



УДК 577.152.37:577.175.82/85

**КИНЕТИКА РАЗЛОЖЕНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНА H₂.
МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
ПРОСТАГЛАНДИН-Н-КОНВЕРТАЗ***Басевич В. В., Мевх А. Т., Варфоломеев С. Д.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова***Ярвинг И.***Институт химии Академии наук ЭССР, Таллин*

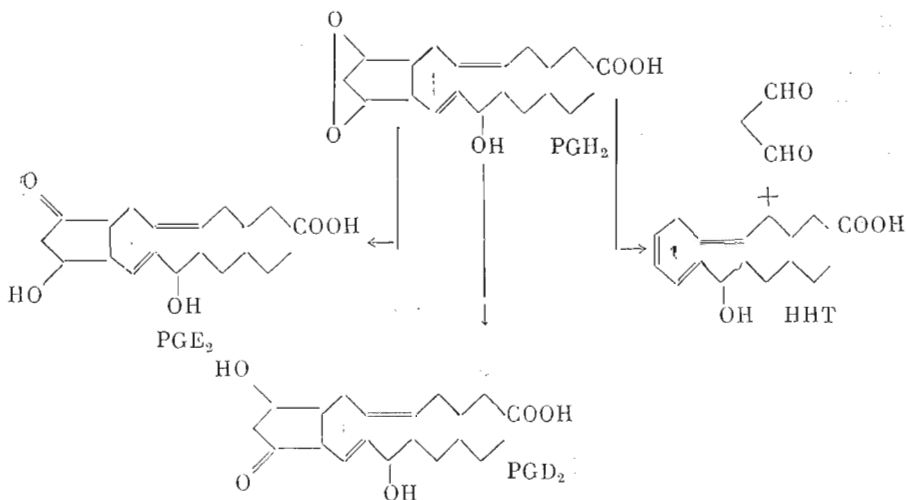
Проведено количественное описание процессов, протекающих при неферментативном разложении простагландина H₂. Кинетика разложения изучена с помощью тиобарбитуратного теста, отражающего содержание в реакционной смеси малонового диальдегида. Наблюдаемые константы скорости разложения простагландина H₂ практически не зависят от pH в интервале 5,5–9,5, а рассчитанные времена полупревращения при этих значениях pH меняются от 5,8 до 3,6 мин. На примере тромбоксансинтетазы из тромбоцитов человека показана принципиальная возможность применения тиобарбитуратного теста для определения эндопероксидпростагландин-конвертазной активности. Показано, что наблюдаемая константа скорости реакции в присутствии фермента является линейной функцией от его концентрации.

15-Окси-9 α ,11 α -пероксипроста-5,13-диеновая кислота (простагландин H₂) впервые была выделена и идентифицирована в 1973 г. [1, 2]. Пространственная структура данного соединения строго доказана [3].

Образование простагландина H₂ (PGH₂) из арахидоновой кислоты является общим и обязательным этапом синтеза простагландинов и тромбоксанов и катализируется первым ферментом простагландинсинтетазной системы — эндопероксидпростагландинсинтетазой (PGH-синтетазой) (КФ 1.14.99.1) [2, 4, 5]. Под действием второго фермента системы, который мы предлагаем в общем случае называть эндопероксидпростагландинконвертазой (PGH-конвертазой), простагландин H₂ превращается в зависимости от органа или ткани локализации ферментной системы в простагландин E₂, F_{2 α} , D₂, I₂ или тромбоксан [6].

Существует ряд удобных и методически доступных способов определения активности PGH-синтетазы: слежение за изменением концентрации кислорода в реакционной смеси [7]; детектирование изменений концентрации участвующего в реакции донора электронов [8, 9]; радиоавтографическая детекция продуктов [10]; спектрофотометрическая методика определения малонового диальдегида (MDA), сопутствующего продукта PGH-синтетазной реакции [11–13], по образованию им окрашенного соединения с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТВА-тест) [13]. Для определения активности PGH-конвертаз используется преимущественно радиоавтографическая детекция продуктов, образующихся при ферментативном превращении меченого субстрата [10].

