

УДК 541.49:543.54

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОСТАГЛАНДИН *H* СИНТАЗЫ

Ю.А. Кузнецова, В.Б. Ромах, М.Л. Строкин, А.Т. Мевх

(институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского)

Проведено изучение PGH-синтазной реакции с участием в качестве субстратов доноров электронов сирингалдазина (Sg) и ABTS. Показано, что оба донора электронов являются субстратами, определены кинетические параметры ферментативной реакции в присутствии Sg и ABTS. Предложен метод спектрофотометрического определения активности PGHS с использованием Sg и ABTS. Обнаружено, что чувствительность детекции ферментативной активности возрастает примерно в 10 раз.

Проблема создания высокочувствительных и доступных методов определения ферментативной активности актуальна при разработке различных экспресс-тестов в медицине, экологии, микробиологической и пищевой промышленности. Метод определения содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в биологических жидкостях, пищевых продуктах с помощью ферментов может оказаться весьма перспективным.

Известно, что ПНЖК C20 являются как субстратами [1], так и ингибиторами [2] фермента простагландин *H* синтаза (КФ 1.14.99.1) (PGHS). Катализируемое PGHS превращение ПНЖК в простагландин H_2 [3] включает присоединение к молекуле кислоты двух молекул кислорода и восстановление в присутствии донора электронов гидроперекисной группы интермедиата до оксигруппы.

Для определения активности многосубстратного фермента PGHS используют следующие методы: 1) полярографический [4], основанный на определении концентрации кислорода; 2) флуорометрический [5], детектирующий продукт реакции при использовании в качестве донора электронов гомованилиновой кислоты; 3) спектрофотометрический [6], основанный на измерении светопоглощения продуктов окисления донора электронов (табл. 1).

Наиболее чувствительным из перечисленных методов является метод флуорометрии [5], однако он достаточно трудоемок. Более доступным является спектрофотометрический метод. Для повышения его чувствительности мы предлагаем использовать сирингалдазин (Sg) и 2,2'-азино-ди-(3-этил-бензтиазолин-6 сульфокислоту) (ABTS) в качестве доноров электронов.

Экспериментальная часть

Препарат PGHS в виде солубилизованных микросом везикулярных желез барана получали по методике

[7]. PGH-синтазную активность фермента определяли спектрофотометрически [6] на спектрофотометре «Shimadzu UV-240» (Япония). Длина волны составляла 530, 405 и 480 нм при использовании Sg («Sigma»), ABTS («Sigma») и адреналина («Serva»). В кювету, содержащую 1 мл буфера, добавляли растворы гемина («Serva»), донора электронов и солубилизованный препарат фермента. Подробный состав реакционной смеси приведен в подписях к рисункам. Реакцию инициировали добавлением арахидоновой кислоты («Sigma»). Начальную скорость реакции определяли по тангенсу угла наклона начального участка кинетической кривой.

Результаты и обсуждение

Известно, что PGHS обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к донору электронов [8, 9]. Спектрофотометрическое определение ферментативной активности заключается в измерении концентрации окисленной формы донора электронов [10], но из-за низких значений коэффициентов экстинкции образующихся соединений применение этого метода было ограничено (табл. 1).

В качестве донора электронов для PGH-синтазной реакции мы использовали Sg и ABTS, известные ранее как субстраты для ряда пероксидаз [11, 12, 13].

В результате окисления Sg (**A**) образуется продукт (**B**) с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{530} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [14] (схема I).

При окислении ABTS (**C**) образуется промежуточный продукт (**D**), который в результате реакции диспропорционирования дает окисленную форму ABTS (**E**) с коэффициентом экстинкции $\epsilon_{405} = 36800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15] (схема II).

