

Кинетические исследования «медленных» ингибиторов PGHS на примере диклофенака

Ефремов Алексей Александрович¹, Бархатов Владимир Игоревич², Кривошей Александр Владимирович³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: alexs.a.efremov@gmail.com

Димерный фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS, К.Ф. 1.14.99.1) является центральным звеном в биосинтезе простагландинов - медиаторов воспаления и боли, а также других важных физиологических процессов. Фермент катализирует две реакции: циклооксигеназную (субстраты - арахидоновая кислота и кислород) и пероксидазную. Ингибирование циклооксигеназной активности PGHS обуславливает фармакологическое действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). В литературе имеются противоречивые данные по определению кинетических параметров для некоторых ингибиторов PGHS. Диклофенак представляет собой один из самых распространенных НПВП с выраженным анальгетическим действием.

Целью данной работы является установление механизма ингибирования PGHS диклофенаком, в частности, проверка обратимости и времязависимости, определение констант реакции.

Для исследования использовали фермент простагландин-Н-синтазу 1 из везикулярных желез барана. Скорость реакции детектировали по изменению концентрации кислорода. Измерения проводили при 25 градусах С в 50 мМ трис-НСl буфере, при pH=8, 0,1% детергента твин-20, 100 мкМ арахидоновой кислоты и 270 мкМ кислорода. Концентрация фермента была определена ранее с помощью титрования индометацином и проверена в данной работе для связывания с диклофенаком. Для оценки кинетических параметров необходимо знать концентрацию не только ингибитора, но и фермента, т.к. нельзя пренебречь расходом ингибитора на связывание с ферментом. Под «медленными» ингибиторами мы подразумеваем те, для которых можно разделить стадии связывания ингибитора и субстрата по иерархии скоростей. В таком случае, за время детекции скорости реакции после добавления субстрата концентрацию фермент-ингибиторного комплекса можно считать неизменной.

Мы установили, что диклофенак является обратимым ингибитором. Эксперименты по варьированию времени инкубации при различных концентрациях ингибитора показали, что после 15 минут инкубации можно считать систему фермент-ингибитор равновесной. Равновесная константа ингибирования $K = 1,8 \cdot 10^{-8}$ М, элементарная константа ингибирования $k_1 = 3,8 \cdot 10^4$ (М*с)⁻¹ и элементарная константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса $k_{-1} = 6,84 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹. Для описания ингибирования PGHS диклофенаком была привлечена простая одностадийная модель.

Из исследованных в нашей лаборатории (ДНТ-5027, ибупрофен, напроксен, индометацин) ингибиторов диклофенак является самым медленным и одновременно самым сильным (имеет наименьшую константу диссоциации). Мы предполагаем, что полученные данные могут иметь практическое применение в дальнейших исследованиях фармакологических эффектов НПВП.

Иллюстрации

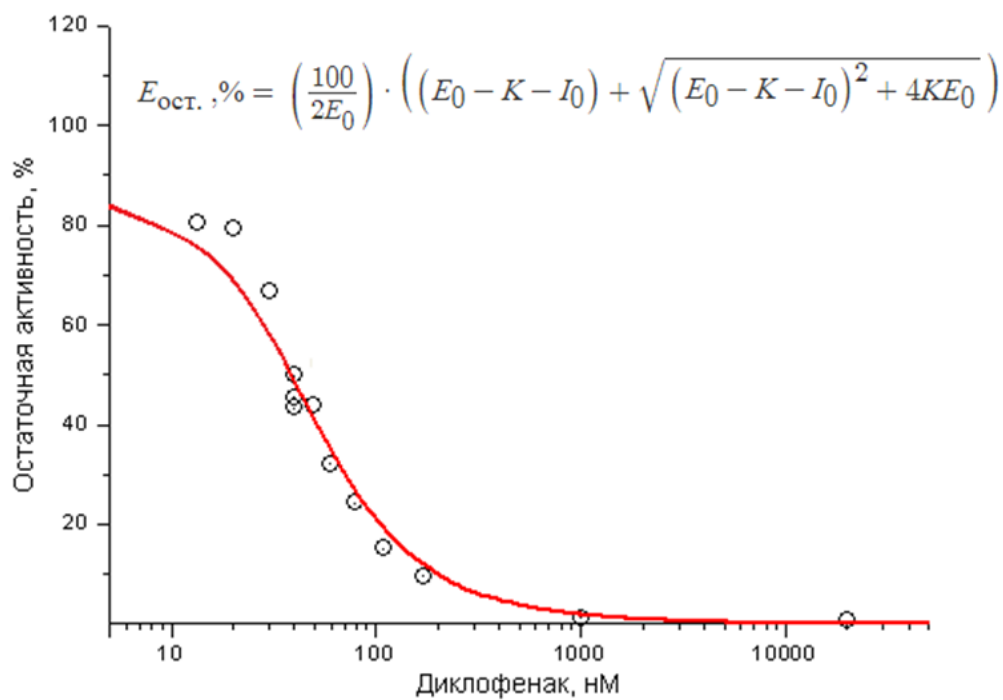


Рис. 1. Зависимость равновесной (после инкубации в течение 15 минут) активности PGHS от концентрации диклофенака. Концентрация PGHS 40нМ, равновесная константа ингибирования определена как 18 ± 2 нМ.