Простагландин H₂ является нестабильным соединением. В буферных растворах при pH 8 и 37° С он разлагается главным образом на смесь простагландинов E₂ и D₂ с периодом полупревращения 4–5 мин [14]. Кроме того, как при спонтанном, так и при ферментативном превращении простагландина H₂ образуются малоновый диальдегид и 12-*L*-оксипентадека-5,8,10-триеновая кислота (ННТ) [2, 15, 16]:



Малоновый диальдегид и простагландин H_2 можно количественно определять с помощью ТВА-теста спектрофотометрически или используя флуоресцентный способ детекции [13, 15].

Целью настоящей работы является, с одной стороны, количественное описание процессов, протекающих при неферментативном превращении простагландина H_2 , с другой — изучение возможности применения ТВА-теста для описания кинетики РGH-конвертазных реакций при использовании простагландина H_2 в качестве субстрата.

Кинетика неферментативного разложения простагландина H_2

Экспериментально были исследованы закономерности образования окрашенного продукта при реакции тиобарбитуровой кислоты с различными компонентами системы, включая малоновый диальдегид, простагландины H_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$. Реакцию проводили при pH 1 и температуре 95–100° С (условия ТВА-теста). При исследовании реакции с малоновым диальдегидом в качестве его стабильного предшественника был использован 1,1,3,3-тетраэтоксипропан, который в условиях опыта гидролизуеться количественно, образуя малоновый диальдегид [15, 17].

Кинетические кривые образования окрашенного продукта при использовании в качестве реагента малонового диальдегида (рис. 1а, 1–3) и простагландина H_2 (рис. 1а, 4–6) свидетельствуют, что после 20 мин проведения реакции при 95–100° С (pH 1) процесс образования окрашенного продукта (A_{532}) полностью заканчивается. Сравнение характеристических времен реакции показывает (см. рис. 1б), что кинетика процесса

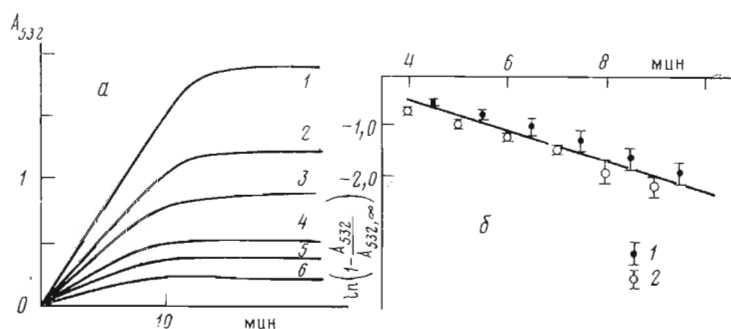
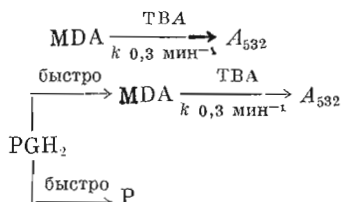


Рис. 1. Кинетика образования окрашенного соединения из MDA и простагландина H_2 в условиях ТВА-теста: а — непрерывное изменение поглощения при λ 532 нм; исходные концентрации MDA: 1 — 11,0; 2 — 7,7; 3 — 6,4 мкМ; простагландина H_2 : 4 — 5,2; 5 — 4,7; 6 — 2,9 мкМ; б — данные рис. 1а в полулогарифмических координатах: 1 — MDA (кривые 1–3 рис. 1а), 2 — простагландин H_2 (кривые 4–6 рис. 1а)

для обоих соединений описывается одним и тем же временем полупревращения. Это указывает на то, что как в случае малонового диальдегида, так и в случае простагландина H_2 процесс образования спектрофотометрически детектируемого соединения контролируется одной и той же стадией, а именно стадией реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой. Как известно, эндоперекиси простагландинов при нагревании расщепляются с образованием малонового диальдегида [2, 15].

Протекающие при проведении ТВА-теста (рН 1; 95–100° С) процессы можно представить в виде схемы:



где P — сумма простагландинов E_2 и D_2 ; A_{532} — окрашенный детектируемый продукт.

