



УДК 577.152.114*991 : 577.125.33

© 1993 Х. Шеве, Ю. Ю. Белослудцев*,
П. М. Демин*, Х.-Г. Хольцхюттер, Т. Шеве,
Г. И. Мягова*, Р. П. Евстигнеева*

ИНАКТИВАЦИЯ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ ИЗ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ ЖЕЛЕЗ БАРАНА АЦЕТИЛЕНОВЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

Институт биохимии Университета им. Гумбольдта, Берлин;

** Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Ацетиленовые жирные кислоты — 8,11,14-эйкозатрииновою, 5,8,11,14-эйкозатетраиновою и 5,8,11,14,17-эйкозапентаиновою — сравнивали по их действию на простагландин-Н-синтазу. Все кислоты вызывали развивающуюся во времени инактивацию фермента. Эйкозатрииновая и эйкозатетраиновая кислоты проявили сравнимое ингибирующее действие, эйкозапентаиновая кислота оказалась более слабым ингибитором. Экспериментальные кинетические кривые были описаны в рамках модели, предполагающей фермент-катализируемое превращение соединений альтернативными суицидным и несуйцидным путями. Инактивация ацетиленовыми кислотами простагландин-Н-синтазы по своим характеристикам отличается от соответствующих характеристик инактивации липоксигеназ.

Ацетиленовый аналог арахидоновой кислоты, 5,8,11,14-эйкозатетраиновая кислота (ЕТУА), — сильный инактиватор как различных липоксигеназ (КФ 1.13.11.12) [1—3], так и простагландин-Н-синтазы (КФ 1.14.99.1) [1, 2]. Механизм действия ЕТУА на липоксигеназу-1 соевых бобов изучен Кюном и соавт. [3]. Было показано, что ЕТУА является суицидным субстратом для липоксигеназы и медленно превращается под действием фермента в присутствии кислорода в более полярные продукты. Потеря ферментативной активности при этом обусловлена, по-видимому, окислительной модификацией белка при реакции с субстратом, а не ковалентным связыванием с активным центром фермента алленового интермедиата, образующегося из ацетиленовой жирной кислоты [3]. Данные, касающиеся механизма инактивации простагландин-Н-синтазы ацетиленовыми жирными кислотами, отсутствуют. Зависимость активности от структуры соединения подтверждает предположение, что и в этом случае ацетиленовые жирные кислоты действуют как суицидные субстраты при медленной ферментативной реакции, аналогичной липоксигеназной. Метиленовая группа при С-13, находящаяся между двумя ацетиленовыми группировками, по-видимому, необходима для инактивации простагландин-Н-синтазы [2]. В представленной работе изучена кинетика инактивации простагландин-Н-синтазы из везикулярных желез барана ацетиленовыми жирными кислотами.

Инактивация простагландин-Н-синтазы ЕТУА в различных концентрациях зависит от времени (рис. 1) и достигает максимума уже через 5—10 мин

* Сокращения: ЕТУА — 5,8,11,14-эйкозатетраиновая кислота.

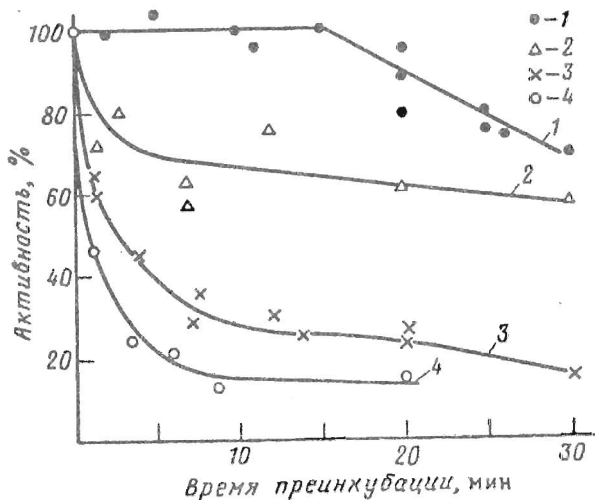


Рис. 1. Инактивация простагландин-Н-синтазы ЕТУА. Концентрации ингибитора (мкМ): 0 (1), 0,2 (2), 2 (3) и 20 (4)