Преимущество использования Sg и ABTS состоит в том, что коэффициент экстинкции их окисленных форм в

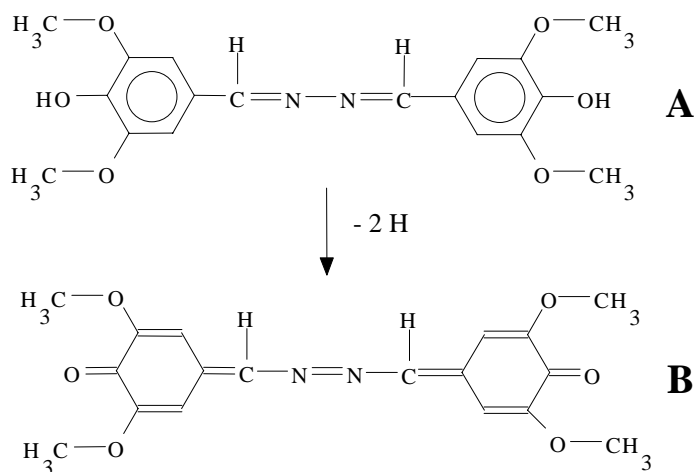


Схема I

10–15 раз выше, чем у используемых обычно доноров электронов (табл. 1). В результате реакции образуются интенсивно окрашенные соединения, благодаря чему реакции с участием новых доноров электронов могут использоваться в качестве экспресс-метода.

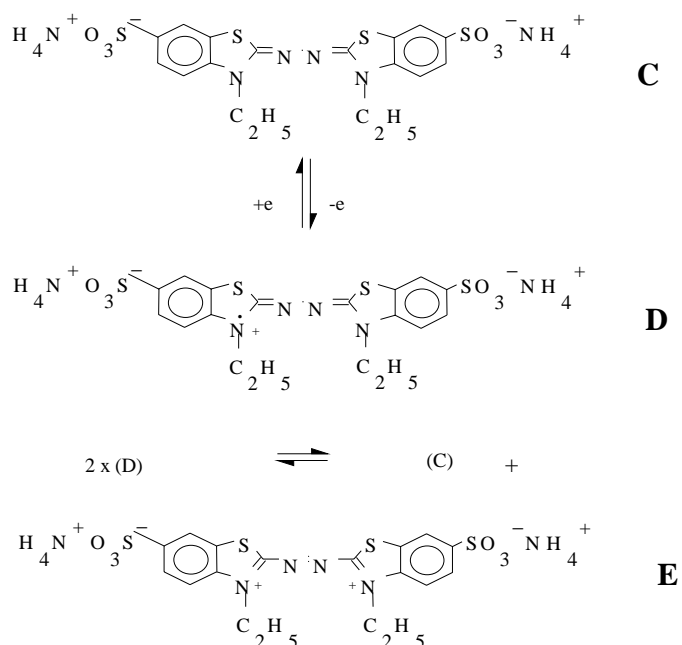


Схема II

Прежде всего, мы определили условия проведения ферментативной реакции с участием ABTS. Для ряда пероксидаз в присутствии ABTS оптимальным для проявления активности является pH 6 [12, 13], тогда как для PGH-синтазной реакции с участием адреналина оптимум pH 7.5-8.0 [10]. Мы исследовали pH-зависимость скорости PGH-синтазной реакции (рис. 1) и эффективной константы скорости инактивации фермента (k_{in}), являющейся одной из важных характеристик PGHS (рис. 2). Из полученных