Помимо расщепления с образованием малонового диальдегида простагландин H_2 превращается в продукт, который не взаимодействует с тиобарбитуровой кислотой. Результатом этого является тот факт, что определяемые экспериментально значения коэффициентов молярного поглощения образующегося окрашенного продукта по малоновому диальдегиду и простагландину H_2 не совпадают (рис. 2). Параллельная реакция образования продукта P существенно снижает значение $\epsilon_{\text{PGH}_2} : \epsilon_{\text{MDA}} = (1,53 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, $\epsilon_{\text{PGH}_2} = (0,89 \pm 0,03) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. (Полученное значение ϵ_{MDA} совпадает с величиной, найденной ранее в работе [15].) Как видно из рис 2, простагландины E_2 и $F_{2\alpha}$ не образуют окрашенного продукта в условиях ТВА-теста.

Используя ТВА-тест как метод определения концентрации эндоперекисей и малонового диальдегида, детально исследовали кинетику неферментативной трансформации простагландина H_2 при его инкубации в буферном растворе при рН и температуре, близких к физиологическим. С этой целью раствор простагландина H_2 инкубировали при 32° С, через различные промежутки времени отбирали пробы, добавляли их в раствор,

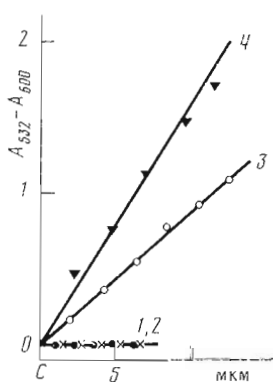


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость поглощения от концентрации простагландина H_2 и продуктов его неферментативного превращения: 1–3 — простагландины E_2 , $F_{2\alpha}$, H_2 соответственно; 4 — MDA. Все вещества добавляли в 1–10 мкл спирта к ТВА-реагенту

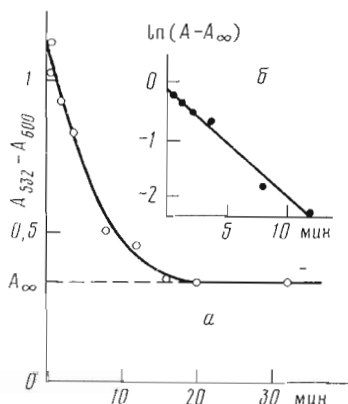


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика неферментативного разложения простагландина H_2 : а — зависимость образования окрашенного соединения от времени предынкубации простагландина H_2 ($1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в фосфатном буфере, рН 6 (32° С); б — данные рис. 3а в полулогарифмических координатах

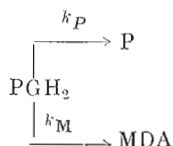
содержащий ТВА и HCl, выдерживали при 95–100° С (рН 1) и спектрофотометрически определяли концентрацию образовавшегося окрашенного продукта. При проведении инкубации простагландина в буферном растворе наблюдается уменьшение суммарной концентрации эндоперекисных групп и малонового диальдегида (рис. 3).

Количество эндоперекисных групп, определяемых в условиях ТВА-теста, не уменьшается до нуля во времени, а выходит на некоторый предельный уровень. Это свидетельствует о том, что параллельно с исчезновением эндоперекисных групп протекает процесс накопления соединения, которое спектрофотометрически детектируется в условиях ТВА-теста.

Кинетика изменения экспериментально наблюдаемого оптического поглощения достаточно строго описывается экспоненциальным уравнением

$$A_{532} = a \cdot e^{-k_{\text{набл}} \cdot t} + b, \quad (1)$$

где $k_{\text{набл}}$ — наблюдаемая константа скорости реакции, a , b — параметры, зависящие от концентрации простагландина H_2 и температуры. Простейшая кинетическая схема, описывающая экспериментальные данные, может быть представлена в виде



где k_M — константа скорости реакции превращения простагландина H_2 в малоновый диальдегид; k_P — сумма констант превращения простагландина H_2 в недетектируемые в ТВА-тесте продукты.

