



УДК 577.151.63:577.151.05:577.151.042

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ПРОСТАГЛАНДИНОВ НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В ОТКРЫТЫХ СИСТЕМАХ¹

© 2021 г. А. В. Кривошей*, **, А. А. Ефремов**, Е. К. Матвейшина**, ***,
В. В. Панова**, П. В. Вржец*, **, #

*ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Международный учебно-научный биотехнологический центр,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

**ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

***ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принята к публикации 02.04.2021 г.

Проведено моделирование влияния ингибиторов (нестероидные противовоспалительные препараты) на поток и уровень простагландинов в открытых системах, включающих постоянный приток фермента (простагландин-Н-синтаза, PGHS), инактивацию фермента в ходе катализируемой им реакции, деградацию фермента, превращение биологически активного продукта ферментативной реакции (простагландин, PG) в неактивные соединения, различные режимы подачи субстрата (арахионовая кислота, AA) и ингибиторов. В качестве ингибиторов рассматривали медленный обратимый ингибитор (индометацин) и медленный необратимый ингибитор (аспирин). Получены аналитические выражения для потоков и концентраций в нестационарном режиме и стационарном состоянии. Показано, что в стационарных состояниях системы зависимость потока PG и уровня PG описывается уравнением Михаэлиса–Ментен. Максимальный поток, максимальный уровень и величина наблюдаемой константы Михаэлиса зависят обратно пропорционально от константы скорости инактивации фермента в процессе реакции. Медленные ингибиторы PGHS в традиционных экспериментах в закрытых системах ведут себя как неконкурентные по отношению к AA, однако в стационарных потоках их поведение становится полностью конкурентным, поэтому присутствие ингибитора увеличивает амплитуду изменений уровня PG при изменении концентрации AA. Показано, что обратимый ингибитор (индометацин), в отличие от необратимого ингибитора (аспирин), в потоке проявляет себя как депо для активного фермента за счет образования фермент-ингибиторных комплексов. Возмущение системы при резком повышении концентрации индометацина приводит к двухфазному изменению уровня PG: после первоначального резкого снижения он постепенно повышается до нового стационарного состояния. Возмущение системы в присутствии индометацина при резком повышении концентрации AA приводит к высвобождению фермента из фермент-ингибиторных комплексов, и уровень PG на определенный период существенно увеличивается по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора. Результаты моделирования регуляции уровня простагландинов в различных состояниях открытой системы, несомненно, необходимо использовать при исследовании действия нестероидных противовоспалительных препаратов *in vivo*.

Ключевые слова: НПВП, простагландины, открытая система, потоки, стационарные состояния, нестационарные состояния, PGHS, инактивация фермента

DOI: 10.31857/S0132342321050286

ВВЕДЕНИЕ

Простагландины – группа физиологически активных веществ липидной природы. Они регулируют важнейшие физиологические процессы в организме млекопитающих, в частности выступают медиаторами воспаления [1]. Ключевую роль в

регуляции уровня простагландинов играет фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS; К.Ф. 1.14.99.1), известный также как циклооксигеназа (COX). Фермент катализирует две последовательные реакции – циклооксигеназную (окисление арахидоновой кислоты (AA) кислородом до проста-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342321050286 для авторизованных пользователей.

Сокращения: НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; AA – арахидоновая кислота; COX – циклооксигеназа; DEDTC – диэтилдитиокарбамат натрия; PG – простагландин; PGHS – простагландин-Н-синтаза.

Автор для связи: (тел.: +7 (967) 005-07-54; эл. почта: biocentr@list.ru).

гландин G_2 [2]) и пероксидазную (восстановление перекисной группы простагландина G_2 до спиртовой в присутствии донора электронов [3]). В результате образуется простагландин H_2 [4], который далее под действием специфических ферментов – конвертаз – превращается в другие физиологически активные соединения, такие как простагландины E_2 , D_2 , $F_{2\alpha}$, тромбоксан A_2 и простациклин [5–7]. PGHS характеризуется быстрой инактивацией в процессе катализируемых реакций [8–12]. Существуют различные изоформы фермента: PGHS-1 постоянно нарабатывается в клетках и способствует их нормальному функционированию [13], PGHS-2 синтезируется в ответ на определенные стимулы, такие как цитокины или факторы роста [14]. Действие нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), широко используемых в медицине, направлено на ингибирование PGHS [15–17].

Традиционные эксперименты *in vitro* по исследованию свойств ферментов проводятся в закрытых системах, не предполагающих приток фермента, субстратов и других участников реакции. Однако организм представляет собой открытую систему, где происходят синтез и деградация фермента, а приток субстрата может регулироваться различными внешними по отношению к ферменту факторами. Кинетические характеристики закрытых систем могут совершенно не соответствовать кинетическому поведению открытых систем и, соответственно, систем *in vivo*. Тем не менее встречается очень мало исследований ферментов в открытых системах. В работе Gabrielsson et al. [18] рассматривается теоретическая модель, учитывающая факторы синтеза и деградации фермента, а также притока субстрата. В работе Westley et al. [19] исследовали различные типы ингибирования с учетом постоянного притока субстрата. Кинетическое поведение ферментов, подвергающихся инактивации в процессе реакции и действию медленных ингибиторов, до настоящего времени в открытых системах исследовано не было.

Цель настоящего исследования – моделирование кинетического поведения участка синтеза простагландинов в открытой системе при наличии ингибиторов индометацина и аспирина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ингибиторов на поток образования и уровень простагландина в открытых системах, содержащих фермент PGHS, представляется целесообразным описать в рамках кинетического механизма, представленного на схеме 1.