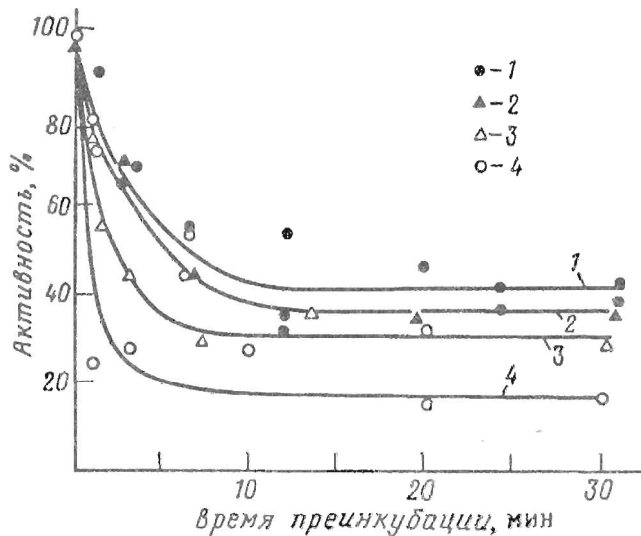


Рис. 2. Инактивация простагландин-Н-синтазы 8,11,14-эйкозатриеновой кислотой. Концентрации ингибитора (мкМ): 1 (1), 2 (2), 5 (3) и 20 (4)

преинкубации с ингибитором. Однако даже в присутствии 20 мкМ ЕТУА сохраняется заметная остаточная активность. При преинкубации свыше 10 мин наблюдается потеря активности у контрольных образцов (кривая 1), в то время как никакой дальнейшей потери активности, вызываемой ЕТУА, не происходит (кривые 2—4). Относительно высокая степень ингибирования ЕТУА наблюдается уже после преинкубации в течение 1—2 мин, что наводит на мысль о мгновенном ингибировании. Эта возможность, однако, была исключена при проведении эксперимента с 1 мкМ ЕТУА без преинкубации: ферментативная реакция была инициирована смесью арахидоновой кислоты и ЕТУА, и никакого уменьшения начальной скорости при этих условиях не наблюдалось. Мгновенное ингибирование происходит при использовании 20 мкМ ЕТУА, по-видимому, как результат

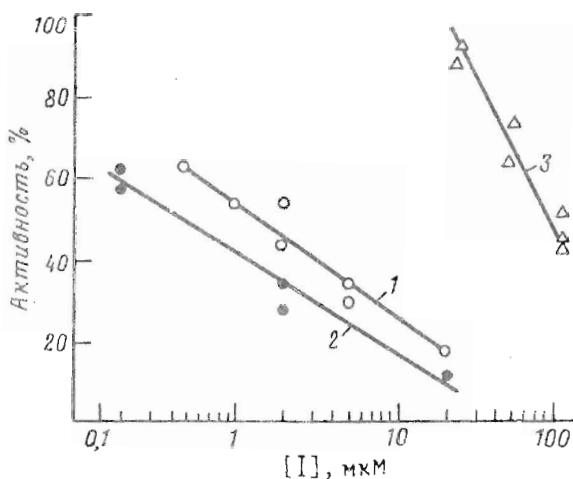


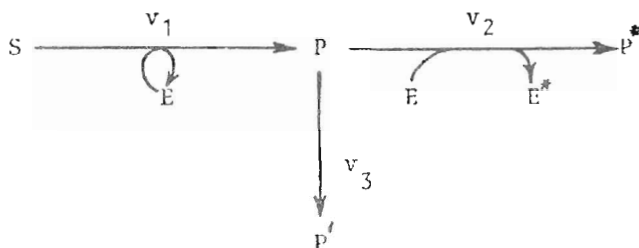
Рис. 3. Дозозависимые кривые инактивации простагландин-Н-синтазы 8,11,14-эйкозатрииново́й кислотой (1, $IC_{50} = 1,3$ мкМ), 5,8,11,14-эйкозатетраиново́й кислотой (2, $IC_{50} = 0,5$ мкМ) и 5,8,11,14,17-эйкозапентаиново́й кислотой (3, $IC_{50} = 85$ мкМ). IC_{50} — концентрация половинной инактивации. Значения относятся к периоду преинкубации 10 мин при 25° С

конкурентного обратимого ингибирования. Можно упомянуть, что различные ненасыщенные жирные кислоты, не являющиеся субстратами для простагландин-Н-синтазы, выступают в роли конкурентных ингибиторов этого фермента со значениями K_i от 6 (11,14,17-эйкозатрисеновая кислота) до 22 мкМ (олеиновая кислота) [4]. Следует, однако, отметить, что такие эксперименты должны проводиться со свежеприготовленными растворами ацетиленовых жирных кислот; после хранения растворов в течение нескольких часов в аэробных условиях наблюдается значительно более сильное ингибирование, не зависящее от времени, что может объясняться действием продуктов автоокисления. Автоокисление удастся предотвратить добавлением к растворам ацетиленовых кислот 1 моль % антиоксиданта — 2,6-ди-*трет*-бутилгидрокситолуола.