Эта кинетическая схема может быть представлена системой уравнений:

$$\begin{cases} -\frac{d[\text{PGH}_2]}{dt} = (k_M + k_P) \cdot [\text{PGH}_2] \\ \frac{d[\text{MDA}]}{dt} = k_M \cdot [\text{PGH}_2] \end{cases}$$

Кинетика изменения концентрации простагландина H_2 и MDA (при начальном условии $t=0$, $[\text{PGH}_2] = [\text{PGH}_2]_0$) будет описываться уравнениями

$$[\text{PGH}_2] = [\text{PGH}_2]_0 \cdot e^{-(k_M + k_P) \cdot t} \quad (2)$$

$$[\text{MDA}] = \frac{k_M}{k_M + k_P} [\text{PGH}_2]_0 \cdot [1 - e^{-(k_M + k_P) \cdot t}]. \quad (3)$$

Экспериментально детектируемая величина поглощения (A_{532}) представляет собой сумму поглощений, определяемых концентрацией малонового диальдегида, образующегося при низкотемпературном превращении простагландина H_2 в буферном растворе (A_{532}^{MDA}) и малонового диальдегида, образующегося при высокотемпературном расщеплении простагландина H_2 в ТВА-тесте ($A_{532}^{\text{PGH}_2}$):

$$A_{532} = A_{532}^{\text{MDA}} + A_{532}^{\text{PGH}_2} = \epsilon_{\text{MDA}} \cdot [\text{MDA}] + \epsilon_{\text{PGH}_2} \cdot [\text{PGH}_2].$$

С учетом (2) и (3) экспериментально наблюдаемое изменение поглощения во времени описывает уравнение

$$A_{532} = \frac{\epsilon_{\text{MDA}} \cdot k_M}{k_M + k_P} [\text{PGH}_2]_0 + \left(\epsilon_{\text{PGH}_2} - \frac{\epsilon_{\text{MDA}} \cdot k_M}{k_M + k_P} \right) [\text{PGH}_2]_0 \cdot e^{-(k_M + k_P) \cdot t}. \quad (4)$$

Соответственно при $t=0$ имеем

$$A_{532;0} = \epsilon_{\text{PGH}_2} \cdot [\text{PGH}_2]_0,$$

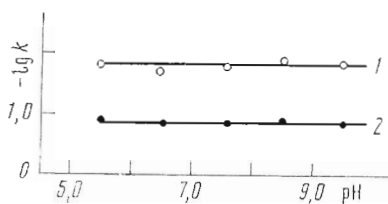


Рис. 4. Зависимость констант скоростей реакции неферментативного разложения простагландина H_2 от pH: 1 — k_M , 2 — k_P ; фосфатный буфер (pH 5,0–7,0); трис-HCl-буфер (pH 7,0–9,0), 32° С

при $t \rightarrow \infty$ (предельное оптическое поглощение)

$$A_{532; \infty} = \frac{\varepsilon_{MDA} \cdot k_M}{k_M + k_P} [PGH_2]_0.$$

Уравнение (4) описывает экспериментально наблюдаемую зависимость (1). При этом

$$k_{набл} = k_M + k_P, \quad (5)$$

$$a = \varepsilon_{PGH_2} \left(1 - \frac{\varepsilon_{MDA}}{\varepsilon_{PGH_2}} \cdot \frac{k_M}{k_M + k_P} \right) \cdot [PGH_2]_0,$$

$$b = \varepsilon_{MDA} \cdot \frac{k_M}{k_M + k_P} [PGH_2]_0.$$

Полученные уравнения позволяют определить константы скорости трансформации простагландина H_2

$$\frac{A_{532; 0}}{A_{532; \infty}} = \frac{\varepsilon_{PGH_2}}{\varepsilon_{MDA}} \left(1 + \frac{k_P}{k_M} \right). \quad (6)$$

Из данных рис. 3 с учетом найденных ранее значений ε_{PGH_2} и ε_{MDA} в соответствии с уравнением (6) следует, что при pH 6,0 (32° С) $k_P/k_M \approx 5$, т. е. превращение простагландина H_2 в простагландины E_2 и D_2 , недетектируемые в ТВА-тесте, протекает в 5 раз быстрее, чем его разложение с образованием малонового диальдегида. Константы скорости k_M и k_P соответственно равны 0,03 и 0,15 мин⁻¹.