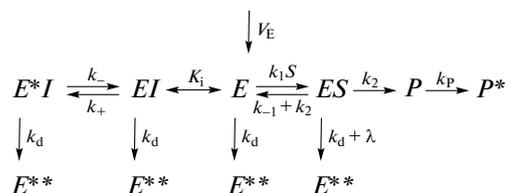


Схема 1. Общая схема преобразования фермента и продукта реакции в открытой системе. E – свободный фермент (PGHS); ES – комплекс фермента с субстратом (S – арахидоновая кислота, AA); EI и E^*I – комплексы фермента с ингибитором (I); E^{**} – инактивированная форма фермента; V_E – скорость синтеза (притока) фермента; k_1 , k_{-1} – константы скорости образования и диссоциации комплекса ES соответственно; k_2 – константа скорости образования продукта реакции; K_i – константа ингибирования для быстрой обратимой стадии взаимодействия фермента с ингибитором; k_+ и k_- – константы скорости для медленной стадии ингибирования; k_P – константа преобразования физиологически активного продукта (P) в неактивные соединения (P^*); λ – константа скорости инактивации фермент-субстратного комплекса в процессе реакции; k_d – константа скорости деградации фермента (принимается, что это значение одинаково для всех форм фермента).

Схема предполагает постоянный приток активного фермента и его деградацию, инактивацию фермента в процессе реакции, превращение физиологически активного продукта в неактивные соединения и присутствие ингибитора, работающего по двухстадийному механизму. Полагаем, что концентрация субстрата регулируется внешними по отношению к исследуемой системе факторами, и в первом приближении концентрации субстрата и ингибитора считаем постоянными за время наблюдения (за исключением оговоренных случаев резкого изменения концентрации субстрата или ингибитора).

В механизме реакции присутствуют как быстрые стадии (в ходе измерения или моделирования мы наблюдаем только конечный результат взаимодействия, а не динамику процесса во времени), так и медленные стадии (можно наблюдать динамику процесса во времени). К быстрым стадиям относятся взаимодействие фермента с субстратом и первая стадия взаимодействия с ингибитором, а к медленным стадиям – преобразование продукта, вторая стадия взаимодействия фермента с ингибитором, синтез (приток) фермента, деградация фермента и инактивация фермента в процессе реакции.

Основные характеристики и механизмы действия фермента и ингибиторов получены из традиционных кинетических экспериментов в закрытых системах.

Быстрая инактивация фермент-субстратного комплекса (ES) в процессе реакции приводит к тому, что ферментативное превращение арахидо-

новой кислоты (S) в продукты ферментативной реакции (P) в условиях малого расходования субстрата в стационарном режиме в закрытых системах описывается следующим уравнением (см. работу Vrzheschch et al. [8]):

$$[S]_0 - [S](t) = [P]_\infty(1 - \exp(-\Lambda t)), \quad (1)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, t – время протекания реакции, $[S](t)$ – текущая концентрация субстрата в момент времени t , $[P]_\infty$ – предельный выход продукта реакции (сумма концентраций P и продуктов его дальнейших превращений после полной инактивации фермента), $\Lambda = k_d + \lambda[S]/(K_m + [S])$ – наблюдаемая константа скорости инактивации фермента в процессе реакции, k_d – константа скорости деградации фермента, K_m – константа Михаэлиса для реакции ферментативного превращения арахидоновой кислоты.

Линейная зависимость начальной скорости (V_0) ферментативной реакции и предельного выхода продукта реакции от общей концентрации фермента в закрытых системах позволяет получить число оборотов фермента до полной его инактивации – π_∞ (количество молекул продукта на одну молекулу фермента за время его работы до полной инактивации в процессе реакции, безразмерная величина):

$$\pi_\infty = \frac{[P]_\infty}{[E]_0}, \quad (2)$$

где $[E]_0$ – общая концентрация фермента, добавляемого в реакционную систему.

В нашем случае с учетом $[P]_\infty = V_0/\Lambda$ (см. работу Vrzheschch et al. [8]) и михаэлисовой зависимости V_0 от $[S]$ ($V_0 = k_2 E_0 [S]/(K_m + S)$) получим:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda + k_d \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}. \quad (3)$$

Учитывая, что время наблюдения за реакцией в закрытой системе обычно лежит в пределах нескольких минут, и что эксперименты обычно проводятся при $[S] \sim K_m$, фактором деградации фермента можно пренебречь, и формула (3) упрощается:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda}, \quad (4)$$

что позволило нам определить из экспериментов в закрытых системах (см. “Эксперим. часть”) необходимые для моделирования в открытой системе значения K_m (6.35 мкМ), k_2 (60 с⁻¹), λ (0.084 с⁻¹) и π_∞ (714).

Наши кинетические эксперименты по ингибированию PGHS индометацином в закрытой системе (см. “Эксперим. часть”) подтвердили двухстадийную модель взаимодействия этого ин-

гибитора с ферментом, в которой быстрая и медленная стадии полностью обратимы. Получены значения констант ингибирования для быстрой стадии ($K_i = 27.7$ мкМ) и константы скорости для медленной стадии ($k_+ = 1.83$ с⁻¹, $k_- = 1.71 \times 10^{-3}$ с⁻¹).

В настоящей работе также моделировали действие необратимого ингибитора аспирина. Его характеристики, определенные в закрытых системах, взяли из работы Liu et al. [20]: константу ингибирования для быстрой обратимой стадии ($K_i = 4200$ мкМ) и константу скорости для медленной необратимой стадии ($k_+ = 0.0135$ с⁻¹) при 20°C.