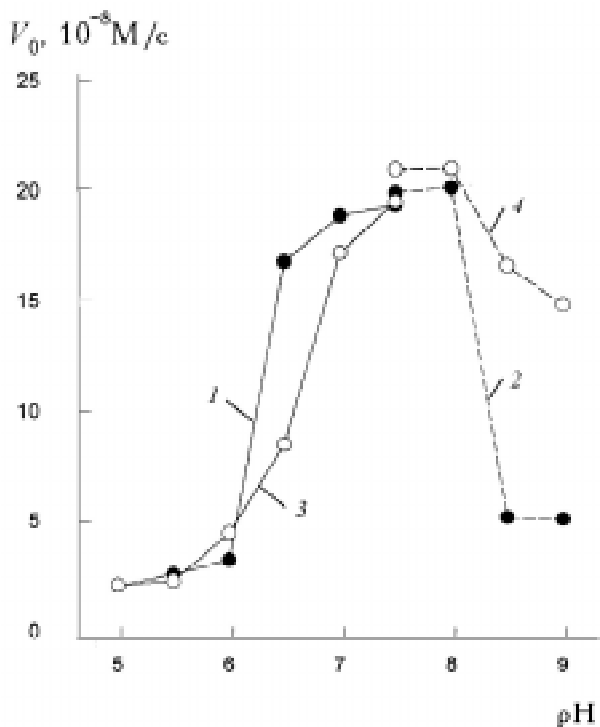


Рис. 1. pH-Зависимость начальной скорости PGH-синтазной реакции (0.1% твин-20, 2 мкМ гемина, 0.19 мМ арахидоновой кислоты, 0.02 мг/мл PGHS); 1 – 100 мМ фосфатный буфер, pH 5.0-7.5; 0.73 мМ ABTS; 2 – 100 мМ трис-НСl, pH 7.5-9.0; 0.73 мМ ABTS; 3 – 100 мМ фосфатный буфер, pH 5.0-7.5; 0.99 мМ адреналина; 4 – 100 мМ трис-НСl, pH 7.5-9.0; 0.99 мМ адреналина.

Таблица 1

Доноры электронов, используемые при спектрофотометрическом определении активности PGHS

Донор электронов	λ_{max} , нм	ϵ_{λ} , $M^{-1} cm^{-1}$	Литература
Ферроцианид калия	420	1040	[10]
Адреналин	480	4020	[16]
Гваякол	436	6400	[17]
TMPD	611	13500	[18]
транс-Феруловая кислота	310	14800	[19]
ABTS	405	36800	[15]
Sg	534	65000	[14]

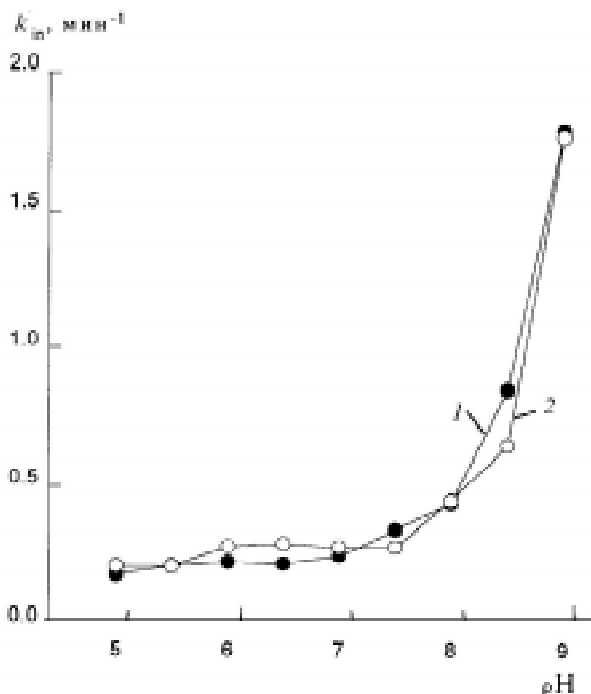


Рис. 2. pH-Зависимость константы инактивации PGHS. (100 мМ фосфатный буфер, pH 5.0–7.5 или 100 мМ трис-НСl, pH 7.5–9.0; 0.1% твин-20, 2 мкМ гемина, 0.19 мМ арахидоновой кислоты, 0.02 мг/мл PGHS); 1 – 0.73 мМ АВТС; 2 – 0.99 мМ адреналина

результатов видно, что скорости ферментативной реакции и инактивации PGHS практически не изменяются в области pH 7.5–8.0 и совпадают с данными, полученными для адреналина. Таким образом, АВТС подходит для работы в оптимальных для PGHS условиях.

