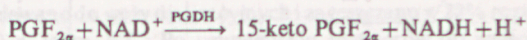


Marta KANKOFER, Janusz WIERCIŃSKI,
Witold KĘDZIERSKI

**Badania nad właściwościami fizyczno-chemicznymi dehydrogenazy
15-hydroksyprostaglandynowej z łożyska krów**

Studies on Physico-Chemical Properties of 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase from Bovine Placenta

Dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa (PGDH, EC1.1.1.141) jest kluczowym enzymem biologicznej degradacji prostaglandyn. Przeprowadza aktywną prostaglandynę $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) w nieaktywną pochodną 15-keto.



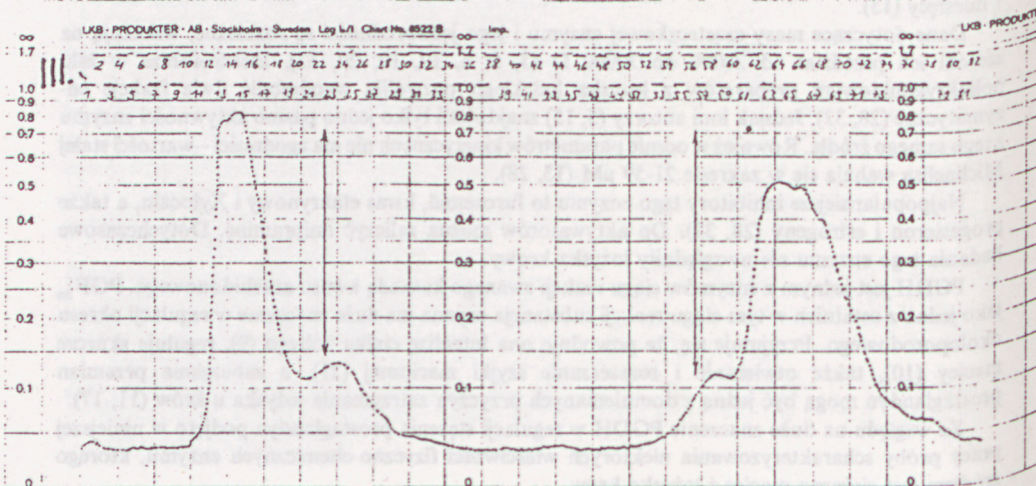
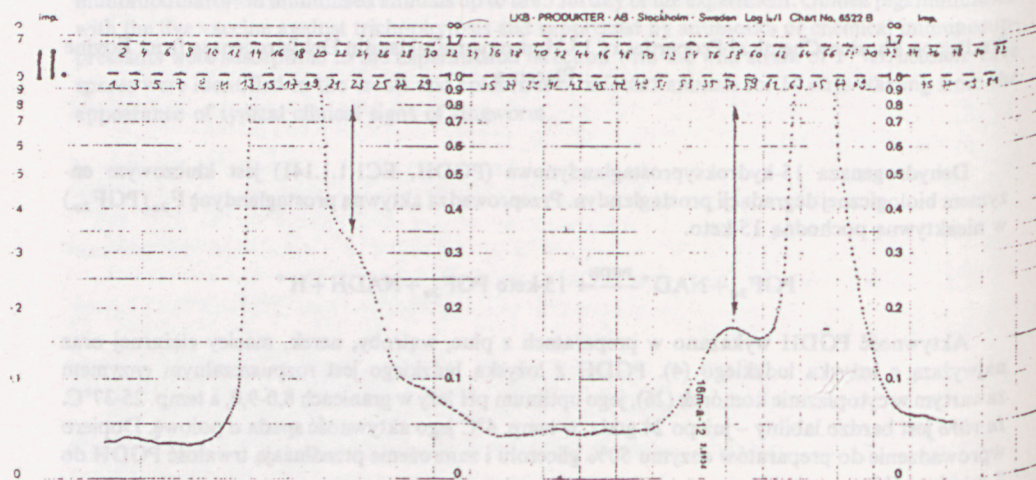
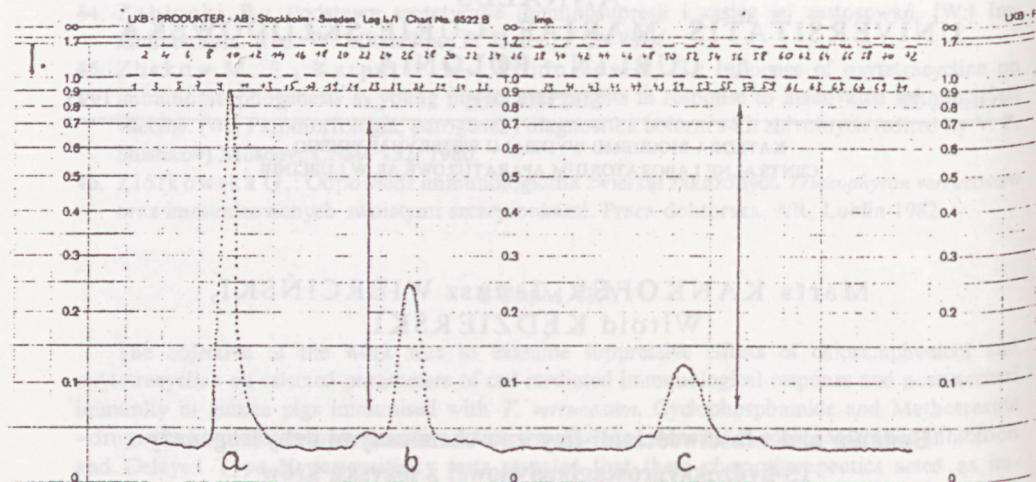
Aktywność PGDH wykazano w preparatach z płuc, wątroby, nerek, macicy ciężarnej oraz najwyższą z łożyska ludzkiego (4). PGDH z łożyska ludzkiego jest rozpuszczalnym enzymem zawartym w cytoplazmie komórek (26), jego optimum pH leży w granicach 8,0-9,0, a temp. 25-37°C. *In vitro* jest bardzo labilny – już po 24 godz. w temp. 4°C jego aktywność spada o połowę. Dopiero wprowadzenie do preparatów enzymu 50% glicerolu i zamrożenie przedłużają trwałość PGDH do 7 miesięcy (13).