Для моделирования также использовали значения констант скорости первого порядка для процессов деградации фермента ($k_d = 6.95 \times 10^{-5}$ с⁻¹) и распада физиологически активного продукта ($k_p = 2.31 \times 10^{-3}$ с⁻¹). Эти характеристики были оценены с учетом времени полужизни глутаматдекарбоксилазы *in vivo* (2.77 ч [21] – наиболее “короткоживущий” фермент из представленных в работах [21–27]) и времени полужизни простагландинов G_2 и H_2 (~5 мин, [28]).

Моделирование открытой системы (схема 1) осуществляли путем аналитического решения соответствующих систем дифференциальных уравнений (см. дополнительные материалы к публикации).

Указанная система всегда стремится к единственному устойчивому стационарному состоянию. Достигшая стационарного состояния система в результате возмущения (изменения концентрации субстрата или ингибитора) переходит в нестационарное (переходное) состояние, и со временем (при указанных характеристиках это часы – рис. 1–3) система всегда приближается к новому стационарному состоянию.

В стационарном состоянии поток продукта реакции (скорость накопления продукта реакции (V_{st})) оказался прямо пропорциональным потоку фермента (скорости синтеза фермента, V_E) с коэффициентом пропорциональности π_∞ , который определен в формуле (2):

$$V_{st} = \pi_\infty V_E. \quad (5)$$

В присутствии медленного ингибитора, действующего по двухстадийному механизму (схема 1), π_∞ определяется следующим выражением:

$$\pi_\infty = \frac{k_2}{\lambda + k_d \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{K_m [I]}{[S] K_i}\right) + \frac{k_+ k_d}{k_- + k_d} \frac{K_m [I]}{[S] K_i}}. \quad (6)$$

Зависимость стационарного потока от концентрации субстрата принимает форму уравнения Михаэлиса–Ментен:

$$V_{st} = \frac{V_{max}^*[S]}{K_m^* \left(1 + \frac{[I]}{K_i^*}\right) + [S]}, \quad V_{max}^* = \frac{k_2 V_E}{\lambda + k_d}, \quad (7)$$

$$K_m^* = K_m \frac{k_d}{\lambda + k_d}, \quad K_i^* = K_i \frac{k_- + k_d}{k_+ + k_- + k_d},$$

где V_{max}^* – наблюдаемое значение максимального потока продукта реакции, K_m^* – наблюдаемое значение константы Михаэлиса для потока продукта реакции, K_i^* – наблюдаемое значение константы ингибирования для потока продукта реакции.

Стационарный уровень продукта реакции (стационарная концентрация продукта реакции) прямо пропорционален его потоку:

$$[P]_{st} = \frac{V_{st}}{k_p}. \quad (8)$$

Поскольку $\lambda \gg k_d$, получаем, что наблюдаемые значения максимального потока (V_{max}^*) и константы Михаэлиса для потока продукта реакции (K_m^*) обратно пропорциональны значению константы скорости инактивации в процессе реакции. В частности, численное значение K_m^* для потока продукта реакции в случае открытой системы в рассматриваемом случае на 3 порядка меньше значения K_m , определяемого в закрытой системе. Это не означает, что в открытой системе для фермента поменялось значение K_m – оно осталось тем же, но кинетическое поведение продуцируемого ферментом потока продукта реакции определяется K_m^* , в выражение для которой, в свою очередь, входит значение K_m (7). Величины K_m и K_m^* имеют разный смысл, но их численные значения допустимо сравнивать во избежание недоразумений при интерпретации кинетического поведения фермента. Величина K_m^* (5.25×10^{-3} мкМ) говорит о том, что при концентрациях АА ~ 0.1 мкМ и выше поток простагландинов уже не зависит от концентрации АА (в обычных физиологических условиях концентрация АА *in vivo* составляет не более 0.1 мкМ, а возрастание концентрации до 1–10 мкМ и более – признак выраженного физиологического ответа организма [29]). Очевидно, использование численного значения K_m (6.35 мкМ) для интерпретации состояния фермента в организме будет приводить к недоразумениям.

В традиционных экспериментах по определению эффективности ингибиторов в закрытых системах медленные ингибиторы ведут себя как неконкурентные по отношению к АА [30]. Как видно из приведенных решений (7), в открытых

системах подобных эффектов не наблюдается: ингибиторы медленного действия в потоке проявляют себя как полностью конкурентные, причем это верно и для обратимых, и для необратимых ($k_- = 0$) ингибиторов.

Анализ уравнений (7) показывает, что наличие ингибитора в открытой системе увеличивает амплитуду изменения стационарного потока продукта реакции (и, соответственно, уровня продукта реакции) в ответ на изменение концентрации АА (табл. 1). Это может играть важную роль в сложных регуляторных процессах в организме.

Нестационарные (переходные) состояния после возмущения открытой системы весьма интересны и могут отражать процессы, реально протекающие *in vivo* (рис. 1–3). Рассматривали варианты возмущения системы, находящейся в стационарном состоянии, при изменении концентрации ингибитора (рис. 1) или концентрации субстрата (рис. 2, 3). Момент возмущения системы во всех случаях соответствовал $t = 0$.

Концентрации АА для моделирования были подобраны таким образом, чтобы они соответствовали различным состояниям организма: обычным физиологическим условиям (0.01 мкМ [29]), выраженному физиологическому ответу (10 мкМ [29]), патологическому состоянию (500 мкМ [31]). Концентрации ингибиторов для моделирования были подобраны согласно данным фармакологических исследований. При максимальной разовой дозе индометацина (100 мг перорально) его пиковая концентрация в плазме составляла ~ 8 мкг/мл (~ 20 мкМ), а при минимальной дозе (25 мг перорально) – в ~ 10 раз меньше (~ 2 мкМ) [32]. При низкой разовой дозе аспирина (100 мг перорально) пиковая концентрация в плазме составляла 2.2 мкг/мл (~ 10 мкМ), а при высокой (1500 мг перорально) – 21.1 мкг/мл (~ 100 мкМ) [33].