Инактивация простагландин-Н-синтазы 8,11,14-эйкозатрииново́й кислотой (рис. 2), как и инактивация ЕТУА, происходит с сохранением некоторой остаточной активности фермента, величина которой зависит от начальной концентрации ингибитора. Этим наблюдаемая временная зависимость инактивации простагландин-Н-синтазы принципиально отличается от такой же характеристики липоксигеназы, для которой характерна полная инактивация ацетиленовыми жирными кислотами [3].

Зависимости активности простагландин-Н-синтазы от концентрации трех ингибиторов показывают (рис. 3), что эйкозапентаино́вая кислота — значительно более слабый ингибитор, чем две другие ацетиленовые жирные кислоты. Это наблюдение согласуется с тем фактом, что соответствующая эйкозапентаиново́й кислоте 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-эйкозапентаено́вая кислота — плохой субстрат для простагландин-Н-синтазы [4], и подтверждает, что ацетиленовые жирные кислоты действуют как квазисубстраты простагландин-Н-синтазы, приводя, как и в случае с липоксигеназами, к суицидной инактивации фермента. Следует отметить, что концентрация полунгибирования ЕТУА (0,5 мкМ) заметно выше, чем соответствующие величины для наиболее важных нестероидных противовоспалительных препаратов при сравнимых экспериментальных условиях. Например, IC_{50} для диклофенака и индометацина — 0,04 и 0,1 мкМ соответственно [5].

Количественный анализ кинетики инактивации основан на следующей разветвленной схеме реакции:



Здесь предполагается, что субстрат S (ацетиленовая жирная кислота) превращается в продукт P, который может реагировать с природным ферментом E с образованием неактивного фермента E^* или превращаться в другие несущицидные продукты P' со скоростями реакции v_1, v_2, v_3 соответственно.

Динамика этого процесса может быть описана следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dS}{dt} = -v_1, \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = v_1 - v_2 - v_3, \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = -v_2. \quad (3)$$

Пренебрегая насыщением фермента S (ацетиленовой жирной кислотой) и P (продуктом), скорости на отдельных стадиях ферментативной реакции v_1 и v_2 можно выразить как

$$v_1 = k_1 \cdot E \cdot S, \quad (4)$$

$$v_2 = k_2 \cdot E \cdot P. \quad (5)$$

Для того чтобы объяснить зависимость остаточных активностей от начальной концентрации ингибитора, необходимо было выбрать для v_3 нелинейную зависимость по отношению к P:

$$v_3 = k_3 \cdot P^2. \quad (6)$$

Учитывая уравнения (4)—(6) и введя относительную активность E^{**} фермента

$$E^{**} = \frac{E}{E_0} \quad (7)$$

(E_0 — начальная концентрация фермента), систему кинетических уравнений (1)—(3) можно привести к виду

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 \cdot E_0 \cdot S \cdot E^{**}, \quad (8)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot E_0 \cdot S \cdot E^{**} - k_2 \cdot E_0 \cdot P \cdot E^{**} - k_3 \cdot P^2, \quad (9)$$

$$\frac{dE^{**}}{dt} = -k_2 \cdot P \cdot E^{**}. \quad (10)$$

Таким образом, взаимодействие ацетиленовых жирных кислот с простагландин-Н-синтазой описывается системой трех дифференциальных уравнений (8)—(10) с неизвестными параметрами k_1, k_2 и k_3 . Для установления этих констант скорости равенства (8), (9) и (10) были сопоставлены с экспериментальными данными (рис. 1 и 2) для двух различных начальных концентраций ингибитора с использованием пакета программ SIMFIT [6]. Начальная концентрация фермента $E_0 = 40$ нМ была рассчитана на основе описанной специфической активности чистого фермента (150 мкмоль O_2 /мин·мг белка) и его молекулярной массы