Dane dotyczące masy cząsteczkowej enzymu i jego jednorodności są rozbieżne, wskazują na szeroki ich przedział od 20000 do 70000 D (3, 5, 6, 12, 19, 20, 32). Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym preparatów z łożyska ludzkiego pozwoliła wyodrębnić dwie frakcje enzymatyczne (28, 32). Jednak inni autorzy (5, 15) znajdowali tylko jedno pasmo aktywności enzymu z tego samego źródła. Również w ocenie parametrów kinetycznych nie ma zgodności – wartości stałej Michaelisa wahają się w zakresie 21-59 μM (13, 28).

Najpopularniejsze inhibitory tego enzymu to furosemid, kwas etakrynowy i Xylocain, a także progesteron i estrogeny (28, 32). Do aktywatorów można zaliczyć imipraminę. Dotychczasowe badania tego enzymu nie uwzględniły łożyska krowy.

PGDH jest jednym z enzymów ciągu reakcji zwanego kaskadą kwasu arachidonowego. $PGF_{2\alpha}$ jako jedna z ostatnich w tym ciągu reakcji substancja czynna ma duże znaczenie w regulacji okresu okołoporodowego. Przyjmuje się, że powoduje ona luteolizę ciała żółtego (9), reguluje skurcze macicy (10), także otwieranie i rozszerzanie szyjki macicznej (21), a zaburzenia przemian prostaglandyn mogą być jedną z domniemanych przyczyn zatrzymania łożyska u krów (11, 17).

Ze względu na duże znaczenie PGDH w regulacji stężenia prostaglandyn podjęto w niniejszej pracy próby scharakteryzowania niektórych właściwości fizyczno-chemicznych enzymu, którego źródłem jest ciężarna macica i łożysko krów.



MATERIAŁ I METODY

Badania właściwości fizyczno-chemicznych PGDH przeprowadzono w łożyszczach (brodawki maciczne i kosmki kosmówki) krów rasy ncb po porodzie spontanicznym. Pobrane natychmiast po porodzie na łód próbki tkanek przemywano zimną wodą destylowaną i przechowywano w ciekłym azocie do czasu oznaczeń. Wszystkie czynności preparacyjne przeprowadzano w temp. 4°C.