Рис. 1*a* иллюстрирует влияние ингибиторов на открытую систему при физиологической концен-

Таблица 1. Влияние наличия ингибиторов на амплитуду изменения уровня продукта реакции в стационарных состояниях открытой системы

Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкМ	$[P]_{AA=10}/[P]_{AA=0.01}$
Отсутствует	–	1.52
Индометацин	2	39
	20	282
Аспирин	10	1.77
	100	3.95

Примечание: $[P]_{AA=0.01}$ и $[P]_{AA=10}$ – уровни продукта реакции при концентрации арахидоновой кислоты (АА) 0.01 и 10 мкМ соответственно.

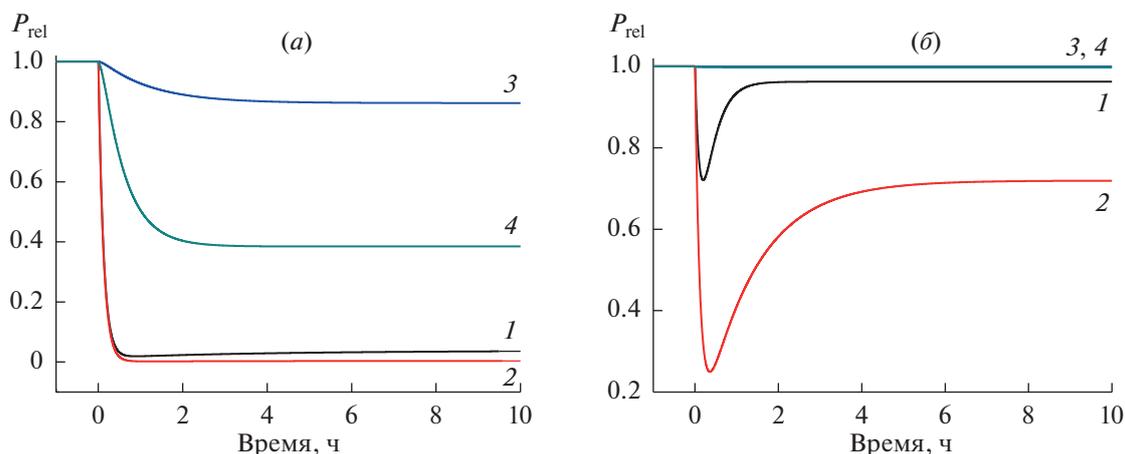


Рис. 1. Влияние изменения концентрации ингибитора на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе. Концентрация арахидоновой кислоты – 0.01 мкМ (а) и 10 мкМ (б). В момент времени $t = 0$ концентрация индометацина увеличилась с 0 до 2 мкМ (1), с 0 до 20 мкМ (2); концентрация аспирина увеличилась с 0 до 10 мкМ (3), с 0 до 100 мкМ (4). За единицу принят уровень продукта реакции до возмущения системы.

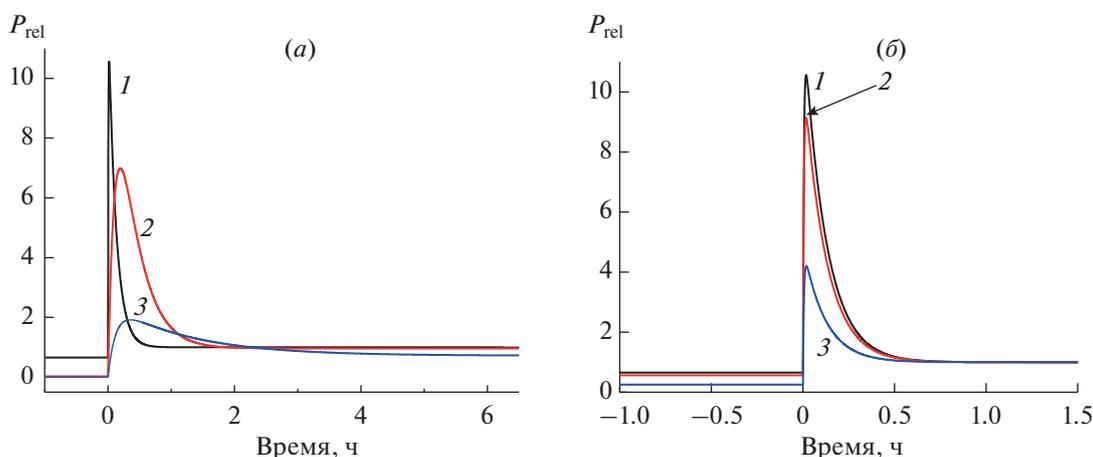


Рис. 2. Влияние изменения концентрации субстрата на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе – эффект индометацина (а) и аспирина (б). Начальная концентрация арахидоновой кислоты – 0.01 мкМ, а в момент времени $t = 0$ она увеличилась до 10 мкМ. Концентрация индометацина равна 0 мкМ (1), 2 мкМ (2), 20 мкМ (3); концентрация аспирина – 0 мкМ (1), 10 мкМ (2), 100 мкМ (3). За единицу принят максимальный стационарный уровень продукта реакции (формулы (7), (8)) (при $[S] \rightarrow \infty$ и в отсутствие ингибитора).