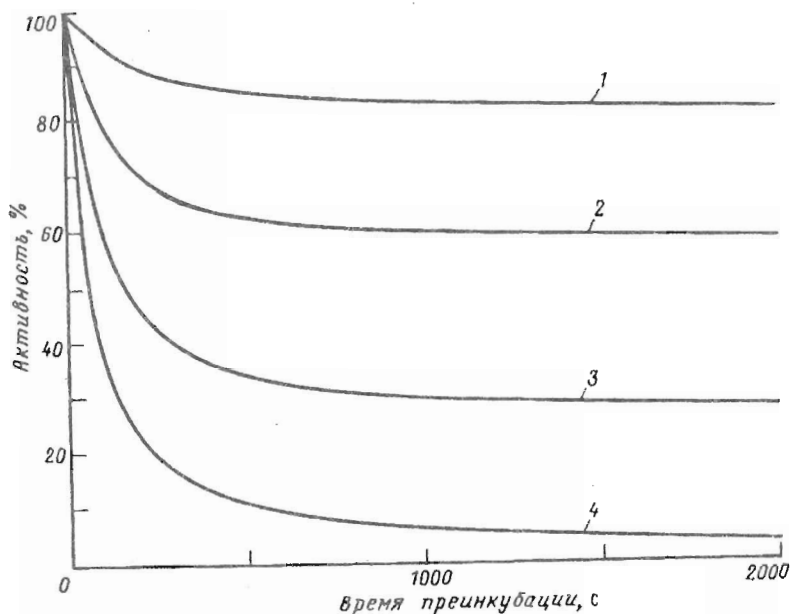


Рис. 4. Компьютерное моделирование инактивации простагландин-Н-синтазы 5,8,11,14-эйкозатетраеновой кислотой в концентрациях 0,1 (1), 1 (2), 5 (3) и 20 мкМ (4)

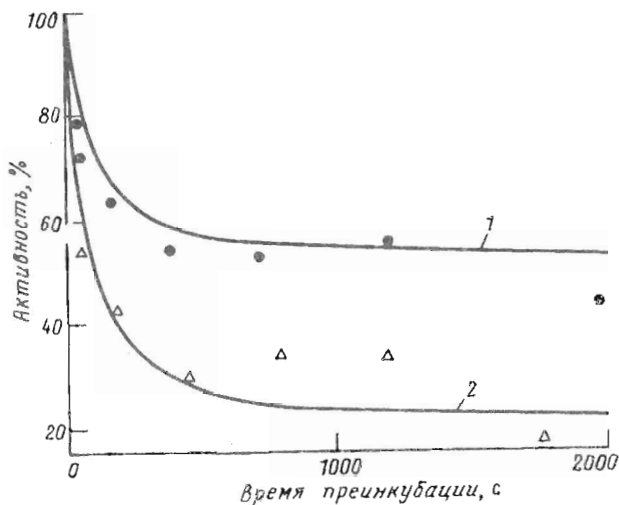


Рис. 5. Компьютерное моделирование инактивации простагландин-Н-синтазы 8,11,14-эйкозатриеновой кислотой в концентрациях 1,0 (1) и 5,0 мкМ (2). Для сравнения приведены экспериментальные данные из рис. 2 (точки)

130 000 Да [4], а также по начальной скорости поглощения кислорода в контрольных образцах без ингибитора. Результаты компьютерной обработки показаны на рис. 4 и 5. Наблюдается удовлетворительное соответствие расчетных кривых экспериментальным данным (ср. с рис. 1 и 2). Это соответствие в действительности имеет место только при низких концентрациях ацетиленовой жирной кислоты, но не при концентрациях свыше 20 мкМ. Отклонение может объясняться мгновенным конкурентным действием высоких концентраций ингибиторов, как упомянуто выше.

Кислота	k_1	k_2	k_3
8,11,14-Эйкозатрииновая	0,60	0,41	0,022
5,8,11,14-Эйкозатетраиновая	0,58	0,29	0,029

Из таблицы, в которой приведены рассчитанные константы скорости, следует, что ЕТГА и 8,11,14-эйкозатрииновая кислота имеют сходные значения кинетических параметров с тем отличием, что отношение k_2/k_3 , которое является мерой скорости суицидного превращения субстрата, выше в случае эйкозатрииновой кислоты. Следовательно, эйкозатрииновая кислота — более эффективный ингибитор фермента, хотя ее концентрация полуингибирования (рис. 3) несколько выше. Экспериментальные данные, полученные для простагландин-Н-синтазы, согласуются с разветвленной кинетической моделью, использованной в настоящей статье, и не соответствуют модели, используемой при инактивации липоксигеназ ацетиленовыми жирными кислотами [3].

Полученные результаты подтверждают предположение, что ацетиленовые жирные кислоты действуют как суицидные субстраты простагландин-Н-синтазы, и свидетельствуют также о том, что механизм их действия на этот фермент иной, чем на липоксигеназу. Главное отличие состоит в неполной инактивации простагландин-Н-синтазы, которая описывается зависимостью скорости несуйцидной реакции $P \rightarrow P'$ от концентрации P в квадрате (уравнение 6). Такая зависимость может предполагать радикально-цепные реакции, вызванные активным интермедиатом P . Следует отметить, что квадратичная зависимость известна также и для гем-катализируемого перекисного окисления липидов [7]. Схема реакции (1) может быть дополнительно подтверждена в дальнейших исследованиях с использованием меченых ацетиленовых жирных кислот.