Porcje 3 g części macicznej i płodowej łożyska homogenizowano z 2 objętościami buforu (20% glicerol (Merck), 5 mmol/dm³ fosforan potasu (Merck), 1 mmol/dm³ EDTA (Merck), pH 7,0) przy użyciu homogenizatora Ultraturrax T 25 (Ikawerk, Janke i Kunkel Inc, Staufen, Germany) przy prędkości około 8000 obr/min. Homogenat wirowano przy 10 000 × g przez 45 min. i osad odrzucano. Supernatant uzyskany po wirowaniu zadawano siarczanem amonu (Merck) w substancji (do 0,41 g/ml) przy ciągłym mieszaniu, pH doprowadzano do około 7,0 przy użyciu 3 mol/dm³ NH₄OH (Merck). Po 2 godz. roztwór wirowano przez 30 min. przy 10 000 × g. Supernatant odrzucano, a osad rozpuszczano w 25-30 ml buforu (50% glicerol (Merck), 5 mmol/dm³ fosforan potasu (Merck), 1 mmol/dm³ EDTA (Merck), pH 7,0) i poddawano dializie przez 24 godz. w środowisku buforu o podanym składzie.

Proces chromatografii sitowej preparatu otrzymanego po wysoleniu przeprowadzono z użyciem chromatografu niskociśnieniowego LKB wyposażonego w kolektor frakcji i kolumny K 26/100 (Pharmacia). Fazę stacjonarną kolumny stanowił żel Sephadex G-100 (Pharmacia) zrównoważony buforem stosowanym przy homogenizacji.

Warunki rozdziału: wysokość złoża 80 cm, szybkość przepływu 1 cm³/min, objętość frakcji 5 ml, temp. 4°C, detektor UV 280 nm. Fazę ruchomą stanowił bufor. Kolumnę wykalibrowano przy użyciu błękitu dekstranowego 2000 (Pharmacia) i standardów białkowych o znanych masach cząsteczkowych (zestaw Serva – albumina bydłęca, albumina jaja, inhibitor tripsyny, cytochrom).

Z oczyszczanych na kolumnie preparatów PGDH zbierano frakcje białkowe charakteryzujące się przedziałem masy cząsteczkowej od 12 000 D do 80 000 D (od numeru 23 do numeru 56 – ryc. 1). Frakcje łączono, przelewano do węży dializacyjnych i zagęszczano w 22% roztworze poliwinylpyrrolidonu K 15 (Fluka) w temp. 4°C. Po uzupełnieniu roztworów do wyjściowej objętości (3 ml) oznaczano zawartość białka metodą Lowry i aktywność enzymatyczną (14). Tak oczyszczone preparaty enzymatyczne używano do dalszych badań.

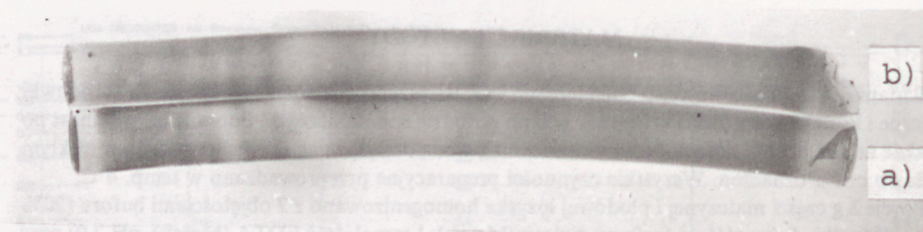
OZNACZANIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH PGDH

Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu – wyznaczenie stałej Michaelisa (K_m) i szybkości maksymalnej (V_{max}) badano przy użyciu mieszaniny reagującej zawierającej w całkowitej objętości 3 ml : 290 μmol TRIS-HCl pH 9,0; 1,36 μmoli NAD; 0,5 ml preparatu enzymu i wodę destylowaną oraz PGF_{2α} we wzrastających stężeniach od 0,005 do 0,5 μmol w 11 próbach. Czas trwania reakcji 5 min., temp. 25°C. Próba kontrolna nie zawierała PGF_{2α}, poza tym była identyczna z próbą badaną. Reakcja katalizowana przez PGDH inicjowana była poprzez dodanie preparatu enzymu, a wytwarzany NADH był określany spektrofotometrycznie (Specord M-40, Carl Zeiss, Jena) poprzez zmianę absorbancji przy długości fali 340 nm (14). Jedna jednostka aktywności enzymatycznej była definiowana jako aktywność, która katalizuje przemianę 1 mola NADH w ciągu 1 sek. w warunkach próby i wyrażana w katalach.