Была исследована зависимость констант k_M и k_P от pH. Из рис. 4 можно видеть, что ярко выраженной зависимости скорости от pH в реакции спонтанного превращения простагландина H_2 не наблюдается. Отношение k_P/k_M изменяется в 2,0–2,5 раза. Времена полупревращения простагландина H_2 , рассчитанные из значений $k_{набл}$, в интервале pH 5,5–9,5 меняются незначительно (от 5,8 до 3,6 мин) и совпадают со значениями, определенными экспериментально по распаду радиоактивного простагландина H_2 [14].

Используя найденные значения констант скоростей, можно получить расчетные кинетические кривые уменьшения концентрации простагландина H_2 , образования малонового диальдегида и недетектируемых продуктов при неферментативном превращении простагландина H_2 при температуре и pH, близких к физиологическим (рис. 5).

Ферментативное разложение простагландина H_2

Описание свойств, устойчивости и механизма неферментативного превращения простагландина H_2 , а также характера протекающих процессов в условиях ТВА-теста является необходимым и делает возможным применение данного метода для определения ферментативной активности PGH-конвертаз.

Рассмотрим принципиальные возможности метода на примере тромб-оксигениназы, выделяемой из тромбоцитов человека. При этом важно отметить, что метод имеет общий характер и может быть использован при изучении большого класса ферментов, специфически превращающих эндоперекиси простагландинов в различные простагландины.

Действительно, из рис. 6а следует, что скорость расхода простагландина H_2 зависит от присутствия в системе тромбоксансинтетазы и наблюдаемая константа скорости реакции является линейной функцией от концентрации фермента (рис. 6б).

Таким образом, применение данного подхода может служить методом определения ферментативной активности PGII-конвертаз, когда в качестве субстрата используется простагландин H_2 , а также и эндоперекиси простагландинов H_1 , H_3 , G_1 , G_2 , G_3 , разлагающиеся с образованием малонового диальдегида [5, 18].

Экспериментальная часть

Простагландины H_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ получены из Института химии АН ЭССР. Чистота препаратов, по данным газожидкостной хроматографии [19], составляла не менее 95%. Фосфат калия марки ос.ч., 2-тиобарбитуровая кислота марки ч.д.а., трис-(гидроксиметил)аминометан — препарат фирмы Serva (ФРГ), твин-20 — фирмы Merck (ФРГ). 1,1,3,3-Тетраэтоксипропан синтезирован на кафедре химической энзимологии МГУ согласно работе [20]. Солубилизованный фермент из тромбоцитов человека получали как описано [21].

Кислотный гидролиз 1,1,3,3-тетраэтоксипропана для получения стандартных растворов малонового диальдегида осуществляли в соответствии с работой [17].

Тиобарбитуратный тест проводили согласно описанным методикам [22–24]. Из реакционной ячейки, в которой предынкубировали простагландин H_2 , отбирали аликвоты во времени (200 мкл) и переносили в пробирку, содержащую 1,5 мл 0,1 М HCl и 1,5 мл 0,6% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (ТВА-реагент). Выдерживали не менее 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения до 20° С измеряли спектр поглощения в диапазоне 500–600 нм на двухлучевом спектрофотометре Hitachi-124. В кювете сравнения использовали раствор, полученный при добавлении 200 мкл буфера к ТВА-реагенту, с той же температурной обработкой, что и рабочий раствор. При работе с ферментом для получения раствора, используемого в кювете сравнения, к ТВА-реагенту добавляли 200 мкл раствора солубилизованного фермента в требуемой концентрации и в буфере, соответствующем условиям проводимого эксперимента. При определении значения поглощения в максимуме (A_{532}) учитывали «фоновое» поглощение при 600 нм (A_{600}). Полученная зависимость поглощения ($A_{532} - A_{600}$) от времени являлась исходной информацией приводимых кинетических результатов. Наблюдаемые константы скорости реакции рассчитывали в полулогарифмических координатах с использованием метода наименьших квадратов.

