

Бейсембаева Р.У., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Бедарева Т.Е
ИММОБИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ ПРОСТАГЛАНДИНСИНТАЗНОЙ
БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК КРОВИ ОВЕЦ

Казахский Национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
E.mai:rbejsembaeva@mail.ru

Введение

Простагландины - молекулярные биорегуляторы, участвующие в регуляции физиологических процессов организма, обеспечивающих функционирование репродуктивной и иммунной систем, гистогенез костной ткани и т.д. Они способны изменять активность ферментов, влиять на синтез гормонов и корректировать их действие на различные органы и ткани. Дисбаланс в синтезе простагландинов приводит к развитию многих заболеваний [1].

За синтез простагландинов (PG) у человека и животных ответственна простагландинсинтазная биферментная система. Первый фермент системы, простагландин H-синтаза (PGH-синтаза), катализирует двухстадийное превращение арахидоновой кислоты в PGH₂. Вторым ферментом, PGH-конвертаза является органоспецифичным и конвертирует PGH₂ в простагландины, специфичные для каждой ткани [2].

Ферменты, ответственные в организме за синтез простагландинов, в условиях *in vitro* высоко лабильны, так PGH-синтаза инактивируется в процессе реакции, при 4⁰ в течение 24 часов. Это является основной проблемой, которая препятствует применению биферментной системы для получения простагландинов.

В данной работе проведено исследование по иммобилизации мембраносвязанной биферментной простагландинсинтазной системы клеток крови овец.

Материалы и методы исследования

Источником для выделения простагландинсинтазной биферментной системы служили клетки периферической крови овец.

Выделение простагландинсинтазной системы клеток крови проводили по методу, описанному в [2]. Ферментный препарат получали в виде мембраносвязанной биферментной системы.

Определение активности PGH-синтазы

Циклооксигеназную активность мембраносвязанной PGH-синтазы определяли биосинтетическим методом в условиях, при которых PGH₂ превращается в PGE₂ путем химической изомеризации [3].

Реакционную смесь объемом 2,5 мл (0,1 М трис-HCl буфер pH 7,8-8,2, 37°C), содержащую 1,7 мг белка мембранной фракции, 0,25 ммоль адреналина, 2 мкмоль гемина, 1 ммоль арахидоновой кислоты инкубировали в течение 30 минут в условиях постоянного перемешивания, затем реакцию останавливали внесением 0,1 н HCl до pH 3,5. Образовавшийся в ходе реакции PGE₂ экстрагировали 4 мл этилацетата, экстракты сушили с использованием Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растворяли в 2 мл этилового спирта, к раствору добавляли спиртовой раствор 2 н KOH и выдерживали 30 минут при 37°C для щелочной изомеризации лабильного PGE₂ в стабильный PGB₂. Затем измеряли поглощение раствора при λ=278 нм и рассчитывали количество PGB₂, принимая ε=23000 М⁻¹см⁻¹. Удельную суммарную активность PGH-синтазы выражали в виде количества PGB₂ (мкг), синтезированного 1 мг белка мембранной фракции за 30 мин.

Пероксидазную активность PGH-синтазы измеряли спектрофотометрическим методом и выражали в виде количества окисленной формы гваякола (тетрагваякола), образованного 1 мг белка мембранной фракции за 30 минут [2].

Иммобилизация мембраносвязанной простагландинсинтазной биферментной системы клеток крови овец. Иммобилизацию мембраносвязанной биферментной системы клеток крови проводили по методике, разработанной для солубилизированной PGH-синтазы везикулярных желез барана [3].

Результаты и их обсуждение

Для иммобилизации мембраносвязанной биферментной системы аликвоту ферментного препарата (1 мг по белку) в 50 мл 0,1 М трис-НС1 буфера, рН 8,2 инкубировали с 1 г силикагеля содержащего 13% CaSO₄, в течение 30 минут при 4°C. Затем силикагель отделяли центрифугированием и измеряли циклооксигеназную и пероксидазную активности P_{GH}-синтазы иммобилизованной мембраносвязанной биферментной системы. Циклооксигеназная активность P_{GH}-синтазы в составе иммобилизованной биферментной системы в среднем равна 16,3±1,1 мкг P_{GB}₂ на 1 мг белка за 30 минут, пероксидазная активность - 1,95±0,15 мкмоль тетрагваякола на 1 мг белка за 30 минут. В контроле циклооксигеназная и пероксидазная активности P_{GH}-синтазы в составе мембраносвязанного биферментного препарата, составили 21,7±1,4 мкг P_{GB}₂ на 1 мг белка за 30 минут и 1,95±0,15 мкмоль тетрагваякола на 1 мг белка за 30 минут, соответственно.

Понижение активности P_{GH}-синтазы может быть связано с десорбцией белка в силикагеле и с неоптимальными условиями иммобилизации.