Ryc. 1. Wykresy frakcji białkowych uzyskane w procesie chromatografii sitowej: I – wzorców (a – błękit dekstranowy 2000, b – albumina bydłęca 67 000 D, c – cytochrom C 12 400 D),

II – preparatów brodawek macicznych, III – preparatów kosmków kosmówki

Elution diagrams of protein fractions in gel chromatography obtained with: I – protein standards (a – blue dextran 2,000, b – bovine albuminum 67,000 D, c – cytochrome C 12,400 D), II – preparates of uterine caruncles, III – preparates of chorionic villi



Ryc. 2. Elektroforegramy rozdziału PGDH homogenatów łożyska: a – brodawek macicznych, b – kosmków kosmówki

Electrophotoregrams of PGDH from placental homogenates: a – uterine caruncles, b – chorionic villi

Następnie wykreślono zależność od odwrotności szybkości reakcji dla PGDH ($1/V$) od odwrotności stężenia substratu ($1/s$) i wyliczono K_m oraz V_{max} korzystając z modyfikacji Lineveavera-Burka.

Odpowiednio dobierając parametry układu inkubacyjnego wyznaczono krzywe zależności aktywności PGDH od czasu reakcji (1-15 min.) i ilości enzymu (0,1 -0,5 ml). Oznaczono także wpływ pH (6,5-10,0), temperatury (10-60°C) i różnych stężeń furosemidu, jako inhibitora kompetycyjnego dla PGDH na aktywność enzymu.

ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Elektroforeza była przeprowadzana według Davisa (7) i Ornsteina (24). Używano rurek szklanych o długości 9 cm i średnicy 0,5 cm oraz 9% żelu. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w środowisku buforu TRIS-glicyna o pH 7,6 przez 120 min. przy natężeniu prądu 2,5 mA na jedną rurkę.

Po elektroforezie frakcje wybarwiano na obecność białka roztworem o składzie: Commasie Blue – 0,5% roztwór w CH_3COOH – metanol – woda, zmieszanych w stosunkach objętościowych 5 : 14 : 56 oraz na obecność PGDH – reakcja enzymatyczna (25). Inkubacja trwała 1 godz. w 37°C i zachodziła w ciemności. Po inkubacji żele były utrwalane w 7% CH_3COOH i przechowywane w wodzie destylowanej.

WYZNACZANIE MAS CZĄSTECzkOWYCH ELEKTROFORETYCZNYCH FRAKCJI PGDH

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym była przeprowadzona jak wyżej z użyciem siarczanu dodecylo-sodowego (SDS). Próby przed rozdziałem inkubowano z 1% SDS i 1% 2-merkaptetanolem przez 1 godz. w temp. 37°C. Po rozdziale elektroforetycznym SDS był usuwany z żelu w 1% roztworze Tritonu X 100. Jako białek wzorcowych użyto zestawu Serva: ferrytyna (450000 D), katalaza (240000 D), albumina bydlęca (67000 D), albumina jaja (42700 D), inhibitor trypsyny (21200 D). Obliczono logarytmy mas cząsteczkowych poszczególnych białek wzorcowych i wykreślono zależności logarytmu masy cząsteczkowej od względnej ruchliwości elektroforetycznej białek wzorcowych. Przy użyciu tej krzywej wyznaczono masy cząsteczkowe frakcji elektroforetycznych PGDH.