Содержание белка определяли по методу Лоури [25].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hamberg M., Samuelsson B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 3, p. 899–903.
2. Nugteren D. H., Hazelhof E. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 326, № 3, p. 448–461.
3. Hamberg M., Svensson J., Wacabayashi T., Samuelsson B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 2, p. 345–349.
4. Samuelsson B., Goldyne M., Granström E., Hamberg M., Hammarström S., Malmsten C. Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, № 3, p. 997–1029.
5. Hammarström S. Arch. Biochem. and Biophys., 1982, v. 214, № 2, p. 431–445.
6. Salmon J. A., Flower R. J. In: Hormons in blood / Eds Gray C. H., James V. H. T. Acad. Press, 1979, v. 2, p. 237–319.
7. Smith W. L., Lands M. E. M. J. Biol. Chem., 1974, v. 246, № 21, p. 6700–6702.
8. Takeguchi C., Sih C. J. Prostaglandins, 1972, v. 2, № 3, p. 169–184.
9. Ohki S., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 2, p. 829–836.
10. Ångard E., Samuelsson B. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, № 9, p. 3518–3521.
11. Hamberg M., Samuelsson B. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 22, p. 5344–5354.
12. Hamberg M., Samuelsson B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 71, № 9, p. 3400–3404.
13. Flower R. J., Cheung H. S., Cushman D. W. Prostaglandins, 1973, v. 4, № 3, p. 325–341.

14. *Svensson J., Hamberg M., Samuelsson B.* Acta physiol. scand., 1975, v. 94, № 2, p. 222-228.
15. *Shimisy T., Kondo K., Hayashi O.* Arch. Biochem. and Biophys., 1981, v. 206, № 2, p. 271-276.
16. *Diszjaluzy U., Falardeau P., Hammarström S.* FEBS Lett., 1977, v. 84, № 2, p. 271-274.
17. *Gutteridge J. M. C.* Analyt. Biochem., 1975, v. 69, № 2, p. 518-526.
18. *Hamberg M.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 618, № 3, p. 389-398.
19. *Самель Н., Лыхмус М., Алисгэ Р., Мянник А., Лилле Ю.* Изв. АН ЭССР, 1981, т. 30, № 3, с. 199-207.
20. *Протопопова Т. В., Сколдинов А. П.* Ж. общ. химии, 1957, т. 27, № 1, с. 57-62.
21. *Мевх А. Т., Басевич В. В., Варфоломеев С. Д.* Биохимия, 1982, т. 47, № 10, с. 1635-1640.
22. *Yagi K.* Biochem. Med., 1976, v. 15, № 1, p. 212-216.
23. *Uchiyama M., Michara M.* Analyt. Biochem., 1978, v. 86, № 1, p. 271-278.
24. *Pryor W. A., Stendley J. P., Blair E.* Lipids, 1976, v. 11, № 5, p. 370-379.
25. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265-275.

Поступила в редакцию
4.XI.1982

KINETICS OF THE PROSTAGLANDIN H₂ DEGRADATION. A METHOD FOR DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF PROSTAGLANDIN-H-CONVERTASES

BASEVICH V. V., MEVKH A. T., YARVING I., VARFOLOMEEV S. D.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow; Institute of Chemistry,
Academy of Sciences of the Estonian SSR, Tallinn*

The quantitative study of the processes that accompany nonenzymatic degradation of prostaglandin H₂ has been carried out. The thiobarbituric acid test which shows the content of malonic dialdehyde in the reaction mixture has been used to study kinetics of the degradation. The apparent rate constants of this process have been pH-independent over the pH-range 5,5-9,5, and the calculated conversion half-time changes from 5,8 to 3,6 min at these pH values. Thromboxane synthetase from human platelets has been chosen to demonstrate the possibility of application of thiobarbituric acid test for determination of the activity of prostaglandin endoperoxide convertase. It has been shown that the apparent rate constant of the reaction in the presence of the enzyme is the linear function of its concentration.