трации АА. Новое стационарное состояние в случае индометацина достигается значительно быстрее, чем в случае аспирина. Это обусловлено разными значениями k_+ (1.83 с⁻¹ для индометацина, 0.0135 с⁻¹ для аспирина). При 2 мкМ индометацина (кривая 1) заметен двухфазный характер возмущения открытой системы под действием обратимого ингибитора: после достижения максимального ингибирования уровень продукта реакции повышается и достигает нового стационарного значения (соответствующее точное решение приведено в дополнительных материалах). Двухфазность обусловлена обратимостью медленной стадии ингибирования: возникающий

после возмущения дополнительный поток расхода E , обусловленный формированием E^*I , исчезает после достижения стационарной концентрации E^*I .

Аспирин в выбранных концентрациях также уменьшает уровень продукта реакции, но в существенно меньшей степени. Это обусловлено различными значениями k_+ , а также тем, что значение K_i для аспирина гораздо выше, чем для индометацина (4200 и 27.7 мкМ соответственно). В случае аспирина двухфазности не наблюдается. Это следствие необратимости данного ингибитора (см. табл. 2 в дополнительных материалах).

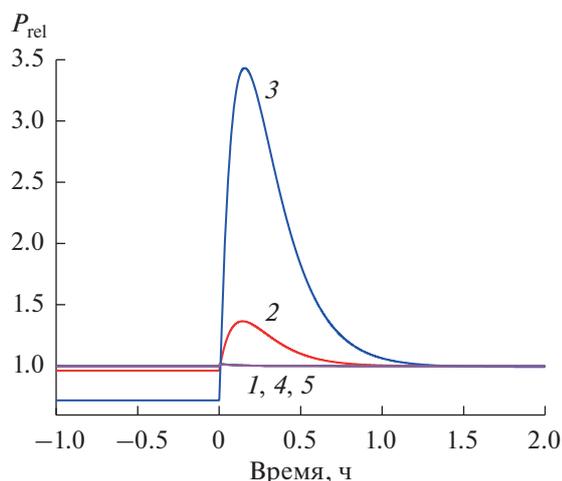


Рис. 3. Влияние изменения концентрации субстрата на относительный уровень продукта реакции (P_{rel}) в открытой системе. Начальная концентрация арахидоновой кислоты — 10 мкМ, в момент времени $t = 0$ она увеличилась до 500 мкМ. Концентрация индометацина — 0 мкМ (1), 2 мкМ (2), 20 мкМ (3); концентрация аспирина — 0 мкМ (1), 10 мкМ (4), 100 мкМ (5). За единицу принят максимальный стационарный уровень продукта реакции (формулы (7), (8)) (при $[S] \rightarrow \infty$ и в отсутствие ингибитора).

При повышении концентрации АА с 0.01 мкМ (рис. 1а) до 10 мкМ (рис. 1б) влияние ингибиторов на открытую систему существенно уменьшается — это следствие конкурентного характера ингибирования фермента в потоке (7). Для индометацина при 10 мкМ АА двухфазность выражена гораздо сильнее, чем при 0.01 мкМ АА, а для аспирина эффект ингибирования при повышенной концентрации субстрата практически отсутствует. При АА = 500 мкМ эффект ингибирования отсутствует и для индометацина, и для аспирина (данные не приведены).

Важная характеристика открытой системы — ее реакция на изменение концентрации субстрата. Уровень арахидоновой кислоты регулируется многими внешними по отношению к простагландиновому участку системами [34]. Повышение концентрации АА — своеобразный “маркер” протекания многих процессов, таких как воспаление [29].

При быстром повышении концентрации АА с физиологического уровня (0.01 мкМ) на 3 порядка (рис. 2) в отсутствие ингибитора наблюдается взрывной рост уровня продукта. Это обусловлено тем, что начальная концентрация АА сравнима с K_m^* (7), и существенная доля молекул активного фермента при этих концентрациях не связана с субстратом. При увеличении концентрации АА на 3 порядка практически весь активный фермент связывается с субстратом, что приводит к быстро-

му повышению концентрации ES и, соответственно, повышению уровня продукта. В дальнейшем вследствие инактивации фермента в процессе реакции концентрация ES и, соответственно, уровень продукта снижаются до нового стационарного состояния.

Если же в открытой системе присутствует обратимый ингибитор индометацин (рис. 2а), картина меняется. В начальной фазе не наблюдается взрывного роста уровня продукта. Это обусловлено тем, что в стационарном состоянии значительная часть фермента связана с ингибитором и не может мгновенно катализировать реакцию при повышении уровня субстрата. Однако через несколько минут после возмущения системы уровень продукта реакции в присутствии 2 мкМ индометацина становится выше, чем в отсутствие ингибитора, и этот эффект наблюдается в течение ~1.5 ч (для 20 мкМ индометацина он менее выражен). Этот на первый взгляд парадоксальный факт объясняется тем, что при инкубации фермента с обратимым ингибитором накапливаются фермент-ингибиторные комплексы, и при существенном повышении концентрации субстрата фермент постепенно высвобождается из них, связываясь с субстратом, тем самым увеличивая поток продукта реакции. Таким образом, обратимый ингибитор ведет себя как “депо” для активного фермента. Для необратимого и гораздо более слабого ингибитора аспирина (рис. 2б) подобных эффектов не наблюдается.

Если моделировать ситуацию стремительного развития острого патологического процесса (рис. 3), в которой концентрация АА может достигать значений ~500 мкМ [31] (на рис. 3 предусмотрено возмущение открытой системы путем увеличения концентрации АА с 10 до 500 мкМ), то можно наблюдать следующее. В отсутствие ингибитора (кривая 1) уровень продукта реакции не изменяется в результате возмущения системы, потому что при 10 мкМ АА весь активный фермент уже связан с субстратом. Присутствие аспирина (кривые 4 и 5) не меняет картину. Однако в присутствии индометацина после возмущения системы уровень продукта реакции временно существенно повышается (это продолжается около часа, кривые 2 и 3), при этом эффект повышения более выражен при большей концентрации ингибитора, в отличие от рис. 2а. Это объясняется тем, что при таких высоких концентрациях субстрата индометацин практически не проявляет свои ингибирующие свойства из-за конкурентного характера ингибирования. Поэтому эффект “депо” для активного фермента здесь более выражен, чем при 10 мкМ АА (рис. 2а).

