. 5), т.е. может быть описана уравнением Михаэлиса–Ментен. Теоретическая зависимость соответствует сплошной кривой 2 на рис. 4. Из этой теоретической зависимости было определено значение константы Михаэлиса по кислороду, $K_m = 35$ мкМ.

Присутствие донора электронов в реакционной среде принципиально меняет исследуемую зависимость (рис. 4). Зависимость начальной скорости от концентрации кислорода в этом случае не линейаризуется в двойных обратных координатах (рис. 6). Максимальная начальная скорость наблюдается при концентрациях кислорода $50–100$ мкМ. При концентрациях $1–50$ мкМ зависимость начальной скорости от концентрации кислорода может быть описана уравнением Михаэлиса–Ментен, теоретическая зависимость, полученная из экспериментальных данных в этом диапазоне, соответствует кривой 1 на рис. 4. Константа Михаэлиса по кислороду для этой зависимости равна 9 мкМ.

При концентрациях кислорода $50–800$ мкМ в присутствии донора электронов наблюдается снижение начальной скорости (примерно в 2 раза в диапазоне $50–500$ мкМ). Начальная скорость снижается. Далее, до 800 мкМ, наблюдается плато. Необходимо отметить, что при концент-

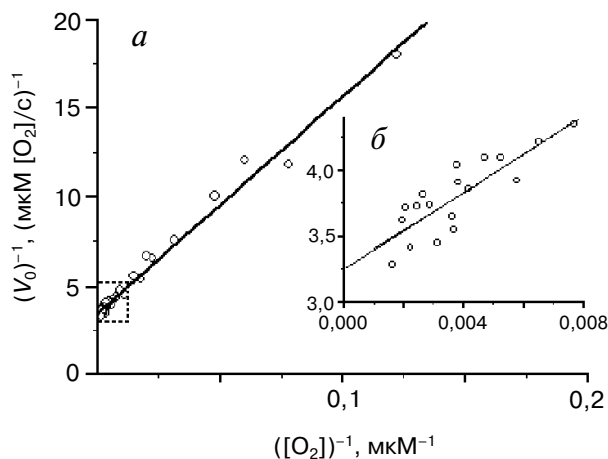


Рис. 5. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода в реакционной среде в отсутствие донора электронов в растворе в двойных обратных координатах. На вставке (б) увеличен участок, ограниченный рамкой на графике (а). Сплошные линии – линейная аппроксимация полученных зависимостей. Условия: $[PGHS] = 10$ нМ, $[ферроцианид] = 0$ мкМ

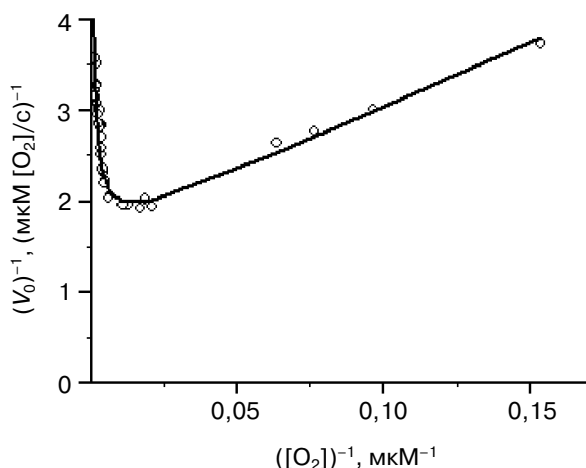


Рис. 6. Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода в реакционной среде в присутствии донора электронов (ферроцианид) в двойных обратных координатах. Кривая — аппроксимация полученной зависимости. Условия: [PGHS] = 10 нМ, [ферроцианид] = 1000 мкМ

рациях кислорода 500–800 мкМ начальные скорости циклооксигеназной реакции в присутствии донора электронов и в отсутствие последнего численно близки. Другими словами, обусловленное наличием в реакционной среде донора электронов увеличение начальной скорости циклооксигеназной реакции полностью устра-

няется при повышении концентрации кислорода в среде от 50 до 800 мкМ.

При использовании в качестве донора электронов L-адреналина или фенола были получены аналогичные результаты (данные не приведены).

Зависимость предельного выхода продукта циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода. Такая зависимость представлена на рис. 7. В отсутствие донора электронов в среде предельный выход продукта практически не зависит от концентрации кислорода в среде. Наблюдается небольшой линейный рост P_{∞} при концентрациях кислорода 50–800 мкМ. В присутствии донора электронов в среде зависимость нелинейная, предельный выход продукта снижается более чем в 2 раза при 50–800 мкМ. При 0–50 мкМ зависимость не определена (см. разд. «Методы исследования»).

Зависимость константы скорости инактивации фермента PGHS в процессе циклооксигеназной реакции от концентрации растворенного кислорода. Эта константа (далее константа инактивации) возрастает при повышении концентрации кислорода от 50 до 800 мкМ как в присутствии, так и в отсутствие донора электронов (рис. 8). Константа инактивации в присутствии донора электронов меньше таковой в отсутствие донора электронов во всем исследуемом диапазоне концентраций кислорода (50–800 мкМ). При 0–50 мкМ зависимость не определена (см. разд. «Методы исследования»).