WYNIKI

Oczyszczenie preparatów enzymatycznych z brodawek macicznych i kosmków kosmówki (tab. 1) przeprowadzono w dwóch etapach – poprzez wytrącenie siarczanem amonu oraz przy użyciu chromatografii sitowej (sączenie molekularne). Stopień oczyszczenia wynosił dla enzymu izolowanego z brodawek macicznych

Tab. 1. Oczyszczanie PGDH z brodawek macicznych i kosmków kosmówki
Purification of PGDH from uterine caruncles and chorionic villi

Etap oczyszczania	Aktywność nkat	Zawartość białka g	Aktywność właściwa nkat/g	Stopień oczyszczenia (krotność)
Homogenat	a 58,0 b 56,5	2,47 1,41	23,5 40,0	
Wytrącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	a 24,1 b 22,6	0,275 0,158	87,6 143,0	$3,7 \times$ $3,6 \times$
Chromatografia sitowa	a 11,6 b 10,3	0,046 0,022	252,2 468,2	$10,7 \times$ $11,7 \times$

a – wartości preparatów z brodawek macicznych; results of preparates from caruncles.

b – wartości preparatów z kosmków kosmówki; results of preparates from villi.

nych $10,7 \times$ i z kosmków kosmówki $11,7 \times$. Ze względu na trudności w zdobyciu odpowiedniej ilości materiału wyjściowego oraz dużą utratę aktywności enzymu rzędu około 80% dalsze oczyszczanie (chromatografia jonowymienna) nie przyniosło pożądanego efektu.

Wyniki oznaczeń zależności aktywności enzymatycznej od czasu reakcji i stężenia enzymu w preparatach brodawek macicznych i kosmków kosmówki badanych prób wykazały prostoliniowy przebieg reakcji enzymatycznej w czasie pierwszych 3 min. w używanych układach inkubacyjnych. Aktywność enzymatyczna była również wprost proporcjonalna do stężenia enzymu w badanym zakresie (0,1-0,5 ml enzymu). Spełniony zatem został wymóg nasycenia enzymu substratem.

Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wykreślono w układzie współrzędnych według Lineveavera-Burka, a punkty przecięcia się prostej z osią $1/s$ i $1/V$ pozwoliły na wyliczenie wartości stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej, które wynosiły odpowiednio $5,7 \times 10^{-6}$ mol/dm³ i 0,825 nmol/s. Badano również wpływ furosemidu jako specyficznego inhibitora kompetycyjnego dla PGDH. Stężenie, które całkowicie hamowało enzym, wynosiło 90 $\mu\text{mol/dm}^3$.

Wyniki oznaczeń wpływu pH i temperatury na aktywność enzymu wykazały, że optimum pH dla PGDH leży w granicach 8,0-9,0, a optimum temperatury 25-37°C.

Podczas rozdziału na żelach poliakrylamidowych prób homogenatów brodawek macicznych i kosmków kosmówki badanych krów uzyskano 5 frakcji elektroforetycznych o aktywności PGDH zarówno przy naniesieniu 50 μl , jak i 100 μl homogenatu (odpowiednio dla brodawki i łożyska: 0,66 mg i 1,17 mg – 1,33 mg i 2,35 mg).

Intensywność zabarwienia otrzymanych frakcji, na podstawie której można wnioskować o aktywności enzymu, była zgodna z wcześniejszymi wynikami

własnych oznaczeń biochemicznych. Porównując dwa badane źródła enzymu (brodawki maciczne i kosmki kosmówki) stwierdzono wyższą aktywność w kosmkach (część płodowa łożyska) niż w części macicznej (ryc. 2). Podczas rozdzielu elektroforetycznego homogenatów brodawek macicznych i kosmków kosmówki z zastosowaniem SDS uzyskano 4 frakcje odpowiadające czterem pierwszym frakcjom otrzymanym podczas rozdzielu bez SDS. Masa cząsteczkowa uzyskanych frakcji elektroforetycznych wahała się (licząc w kierunku wzrastającej ruchliwości elektroforetycznej) od 74200 D do 15900 D.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa, dając w wyniku swego działania nieaktywne biologicznie 15-keto-metabolity prostaglandyn, może regulować ich stężenie, a w konsekwencji wpływać na wiele procesów przebiegających w żywym organizmie i dlatego budzi zainteresowanie wielu badaczy. Dokładny mechanizm reakcji katalizowanej przez PGDH nie został jeszcze wyjaśniony.