Особого внимания заслуживает зависимость константы Михаэлиса для стационарного потока (K_m^*) (7) от скорости инактивации фермента в процессе реакции. В отсутствие инактивации ($\lambda = 0$) K_m^* равна определяемой в закрытых системах константе Михаэлиса для стационарной ферментативной кинетики (K_m). Инактивация PGHS в процессе реакции обуславливает низкое потоковое значение K_m^* , вследствие чего поток PG в рассматриваемом случае перестает зависеть от AA уже при физиологических концентрациях ($10K_m^*$ соответствуют ~ 0.05 мкМ AA), и при патологическом возрастании концентрации AA увеличиваться не будет. Следует отметить, что для открытых систем наряду со стационарными значениями потоков и концентраций важно обращать внимание на нестационарные состояния – “всплески” уровня продукта реакции при изменении концентраций ингибитора и субстрата. Как видно из рис. 2а и 3, во время этих нестационарных состояний можно наблюдать кажущееся парадоксальным повышение уровня продукта реакции в присутствии обратимого ингибитора. Также может иметь значение отмеченное увеличение амплитуды изменения уровня продукта реакции в стационарных состояниях открытой системы в присутствии конкурентных ингибиторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Tween-20, Трис, EDTA, диэтилдитиокарбамат натрия (DEDTC) (MP Bio-medicals, Германия); индометацин, арахидоновую кислоту, ферроцианид калия, хлорид гемина, гидроксид натрия (Sigma-Aldrich, США); дитионит натрия, гидроксид калия (Panreac, Испания); пиридин (Merck, Германия); DMSO (ICN, Канада); соляную кислоту, этиловый спирт (Химмед, Россия).

Препарат фермента PGHS-1 получали из везикулярных желез барана согласно методике, опубликованной ранее [35], и хранили в специальном буферном растворе (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 0.5 мМ EDTA, 0.1 мМ DEDTC, 2 мкМ гемина, 0.1% (v/v) Tween-20) при -70°C [30]. Концентрация белка в полученном препарате составляла 0.5 мг/мл (измеряли бицинхониновым методом [36]).

Кинетические эксперименты. Во всех экспериментах по измерению циклооксигеназной активности фермента использовали буферный раствор А (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0) с добавлением 0.1% (v/v) Tween-20, 1 мМ ферроцианида калия и 2 мкМ гемина. Ферментативную реакцию проводили в закрытой термостатируемой стеклянной

ячейке с постоянным перемешиванием при 25°C . Объем реакционной смеси составлял 1.5 мл, объем добавляемого раствора фермента – 5–30 мкл.

Раствор арахидоновой кислоты (150 мМ) готовили в этиловом спирте и затем разбавляли буферным раствором А, содержащим эквивалент гидроксида калия, до 3.75 мМ; раствор ферроцианида калия (0.1 М) готовили в дистиллированной воде; раствор индометацина (5 мМ) готовили в смеси буферного раствора А и 15%-ного этилового спирта и затем разбавляли буферным раствором А до 0.03 мМ; раствор гемина (10 мМ) готовили в DMSO и разбавляли до 2 мМ буферным раствором А. Точную концентрацию гемина определяли спектрофотометрическим методом с использованием известных коэффициентов поглощения для восстановленного комплекса гемина с пиридином [37].

Эксперименты по взаимодействию фермента и ингибитора проводили согласно следующей схеме: в реакционную ячейку, содержащую буферный раствор А, Tween-20, ферроцианид калия и гемин, последовательно добавляли индометацин, фермент, а через определенный промежуток времени после добавления препарата фермента (время преинкубации) инициировали ферментативную реакцию субстратом (арахидоновой кислотой). В экспериментах, соответствующих нулевому времени преинкубации, изменяли порядок добавления арахидоновой кислоты и фермента.

Измерение параметров ферментативной реакции. Циклооксигеназную реакцию детектировали амперометрическим методом по изменению концентрации растворенного кислорода согласно ранее опубликованной методике [30]. Интегральные кривые (зависимости продукта реакции от времени) получали из исходных зависимостей концентрации кислорода от времени с учетом неферментативной реакции. Скорость неферментативной реакции определяли по линейной аппроксимации участка экспериментальной кривой перед инициацией реакции.

Для расчетов скорости реакции использовали аппроксимацию начального участка интегральной кривой. Диапазон аппроксимации начинался с $t = 1$ с (из-за фактора “мертвого времени” измерительной системы [30]) и составлял 5–15 с. Начальная скорость соответствует тангенсу угла наклона касательной к интегральной кривой при $t = 0$, определяемому из параметров аппроксимации.

Для расчета константы скорости инактивации фермента в процессе реакции использовали аппроксимацию первых 20–30 с интегральной кривой при 100 мкМ AA и отсутствии ингибитора по формуле (1).

Математическая обработка данных. Анализ экспериментальных данных и графическое представление теоретических зависимостей проводили с использованием пакета Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США).