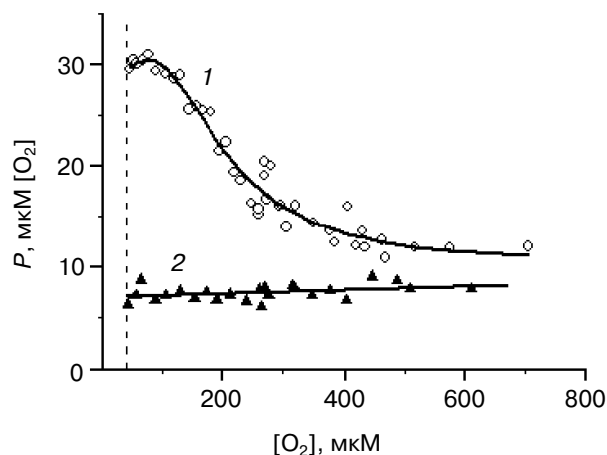


Рис. 7. Зависимость предельного выхода продукта циклооксигеназной реакции фермента PGHS от концентрации растворенного кислорода в реакционной среде в присутствии (1) и в отсутствие донора электронов (2) в растворе. Сплошные линии — аппроксимация экспериментальных данных, штриховая — правая граница области некорректного определения параметра. Условия: [PGHS] = 10 нМ, 1 и 2 — [ферроцианид] = 1000 и 0 мкМ соответственно

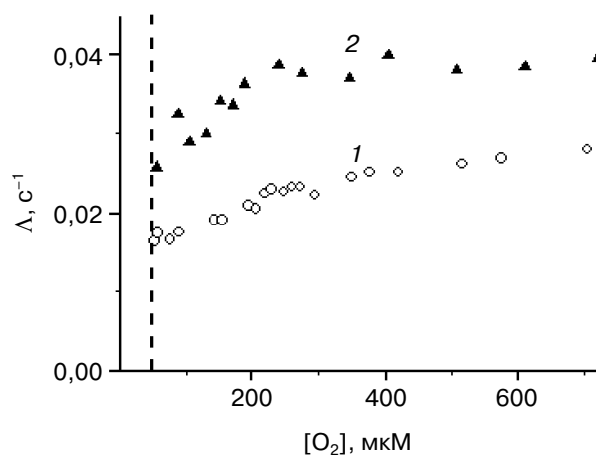


Рис. 8. Зависимость константы скорости инактивации фермента PGHS в процессе циклооксигеназной реакции от концентрации растворенного кислорода в реакционной среде в присутствии (1) и в отсутствие донора электронов (2). Штриховая линия — правая граница области некорректного определения параметра. Условия: [PGHS] = 10 нМ, 1 и 2 — [ферроцианид] = 1000 и 0 мкМ соответственно

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Донор электронов необходим для протекания пероксидазной реакции фермента PGHS. Измеряемая при обычной концентрации кислорода (270 мкМ) скорость циклооксигеназной реакции фермента PGHS существенно зависит от наличия в среде донора электронов [13, 14], которое приводит к увеличению скорости циклооксигеназной реакции и предельного выхода продукта. Показано, что при увеличении концентрации кислорода в среде от 50 до 800 мкМ обусловленное наличием в реакционной среде донора электронов увеличение начальной скорости и предельного выхода продукта циклооксигеназной реакции элиминируется.

Эффект увеличения циклооксигеназной активности бифункционального фермента PGHS в присутствии субстрата пероксидазной реакции (донора электронов), а также элиминирование этого эффекта при повышении концентрации кислорода можно объяснить с помощью схемы [15]. На ней приведены состояния гемовой группы PGHS в ходе пероксидазной реакции, а также постулируемый в данной работе комплекс восстановленной формы гемовой группы с молекулярным кислородом ($PP\ Fe^{III} \cdot O_2$).

В отсутствие в среде донора электронов и при наличии продукта циклооксигеназной реакции простагландина G_2 гем пребывает в окисленном состоянии ($PP^+ Fe^{IV}O$). Логично предположить, что циклооксигеназная активность PGHS в отсутствие донора электронов обусловлена свойствами этой формы. Появление в среде донора электронов приводит к тому, что стационарная концентрация формы $PP\ Fe^{III}$ возрастает. Мы с этим явлением связываем рост скорости циклооксигеназной реакции при увеличении концентрации донора электронов, т.е. форма фермента $PP\ Fe^{III}$ обладает большей по отношению к формам $PP^+ Fe^{IV}O$ и $PP\ Fe^{IV}O$ каталитической циклооксигеназной активностью.