Для определения прочности связывания мембраносвязанной простагландинсинтазной системы с силикагелем ферментный препарат (1 мг белка на 1 г силикагеля) суспендировали в 3 мл 0,1 М трис-НС1 буфера рН 8,2, затем осаждали центрифугированием (2000 об/мин, 10 минут, 25°C). Супернатант анализировали на содержание белка. Такую операцию повторяли 3 раза. Во всех супернатантах белок отсутствовал. Параллельно после каждого промывания определяли количество белка, связанного с силикагелем. Иммобилизованную мембранную фракцию для солиubilизации белка суспендировали в 3 мл 1 М раствора КОН и нагревали в течение 5 минут на водяной бане. Количество белка, перешедшего в раствор, определяли колориметрическим методом с реактивом Бенедикта. Во всех препаратах изменения количества связанного с силикагелем белка после промывания не происходило. Следовательно, десорбции белка с силикагеля не происходит.

Далее исследовали влияние условий среды иммобилизации на активность P_{GH}-синтазы, иммобилизованной мембраносвязанной простагландинсинтазной системой.

Первоначально исследовали зависимость циклооксигеназной активности P_{GH}-синтазы от концентрации белка в среде при иммобилизации. Иммобилизацию 1 мг по белку мембраносвязанного ферментного препарата на 1 г силикагеля проводили при 0,005-0,04 мг белка на мл реакционного раствора (0,1 М трис-НС1 буфер рН 8,2, 4°C, 30 минут). Ферментные препараты исследовали на циклооксигеназную активность P_{GH}-синтазы (таблица 1).

Для установления оптимального количества белка исследовали зависимость циклооксигеназной активности P_{GH}-синтазы иммобилизованных препаратов от общего количества белка в среде. На 1г силикагеля иммобилизовали 0,25-2,0 мг белка, во всех опытах концентрация белка была равна 0,02 мг/мл.

Циклооксигеназную активность иммобилизованных препаратов оценивали по выходу P_{GB}₂. Полученные результаты представлены в таблице 2.

На следующем этапе исследовали зависимость циклооксигеназной и пероксидазной активности P_{GH}-синтазы иммобилизованной биферментной системы от значения рН среды при иммобилизации. Мембраносвязанную биферментную простагландинсинтазную систему сорбировали на силикагель при следующих значениях рН 0,1 М Трис-НС1-буфера - 7,0; 7,4; 7,8; 8,2; 8,6; 9,0. Затем определяли активности иммобилизованных ферментных препаратов. Максимальную циклооксигеназную и пероксидазную активности проявляла P_{GH}-синтаза мембраносвязанного биферментного препарата, иммобилизованного при рН 7,8-8,6. При уменьшении или увеличении значения рН среды активность P_{GH}-синтазы снижалась на 15-100% (рис.1).

Ранее нами было установлено, что присутствие в среде иммобилизации донора электронов приводит к получению иммобилизованной P_{GH}-синтазы с более высокой активностью. В связи с этим иммобилизацию мембраносвязанной простагландинсинтазной системы провели в присутствии адреналина (0,66 ммоль на 1 мг белка). Ферментные

препараты, иммобилизованные в присутствии адреналина, проявляли суммарную PGH-синтазную активность, в среднем равную $19,8 \pm 1,2$ мкг PGB₂ на 1 мг белка за 30 минут. Это составляет 91-93% от активности контрольного препарата ($21,7 \pm 1,4$ мкг PGB₂ на 1 мг белка за 30 минут). Контролем служил не иммобилизованный ферментный препарат.

Таблица 1 - Циклооксигеназная активность мембраносвязанной PGH-синтазы, иммобилизованной при разных концентрациях белка, n=6

Концентрация белка в иммобилизационной смеси, мг/мл	Общее количество белка, мг	Количество 0,1 М трис-НС1 буфера, мл (общий объем)	Выход PGB ₂ , мкг за 30 минут
0,005	1,0	200	$12,3 \pm 1,3$
0,01	1,0	100	$13,9 \pm 1,5$
0,02	1,0	50	$16,7 \pm 1,3$
0,04	1,0	25	$16,3 \pm 1,4$

Таблица 2 - Циклооксигеназная активность PGH-синтазы мембранной фракции, иммобилизованной при разных количествах белка, n=6

Общее количество белка, мг	Концентрация белка в среде при иммобилизации, мг /мл	Количество 0,1 М трис-НС1 буфера, мл	Выход PGB ₂ , мкг за 30 минут
0,25	0,02	12,5	$5,1 \pm 1,4$
0,5	0,02	25	$8,9 \pm 1,2$
1	0,02	50	$16,7 \pm 1,3$
1,5	0,02	75	$9,4 \pm 1,3$
2,0	0,02	100	$5,3 \pm 1,2$

Т.А. Зацерковной был предложен математический метод расчета параметров иммобилизационной среды, позволяющий без дополнительных исследований определять оптимальные условия получения разного количества иммобилизованной микросомальной PGH-синтазы везикулярных желез [4]. Данный метод с небольшими модификациями был использован нами для определения условий иммобилизации мембраносвязанной биферментной системы клеток крови овец.