Совместную аппроксимацию массива экспериментальных данных (зависимостей скорости от времени преинкубации и концентрации ингибитора при различных концентрациях субстрата) проводили с помощью пакета MatLab (MathWorks, США). Значения искомым величин определяли при минимальном значении суммы квадратов отклонений скоростей (*Sum*):

$$Sum = \sum_j (V_j^{\text{theor}} - V_j^{\text{exp}})^2, \quad (9)$$

где V_j^{exp} – экспериментально определенное значение относительной скорости (отношение скорости реакции к скорости в контрольной точке соответствующей экспериментальной серии, т.е. к скорости при 100 мкМ АА и при отсутствии ингибитора), V_j^{theor} – соответствующее теоретически рассчитанное значение относительной скорости, вычисляемое по формуле:

$$V_{\text{rel}} = \frac{[S](K_m + 100)}{\left(K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S] \right) \times 100} \times \left(1 - \frac{[I]}{K([I] + K_i) + [I]} \right) \times \left(1 - \exp \left(- \left(k_- + k_+ \frac{[I]}{[I] + K_i} \right) \tau \right) \right), \quad (10)$$

где $K = k_-/k_+$ – равновесная константа для медленной стадии ингибирования, τ – время преинкубации фермента с ингибитором до инициации реакции (также см. подпись к схеме 1).

Решение системы дифференциальных уравнений. Систему дифференциальных уравнений, соответствующую кинетической схеме 1, решали аналитически. Правильность полученных решений и графических иллюстраций подтверждали численными расчетами с использованием пакета MatLab (MathWorks, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что свойства потоков в открытых по ферменту системах синтеза простагландинов (при наличии медленных обратимых ингибиторов и с учетом необратимой инактивации фермента в процессе реакции) демонстрируют качественно иное кинетическое поведение по сравнению со свойствами стационарных процессов в соответствующих закрытых системах. Наиболее

значимый параметр, связывающий такие открытые и закрытые системы, – число оборотов фермента до полной его инактивации. Показано, что обратимые медленные ингибиторы в открытых системах могут выступать в роли депо для активного фермента, повышая на длительные периоды уровень простагландинов по сравнению с контролем в отсутствие ингибитора, а также могут существенно увеличивать амплитуду изменения уровня простагландинов в ответ на изменение концентрации арахидоновой кислоты. Эти свойства открытых систем синтеза простагландинов могут быть использованы при разработке стратегии применения нестероидных противовоспалительных препаратов для регуляции уровня и амплитуды модуляции уровня простагландинов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-01150а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ricciotti E., FitzGerald G.A. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. V. 31. P. 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
2. Hamberg M., Svensson J., Wakabayashi T., Samuelsson B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. P. 345–349. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.345>
3. Wu G., Vuletich J.L., Kulmacz R.J., Osawa Y., Tsai A.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 19879–19888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100628200>
4. Hamberg M., Samuelsson B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V. 70. P. 899–903. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.899>