Мы предполагаем, что кислород может обратимо связываться с гемом, когда последний находится в восстановленном состоянии, как и происходит в некоторых белках-переносчиках кислорода (гемоглобин, миоглобин и др.). На схеме результат такого процесса представлен

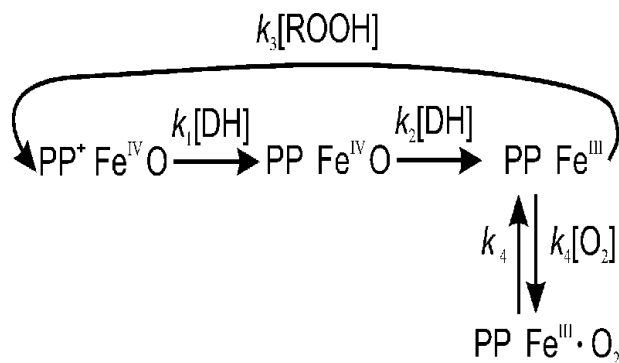


Схема пероксидазной реакции фермента PGHS. Стадия $PP\ Fe^{III} \cdot O_2$ отвечает предполагаемому влиянию растворенного кислорода на гемовую группу пероксидазного активного центра

формой $PP\ Fe^{III} \cdot O_2$. Повышение концентрации кислорода в среде уменьшает стационарную концентрацию формы $PP\ Fe^{III}$ и увеличивает концентрацию формы $PP\ Fe^{III} \cdot O_2$. Последняя должна обладать меньшей каталитической активностью по циклооксигеназной реакции по сравнению с формой $PP\ Fe^{III}$ и, по-видимому, сравнимой с активностью форм $PP^+ Fe^{IV}O$ и $PP\ Fe^{IV}O$.

Таким образом, обусловленное наличием в реакционной среде донора электронов увеличение начальной скорости циклооксигеназной реакции исчезает при повышении концентрации кислорода.

Эта схема также объясняет отсутствие эффекта ингибирования при увеличении концентрации кислорода без донора электронов в среде: в отсутствие донора электронов гем всегда находится в окисленном состоянии независимо от концентрации кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-01511а) и Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 02.740.11.0291 от 7.07.2009 в рамках программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», мероприятие 1.1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629–2636.
2. Smith, W.L., and Marnett, L.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1083**, 1–17.
3. Вржеш П.В., Варфоломеев С.Д. (1985) *Биохимия*, **50**, 139–147.
4. Lands, W.E.M., Sauter, J., and Stone, G.W. (1978) *Prostaglandins and Medicine*, **1**, 117–120.

5. Juranek, I., Suzuki, H., and Yamamoto, S. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1436**, 509–518.
6. Филимонов И.С., Вржеш П.В. (2007) *Биохимия*, **72**, 1161–1171.
7. Вржеш П.В. (1996) *Биохимия*, **61**, 2069–2083.
8. Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., and van Dorp, D.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315–331.
9. Falk, J.E. (1964) in *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, N.Y., p. 181.
10. Франк Г.М., Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Ротенберг Ю.С. (1973) *Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом*, Наука, Москва.
11. Мевх А.Т., Вржеш П.В., Швядас В.Ю.-К., Варфоломеев С.Д., Мягкова Г.И., Якушева Л.А. (1981) *Биоорганическая химия*, **7**, 695–702.
12. Kulmacz, R.J., Marshall, P.J., and Lands, W.E. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 3510–3517.
13. Цаплина Л.А., Каратасо Ю.О., Филимонов И.С., Вржеш П.В. (2006) *Биохимия*, **71**, 1534–1543.
14. Hsuanyu, Y., and Dunford, H.B. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17649–17657.
15. Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.* **171**, 321–328.

CYCLOOXYGENASE REACTION OF PROSTAGLANDIN H SYNTHASE: INHIBITION BY ITS SUBSTRATE (MOLECULAR OXYGEN) SURPLUS

N. A. Trushkin, I. S. Filimonov, P. V. Vrzheschch*

*International Biotechnological Center, Department of Bioengineering
and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University,
Moscow 119991, Russia; fax: (495)939-5022;
E-mail: peter@genebee.msu.ru*

Received April 3, 2010
Revision received June 17, 2010

The enzyme prostaglandin H synthase (PGHS) catalyzes the conversion of an arachidonic acid molecule into prostaglandin H₂. The investigated PGHS was isolate from ram vesicular glands. Dependences of PGHS cyclooxygenase reaction initial rate, total product yield of cyclooxygenase reaction, and inactivation rate constant in the course of the cyclooxygenase reaction on the oxygen concentration in the absence and presence of electron donor was investigated. It is shown that the cyclooxygenase reaction in absence of the electron donor strictly follows Michaelis–Menten kinetics over a wide range (5–800 μM) oxygen concentration. In the presence of electron donor, the effect of cyclooxygenase reaction inhibition by surplus dissolved oxygen is found: the maximum values of initial rate and total product yield of reaction are reached at oxygen concentration 50 μM , and further increase to 500 μM leads to decrease in initial rate and total product yield of the reaction by twofold. The inactivation rate constant in the course of the cyclooxygenase reaction increases with increase in oxygen concentration both in the presence of the electron donor and in its absence. Explanations of the observed effects are discussed.

Key words: prostaglandin H synthase, cyclooxygenase activity, kinetic mechanism, oxygen, substrate inhibition, hexacyanoferrate(II)