При иммобилизации мембраносвязанной простагландинсинтазной системы учитывалось соотношение количества белка и носителя, концентрация белка. Для создания оптимальной концентрации белка в среде при иммобилизации определенного количества мембраносвязанного белка определяли объем иммобилизационной среды. В таблице 3 приведены формулы расчета указанных параметров.

Далее провели иммобилизацию мембраносвязанной биферментной системы на 1, 2 и 3 г силикагеля. Расчетным путем установили, что для 1 г силикагеля необходимо суспендировать 1 мг мембраносвязанного белка в 50 мл 0,1 М трис-НС1 буфера, pH 8,2, для 2 и 3 г силикагеля – 2 и 3 мг белка в 100 и 150 мл 0,1 М трис-НС1 буфера, соответственно. В оптимальных условиях провели иммобилизацию 1, 2 и 3 мг белка мембраносвязанной биферментной системы клеток крови на силикагель. PGH-синтазная активность всех иммобилизованных препаратов составила 75-77% от исходной. Далее каждый из полученных иммобилизованных препаратов использовали в качестве катализатора в трех последовательных циклах биосинтеза простагландинов (табл. 4). Активность PGH-синтазы оценивали по выходу конечного продукта - PGB₂.

Таблица 3 – Параметры оптимальных условий иммобилизации мембраносвязанной биферментной системы

Название параметра	Математическое выражение
Количество мембраносвязанного белка для иммобилизации (W_m) на определенное количество силикагеля (W_s), мг	$W_m=1,0 * W_s^*$
Объем иммобилизационной смеси (V_i), мл	$V_i=50*W_s$
Примечание - W_s - масса силикагеля, г.	

Из данных таблицы 4 видно, что активность PGH-синтазы прямо коррелирует с количеством связанного с силикагелем белка. Общий выход

Таблица 4 - Активности PGH-синтазы в составе иммобилизованной мембраносвязанной простагландинсинтазной системы в трех последовательных циклах реакции (n=5)

Количество силикагеля (г)	Активность PGH-синтазы иммобилизованной мембранной фракции (мкг PGB ₂ на 1 мг белка за 30 минут)			Суммарный выход PGB ₂ (мкг)
	Цикл реакции:			
	1	2	3	
1	17,4±1,1	17,4±1,1	17,3±1,2	52,2±1,1
2	35,7±1,2	34,6±1,2	34,6±1,2	104,9±1,2
3	52,3±1,1	52,2±1,2	52,2±1,2	156,7±1,2

PGB₂ для препаратов, иммобилизованных на 1 г силикагеля, после трех циклов реакции составляет 52,2 мкг, на 2 г – 104,9 мкг и на 3 г – 156,7 мкг, т.е. выход простагландинов коррелирует с количеством мембраносвязанного белка рассчитанным на основе выведенных формул.

Из данных таблицы видно, что PGH-синтаза в составе иммобилизованной биферментной системы сохраняет исходную активность и в третьем цикле реакции. Это может быть обусловлено тем, что иммобилизация стабилизирует PGH-синтазу.

Таким образом, определены условия иммобилизации мембраносвязанной биферментной простагландин-синтазной системы клеток крови овец, оптимальные для PGH-синтазы. Установлено, что иммобилизация позволяет получать биферментные препараты со стабильной PGH-синтазой.

Литература

1. Варфоломеев С.Д. Простагландины - новый тип биологических регуляторов // Соровский образовательный журнал. - 1996. - Т. 61. - С. 723-735.
2. Бейсембаева Р.У., Бедарева Т.Е., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Исследование каталитических свойств PGH-синтазы простагландинсинтазной системы клеток крови и мышц овец // Вестник КазНУ. Сер. биол. – 2010 - №1(43). - С. 18-23.
3. Beisembaeva R.U., Zatserkovnaya T.A., Kuznetsova Yu.A., Mevkh A.T. Prostaglandin H Synthase Immobilized on Silica Gel: Stability and Activity. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 1999. V.25. No 3. pp 156-160.

Түйін

Қой қан клетка жарғақшасымен байланысқан простагландинсинтаза биферменттік жүйені иммобилдеу әдіс жасалған. PGH-синтазаға байланысты иммобилдеу оптималды жағдайы анықталынған. Иммобилденген биферментті препараты бірзділікпен жүргізетін үш реакцияда пайдаланғанда құрамына кіретін PGH-синтазаның белсенділігі өзгермейді.

Summary

A method for immobilization of membrane-bounded bi-enzyme prostaglandine-synthase system of the blood cells of sheep has been worked out. Also the optimal conditions for PGH-synthase determined. Immobilized bi-enzyme preparation showed 75-77% of PGH-synthase activity, which did not change after three cycles of reaction.