5. *Samuelsson B., Goldyne M., Granström E., Hamberg M., Hammarström S., Malmsten C.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1978. V. 47. P. 997–1029.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.005025>
6. *Helliwell R.J., Adams L.F., Mitchell M.D.* // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2004. V. 70. P. 101–113.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.04.002>
7. *Watanabe K., Yoshida R., Shimizu T., Hayaishi O.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 7035–7041.
8. *Vrzheschch P.V., Batanova E.A., Mevkh A.T., Varfolomeev S.D., Gazaryan I.G., Thorneley R.N.* // *Biochem. J.* 2003. V. 372. P. 713–724.
<https://doi.org/10.1042/BJ20030043>
9. *Smith W.L., Lands W.E.* // *Biochemistry.* 1972. V. 11. P. 3276–3285.
<https://doi.org/10.1021/bi00767a024>
10. *Egan R.W., Paxton J., Kuehl F.A.* // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. P. 7329–7335.
11. *Мевх А.Т., Вржешч П.В., Швядас В.Ю.-К., Варфоломеев С.Д., Мяжкова Г.И., Якушева Л.А.* // *Биорг. химия.* 1981. Т. 7. С. 695–702. [*Mevkh A.T., Vrzheschch P.V., Svedas V.Y.-K., Varfolomeev S.D., Myagkova G.I., Yakusheva L.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1981. V. 7. P. 695–702.]
12. *Vrzheschch P.V., Tsaplina L.A., Sakharova I.S.* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2007. V. 72. P. 828–834.
<https://doi.org/10.1134/s0006297907080032>
13. *Yokoyama C., Tanabe T.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 165. P. 888–894.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(89\)80049-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(89)80049-x)
14. *Jones D.A., Carlton D.P., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M.* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 9049–9054.
15. *Vane J.R.* // *Nat. New Biol.* 1971. V. 231. P. 232–235.
<https://doi.org/10.1038/newbio231232a0>
16. *Smith W.L., Meade E.A., DeWitt D.L.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994. V. 714. P. 136–142.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb12037.x>
17. *Bacchi S., Palumbo P., Sponta A., Coppolino M.F.* // *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 2012. V. 11. P. 52–64.
<https://doi.org/10.2174/187152312803476255>
18. *Gabrielsson J., Peletier L.A.* // *AAPS J.* 2018. V. 20. P. 102.
<https://doi.org/10.1208/s12248-018-0256-z>
19. *Westley A.M., Westley J.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 5347–5352.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5347>
20. *Liu W., Poole E.M., Ulrich C.M., Kulmacz R.J.* // *Pharmacogenet. Genomics.* 2012. V. 22. P. 525–537.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835366f6>
21. *Schlosser M., Walschus U., Klötting I., Walther R.* // *Dis. Markers.* 2008. V. 24. P. 191–198.
<https://doi.org/10.1155/2008/961421>
22. *Pelkonen O., Turpeinen M., Hakola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H.* // *Arch. Toxicol.* 2008. V. 82. P. 667–715.
<https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
23. *Mathieson T., Franken H., Kosinski J., Kurzawa N., Zinn N., Sweetman G., Poedel D., Ratnu V.S., Schramm M., Becher I., Steidel M., Noh K.-M., Bergamini G., Beck M., Bantscheff M., Savitski M.M.* // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 689.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03106-1>
24. *Cohen L.D., Zuchman R., Sorokina O., Müller A., Dieterich D.C., Armstrong J.D., Ziv T., Ziv N.E.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e63191.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063191>
25. *Fowler J.S., Volkow N.D., Logan J., Wang G.J., MacGregor R.R., Schyler D., Wolf A.P., Pappas N., Alexoff D., Shea C.* // *Synapse.* 1994. V. 18. P. 86–93.
<https://doi.org/10.1002/syn.890180203>
26. *Yang J., Liao M., Shou M., Jamei M., Yeo K.R., Tucker G.T., Rostami-Hodjegan A.* // *Curr. Drug Metab.* 2008. V. 9. P. 384–394.
<https://doi.org/10.2174/138920008784746382>
27. *von Bahr C., Steiner E., Koike Y., Gabrielsson J.* // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1998. V. 64. P. 18–26.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(98\)90018-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(98)90018-2)
28. *Flower R.J.* // *Biochem. Soc. Trans.* 1978. V. 6. P. 713–714.
<https://doi.org/10.1042/bst0060713a>
29. *Brash A.R.* // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 107. P. 1339–1345.
<https://doi.org/10.1172/JCI13210>
30. *Filimonov I.S., Berzova A.P., Barkhatov V.I., Krivoshey A.V., Trushkin N.A., Vrzheschch P.V.* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2018. V. 83. P. 119–128.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918020049>
31. *Pompeia C., Lima T., Curi R.* // *Cell Biochem. Funct.* 2003. V. 21. P. 97–104.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1012>
32. *Alván G., Orme M., Bertilsson L., Ekstrand R., Palmér L.* // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975. V. 18. P. 364–373.
<https://doi.org/10.1002/cpt1975183364>
33. *Rosenkranz B., Frölich J.C.* // *Prostaglandins Leukot. Med.* 1985. V. 19. P. 289–300.
[https://doi.org/10.1016/0262-1746\(85\)90142-8](https://doi.org/10.1016/0262-1746(85)90142-8)
34. *Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G.-I., Inoue K., Kudo I.* // *Crit. Rev. Immunol.* 2017. V. 37. P. 127–195.
<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20>
35. *Ponomareva O.A., Trushkin N.A., Filimonov I.S., Krivoshey A.V., Barkhatov V.I., Mitrofanov S.I., Vrzheschch P.V.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858. P. 2199–2207.
<https://doi.org/10.1016/j.bbame.2016.06.013>
36. *Stoscheck C.M.* // *Methods Enzymol.* 1990. V. 182. P. 50–68.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-p](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-p)
37. *Falk J.E.* // *Porphyrins and Metalloporphyrins. Their General, Physical and Coordination Chemistry, and Laboratory Methods.* Amsterdam – London – New York: Elsevier Publ. Comp., 1964. P. 181.
<https://doi.org/10.1002/jobm.19640040512>

Simulation of the Level of Prostaglandins in Open Systems under the Action of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs

A. V. Krivoshey^{*, **}, A. A. Efremov^{**}, E. K. Matveishina^{**, ***},
V. V. Panova^{**}, and P. V. Vrzheshch^{*, **, #}

[#]Phone: +7 (967) 005-07-54; e-mail: biocentr@list.ru

^{*}Lomonosov Moscow State University, International Biotechnological Center, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia

^{**}Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia

^{***}Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Leninskii prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia

Modeling of flow and level of prostaglandins in open systems under the action of prostaglandin H synthase (PGHS) inhibitors nonsteroidal anti-inflammatory drugs was carried out. These open systems included a steady PGHS input, fast inactivation of PGHS during the reaction, degradation of all PGHS forms, conversion of prostaglandin (PG) to biologically inactive substances, and various types of delivery of inhibitors and substrate (arachidonic acid, AA). A slow reversible inhibitor of PGHS (indomethacin) and a slow irreversible inhibitor of PGHS (aspirin) were considered as inhibitors. The explicit analytical expressions for flows and concentrations in steady state and transient mode were obtained. It was shown that in steady state the dependences of flow and level of PG on the concentration of AA are described by the Michaelis–Menten type equation. The values of the maximum flows, maximum levels, and Michaelis constant in these equations are inversely proportional to the constant of the inactivation of the enzyme during the reaction. In the closed systems, slow PGHS inhibitors are manifested as non-competitive with respect to AA, but in open systems, their behavior is fully competitive with respect to AA, so the presence of inhibitor increases the range of changes of PG level under the change of AA concentration. It was shown that the reversible inhibitor (indomethacin), in contrast to the irreversible inhibitor (aspirin) in transient mode manifest itself as the repository for active enzyme because of formation enzyme-inhibitory complexes. The system disturbance under the rapid increase of indomethacin concentration leads to the biphasic change of PG level: after the initial rapid decrease it increases gradually up to the new steady state. In the presence of indomethacin, the system disturbance under the rapid increase of AA concentration leads to the release of enzyme from enzyme-inhibitory complexes and PG level for a certain period significantly increases compared with the absence of inhibitor. The results of modeling the regulation of the level of prostaglandins in different states of the open systems undoubtedly need to be used in the studying of nonsteroidal anti-inflammatory drugs *in vivo*.

Keywords: NSAIDs, prostaglandins, open system, flows, steady states, transient modes, PGHS, enzyme inactivation