Нами получена зависимость скорости PGH-синтазной реакции от концентрации АВТС и Sg и определены константы Михаэлиса (табл. 2). Кинетические параметры реакции PGHS с арахидоновой кислотой в присутствии АВТС, Sg и адреналина также представлены в табл. 2.

Полученные значения K_M соответствуют кинетическим параметрам PGH-синтазной реакции с участием используемых обычно доноров электронов [10]. Однако фоновые значения при использовании Sg, связанные с его неферментативным окислением, довольно высоки, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов.

Таким образом, предложенный нами спектрофотометрический метод определения активности PGHS с использованием АВТС и Sg в качестве доноров электронов дает возможность работать в таком диапазоне концентраций ПНЖК, который соответствует плазме крови. На основе данного метода предполагается разработка экспресс-теста для определения содержания арахидоновой кислоты в плазме крови и пищевых продуктах.

Значения констант Михаэлиса (K_M) PGH-синтазной реакции для арахидоновой кислоты (АА), адреналина (Ad), синингалдазина (Sg) и АВТС

Исследуемая зависимость V_0 ([S]) для субстрата	Насыщающая концентрация второго субстрата, мкМ	$K_M \cdot 10^{-5}$, М
АА	[Sg] = 58	3.7 ± 0.4
АА	[АВТС] = 730	2.5 ± 0.4
АА	[Ad] = 990	2.1 ± 0.3
Ad	[АА] = 190	1.9 ± 0.2
Sg	[АА] = 190	1.2 ± 0.1
АВТС	[АА] = 190	8.5 ± 0.6

Примечание. V_0 – начальная скорость реакции, [S] – концентрация субстрата

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Needleman P., Raz A., Minkes M.S.//Science. 1976. **193**. P. 163.
2. Corey E.J., Shin C., Cashman J.R.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. **80**. P. 3581.
3. Nugteren D.H., Hazelhof E.//Biochim. Biophys. Acta. 1973. **326**. P. 448.
4. Achmedov R.M., Mevkh A.T., Kulys J.J.//Anal. Chim. Acta. 1984. **166**. P. 301.
5. Mevkh A.T., Sud'ina G.F., Golub N.B., Varfolomeev S.D.//Anal. Biochem. 1985. **150**. P. 91.
6. Mevkh A.T., Басевич В.В., Варфоломеев С.Д.//Биохимия. 1982. **47**. С. 1635.
7. Van der Ouderaa F.J., Buytenhek M., Nugteren D.H., Van Dorp D.A.//Biochim. Biophys. Acta. 1977. **487**. P. 315.
8. Ohki S., Ogino N., Yamamoto S., Hayaishi O.//J. Biol. Chem. 1979. **254**. P. 829.
9. Ogino N., Ohki S., Yamamoto S., Hayaishi O.//J. Biol. Chem. 1978. **253**. P. 5061.
10. Варфоломеев С.Д., Mevkh A.T. Простагландины - молекулярные биорегуляторы. М., 1985. С. 307.
11. Grassin C., Dubourdiou D.//J. of the Science of Food and Agriculture. 1989. **48**. P. 369.
12. Lambert G.H., Kotak A.N., Schoeller D.//Prog. Clin. Biol. Res. 1983. **135**. P. 119.
13. Shindler J.S., Bardsley W.G.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975. **67**. P. 1307.
14. Bauer R., Rupe C.//Anal. Chem. 1971. **43**. P. 421.
15. Childs R.E., Bardsley W.G.//Biochem. J. 1975. **145**. P. 93.
16. Green S., Mazur A., Shorr E.//J. Biol. Chem. 1956. **220**. P. 237.
17. Odenwaller R., Maddipati K.R., Marnett L.J.//J. Biol. Chem. 1992. **267**. P. 13863.
18. Kulmacz R.J., Ren Y., Tsai A.-L., Palmer G.//Biochemistry. 1990. **29**. P. 8760.
19. Bakovic M., Dunford H.B.//Biochemistry. 1994. **33**. P. 6475.