Экспериментальная часть

8,11,14-Эйкозатрииновая, 5,8,11,14-эйкозатетраиновая (ЕТГА) и 5,8,11,14,17-эйкозапентаиновая кислоты были синтезированы авторами [8—11]. Микросомы везикулярных желез барана были подготовлены по известной методике [12] с некоторыми модификациями [5] и использованы как препарат простагландин-Н-синтазы. Образцы для измерения активности содержали 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мМ EDTA (натриевая соль), 0,5 мМ фенол и 0,8 мг/мл микросомального белка, что соответствует начальному поглощению кислорода около 200 нмоль/мин·мл. Реакцию начинали при 25° С добавлением арахидоновой кислоты (конечная концентрация 25 мкМ). Поглощение кислорода измеряли оксиграфическим методом [5], оптимизированным для исследования нестероидных противовоспалительных средств. Для изучения кинетики ферментативной реакции ацетиленовую жирную кислоту, растворенную в метаноле, добавляли к 10 мл исследуемого образца фермента без арахидоновой кислоты, преинкубировали при 25° С, через определенные интервалы времени отбирали аликваты, которые переносили в термостатированную оксиграфическую камеру; остаточную активность измеряли с добавлением арахидоновой кислоты. Контрольные образцы, содержащие чистый метанол вместо раствора ацетиленовой жирной кислоты, были обработаны аналогично.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Downing D. T., Ahern D. G., Bachta M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1970. V. 40. P. 218—233.

2. Sams A. R., Sprecher H., Sankarappa S. K., Needleman P.//Leukotriens and other Lipoxygenase Products / Eds B. Samuelsson, T. Paoletti. N. Y.: Raven Press, 1982. P. 19—28.
3. Kühn H., Holzhütter H.-G., Schewe T., Hiebsch Ch., Rapoport S. M.//Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. P. 577—583.
4. Kulmacz R. W., Lands W. E. M.//Prostaglandins and Related Substances — a Practical Approach/Eds C. Benedetto, R. G. McDonald-Gibson, S. Nigam, T. F. Slater. Oxford, Washington: IRL Press, 1987. P. 209—227.
5. Schewe Ch., Ludwig P., Holzhütter H.-G., Schewe T.//Pharmazie. 1991. V. 46. № 11. P. 802—807.
6. Holzhütter H.-G., Colosimo A.//Comput. Appl. Biosci. 1990. V. 6. № 1. P. 23—28.
7. Tappel A. L.//Autooxidation and Antioxidants. V. 1./Ed. W. O. Lundberg. N. Y.: Wiley (Interscience), 1991. P. 325.
8. Якушева Л. А., Мягкова Г. И., Бордюкова О. О., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 3. С. 422—428.
9. Мягкова Г. И., Якушева Л. А., Бордюкова О. О., Шатская В. Б., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 2. С. 255—260.
10. Белослудцев Ю. Ю., Мягкова Г. И., Демин П. М., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1425—1426.
11. Белослудцев Ю. Ю., Демин П. М., Мягкова Г. И., Заболотский Д. А., Евстигнеева Р. П.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 100—102.
12. Van der Ouderaa F. S., Buytenhek M.//Meth. Enzymol. 1982. V. 86. P. 60—68.

Поступила в редакцию
12.V.1991

После доработки
16.I.1993

Ch. Schewe, Yu. Yu. Belosludtsev, P. M. Demin*,
H.-G. Holzhütter, T. Schewe, G. I. Myagkova*,
R. P. Evstigneeva**

INACTIVATION OF PROSTAGLANDIN H SYNTHASE FROM SHEEP VESICULAR GLANDS BY ACETYLENIC FATTY ACIDS

Institute of Biochemistry, Humboldt University, Berlin;

** M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Acetylenic fatty acids, 8,11,14-icosatriynoic, 5,8,11,14-icosatetraynoic and 5,8,11,14,17-icosapentaynoic acids, were compared with respect to their effects on the particulate prostaglandin H synthase. All the acetylenic acids inactivated the enzyme in a time-dependent manner. The eicosatriynoic and eicosatetraynoic acids exhibited comparable efficacies, whereas the eicosapentaynoic acid proved to be a weaker inactivator. The time-courses of inactivation fitted a kinetic model suggest an enzyme-catalysed conversion of the compounds via alternative suicidal and non-suicidal routes. The characteristics of inactivation of prostaglandin H synthase differ from those of lipoxygenases.