Do tej pory otrzymano oczyszczone preparaty enzymu z płuc świń (1, 2), płuc bydła (22), płuc mała (30), nerek świń (23), serca kurcząt (16), serca psów (18) i łożyska ludzkiego (28, 29). Łožysko ludzkie wydaje się być jednym z bogatszych źródeł PGDH.

Thaler (32) oczyszczając 3000-5000-krotnie enzym z łożyska ludzkiego otrzymał 5-10 mg preparatu z 300 g materiału biologicznego, z aktywnością właściwą 41,7 nkat/mg białka. Oczyszczanie enzymu z płuc bydła dawało w wyniku gorszą wydajność około 45% przy 15-krotnym oczyszczeniu i aktywności właściwej 0,017 nkat/mg białka (2, 8).

Mimo prawie 30-letnich doświadczeń nie scharakteryzowano PGDH z łożyska bydła z uwagi na trudności w oczyszczaniu jej preparatów, labilność enzymu, a także niełatwy sposób gromadzenia materiału biologicznego (sezonowość porodów, duże koszty doświadczenia).

Wartości stałej Michaelisa PGDH izolowanej z łożyska ludzkiego, nerek oraz płuc bydła osiągają rząd wielkości od 10^{-6} mol/dm³ do 10^{-5} mol/dm³. W badaniach własnych uzyskano wartość stałej Michaelisa równą $5,7 \times 10^{-6}$ mol/dm³, a szybkość maksymalną 0,825 nmol/s.

Ze względu na brak danych dotyczących takich badań w łożysku krowy omówienie otrzymanych wyników można przeprowadzić jedynie pośrednio. Wartości K_m z płuc i łożyska bydła kształtują się na podobnym poziomie. Natomiast K_m dla PGDH izolowanego z łożyska ludzkiego jest dziesięciokrotnie wyższa niż enzymu pochodzącego z łożyska krowy. Mogłoby to sugerować większe powinowactwo do substratu enzymu z łożyska krowy.

Wartość optimum pH i temperatury uzyskane w badaniach własnych kształtują się na podobnym poziomie jak we wszystkich pracach dotyczących PGDH w różnych tkankach.

Próby liofilizacji przeprowadzone w celu zagęszczenia preparatów nie przyniosły oczekiwanego efektu, ponieważ enzym tracił aktywność w czasie tego procesu.

Według Paulsru da i wsp. (27) stała inhibitorowa (K_i) furosemidu w łożysku ludzkim wynosiła 75 mol/dm^3 , natomiast według Tai i Hollander (31) $62,5 \text{ mol/dm}^3$ dla furosemidu, 85 mol/dm^3 dla kwasu etakrynowego i 50 mol/dm^3 dla 50% niekompetycyjnej inhibicji Xylocain w tej samej tkance. W badaniach własnych najniższe stężenie furosemidu, które hamowało aktywność PGDH wynosiło $90 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$.

Badania nad modulatorami PGDH są niezmiernie ważne, ponieważ dają możliwość wpływania na aktywność enzymu, regulowania bezpośrednio stężenia prostaglandyn i uniknięcia inhibicji całej kaskady kwasu arachidonowego na poziomie fosfolipazy (glikokortykoidami) czy na poziomie cyklooksygenazy (niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi).

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym przeprowadzona w badaniach własnych pozwoliła wyróżnić 5 frakcji aktywności PGDH z błękitem p-nitrotetrazolinowym (NBT). Wszystkie obserwowane frakcje były podobne pod względem ruchliwości elektroforetycznej w preparatach zarówno brodawek macicznych, jak i kosmków kosmówki. Różniły się natomiast intensywnością zabarwienia, co potwierdza różną aktywność enzymu wykazaną badaniami biochemicznymi.

Wyniki badań elektroforetycznych (28, 29) materiału z łożyska ludzkiego wskazują na izoenzymatyczny charakter PGDH (potwierdzono obecność 2 frakcji enzymatycznych). Podobnie 2 aktywne frakcje obserwowano w preparatach z płuc świni (1) oraz płuc bydła (20).

Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym z SDS pozwolił wyodrębnić 4 frakcje dające reakcję z substratem oraz NBT i metylo-siarczanem N-metylo-dibenzopirazyny (PMS). Nieobecność piątej frakcji sugerowałaby niską masę cząsteczkową i dużą ruchliwość elektroforetyczną, a w związku z tym niemożność wykazania jej przy zachowaniu warunków elektroforezy podanych w metodach (czas i długość żelu) lub utratę aktywności tej frakcji w procesie rozdziału. Masa cząsteczkowa uzyskanych frakcji mieściła się w granicach 15900-74200 D. Odnosząc te wyniki do danych innych autorów można zauważyć, że mieszczą się one w podanych przez nich granicach.

Niezbędne wydają się dalsze doświadczenia charakteryzujące właściwości PGDH, a także możliwości jej regulacji hormonalnej w celu wyjaśnienia roli tego enzymu w poszczególnych jednostkach chorobowych z uwzględnieniem zatrzymania łożyska u krów jako jednego z ważniejszych ekonomicznych problemów rozrodu tych zwierząt.

WNIOSKI

1. Dehydrogenaza 15-hydroksyprostaglandynowa z łożyska bydła posiada frakcje enzymatyczne, których masa cząsteczkowa waha się od 74200 do 15900 D.

2. Wartości kinetyczne enzymu: stała Michaelisa i szybkość maksymalna dla $\text{PGF}_{2\alpha}$ – jako substratu – wynoszą odpowiednio $5,7 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ oraz 0,825 nmol/s, optimum pH 8,0-9,0, optimum temp. 25-37°C.

PIŚMIENNICTWO

1. Anggard E., Samuelsson B.: Purification and properties of a 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase from swine lung. *Arkiv fur Kemi.* **25**, 293, 1966.
2. Anggard E., Samuelsson B.: A Prostaglandin Dehydrogenase from Pig Lung, [w:] *Methods of Enzymology*, red. J.M. Lowenstein, t. 14, Academic Press, New York 1969.
3. Anggard E.: Studies on the analysis and metabolism of prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **180**, 200, 1971.
4. Behrman H. R., Caldwell B. V.: Prostaglandins, Thromboxanes and Leukotrienes, [w:] *Reproductive Endocrinology*, red. S. S. C. Yen, R. B. Jaffe, Saunders, Philadelphia 1986.
5. Braithwaite S. S., Jarabak J.: Human placental prostaglandin dehydrogenase: Purification and partial characterization. *Fed. Proc.* **33**, 1570, 1974.
6. Braithwaite S. S., Jarabak J.: Studies on a 15 hydroxyprostaglandin dehydrogenase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **250**, 2315, 1975.
7. Davis B. J.: Disc elektrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404, 1964.
8. Doelgast G. J., Fishman W. J.: A prostaglandin dehydrogenase from bovine lung – properties of enzyme. *Biochem. J.* **141**, 103, 1974.
9. Fairclough R. J., Hunter J. T., Welch R. A. S.: Peripheral plasma progesterone and utero-ovarian prostaglandin F concentrations in the cow around parturition. *Prostaglandins* **9**, 910, 1975.
10. Goldberg J. S., Ramvell P. W.: Role of prostaglandin in reproduction. *Phys. Rev.* **55**, 325, 1975.
11. Gross T. S., Williams W. F., Manspeaker G. S., Lewis G. S., Russek-Cohen E.: Bovine placental prostaglandin synthesis *in vitro* as it relates to placental separation. *Prostaglandins* **34**, 903, 1987.
12. Hansen H. S.: Inhibition by indomethacin and aspirin of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase *in vitro*. *Prostaglandins* **8**, 95, 1974.
13. Jarabak J.: Human placental 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 533, 1972.
14. Jarabak J.: Isolation and properties of an NAD^+ -dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase from human placenta. *Methods in Enzymol.* **86**, 126, 1982.
15. Jung A., Schlegel W., Jackisch R., Friedrich E. J., Wendel A., Ruckrich M. F.: 15-Hydroxyprostaglandin-dehydrogenase aus Humanplacenta, I. Isolierung und Charakterisierung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 787, 1975.
16. Lee S. C., Levine L.: Prostaglandin metabolism II. Identification of two 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase types. *J. Biol. Chem.* **250**, 548, 1975.

17. Leidl W., Hegner D., Rockel P.: Investigations on the $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration in maternal and fetal cotyledons of cows with and without retained fetal membranes. *J. Vet. Med. A* **27**, 691, 1980.
18. Limas C. J., Cohn J. N.: Regulation of myocardial prostaglandin dehydrogenase activity. The role of cyclic 3',5'-AMP and calcium ions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **142**, 1230, 1973.
19. Marazzi M. A., Matschinsky F. M.: Properties of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: structural requirements for substrate binding. *Prostaglandins* **1**, 373, 1972.
20. Matschinsky F. M., Shanahan D., Ellerman J.: An improved procedure for enzymatic analysis of prostaglandins in the nanogram range. *Anal. Biochem.* **60**, 188, 1974.
21. Mitchell M. D., Anderson A. B. M., Brunt J. D., Clover J., Elwood D. A., Robinson J. S., Turnbull A. C.: Concentration of 6-oxo-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ in the maternal and fetal plasma of sheep during spontaneous and induced parturition. *J. Endocrinol.* **83**, 141, 1979.
22. Nagasawa M., Chan J. A., Sih C. J.: Prostaglandin - sepharose: Application to the purification of bovine lung 15 (S) hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Prostaglandins* **8**, 221, 1974.
23. Oliw E., Lunden I., Anggard E.: Affinity Chromatography of 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase from Swine Kidney, [w:] *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, red. B. Samuelsson i R. Paoletti, t. 1, Raven Press, New York 1976.
24. Ornstein L.: Disc elektrophoresis I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 321, 1964.
25. Othmorg G.: *Methods in Enzymology*, red. W.B. Jakoby, Academic Press, New York i London 1971.
26. Pace-Asciak C. R., Smith W. L.: Enzymes in the biosynthesis and catabolism of the eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, and hydroxy fatty acids. *Enzymes* **16**, 544, 1983.
27. Paulsrud J. R., Miller O. N., Schlegel W.: Inhibition of 15-OH prostaglandin dehydrogenase by several diuretic drugs. *Fed. Proc.* **33**, 590, 1974.
28. Schlegel W., Demers L. M., Hildebrandt-Stark H. E., Behrman H., Greep R. O.: Partial purification of human placental 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: kinetic properties. *Prostaglandins* **5**, 417, 1974.
29. Schlegel W., Greep R. O.: Prostaglandin 15-hydroxy dehydrogenase from human placenta. *Eur. J. Biochem.* **56**, 245, 1975.
30. Sun F. F., Armour S. B., Bockstanz V. R., McGuire J. C.: Studies on the 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase from Monkey Lung, [w:] *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, red. B. Samuelsson i R. Paoletti, t. 1, Raven Press, New York 1976.
31. Tai H. H., Hollander C. S.: Kinetic Evidence of a Distinct Regulatory Site on 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase, [w:] *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, red. B. Samuelsson i R. Paoletti, t. 1, Raven Press, New York 1976.
32. Thaler D. H., Saintot M., Baudin G., Descomps B., Crastes de Paulet A.: Purification of the human placental 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: properties of the purified enzyme. *FEBS Letters* **48**, 204, 1974.

SUMMARY

15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (PGDH) is the key enzyme of biological degradation of prostaglandins which is responsible for creating 15-keto metabolites. PGDH regulates level of this hormone and influences its role in biochemical processes of living organism.

Till now physico-chemical properties of PGDH from bovine placenta have not been described.

The aim of the following study was the examination of some of physico-chemical properties of PGDH, the source of which was pregnant uterus and fetal membranes of cows.

The examinations were performed in placental tissue samples of cows of the breed German Black Pied exactly after spontaneous parturition.

The purification of samples after homogenization prepared in 2 steps: precipitation with ammonium sulfate and gel filtration let us receive preparates of enzyme purified 10.7 and 11.7 times (caruncles and villi). In such material relationships between the enzyme activity and reaction time and enzyme content were studied. The examined kinetic parameters of PGDH were: Michaelis constant (K_m) – 5.7×10^{-6} mol/dm³, max velocity (V_{max}) – 0.825 nmol/s, optimum of pH – 8.0-9.0 and optimum of temperature – 25-37°C.

Using acrylamide gel electrophoresis with and without sodium dodecyl sulfate it was possible to notice 5 enzymatic fractions of PGDH whose molecular weight ranged between 74,200 and 15,900 D.