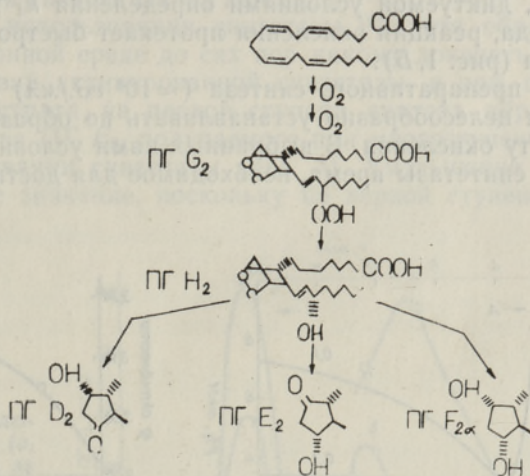


Ю. ЛИЛЛЕ, А. МЯННИК, А. ЯГОМЯГИ,
 Н. САМЕЛЬ, Т. САКС

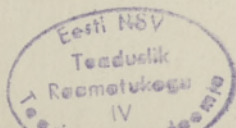
О ПРЕПАРАТИВНОМ БИОСИНТЕЗЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУПП E И F С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕАЗЫ В ВИДЕ АЦЕТОН-ПЕНТАНОВОГО ПОРОШКА

За полтора десятилетия со времени выяснения образования простагландина E_2 (ПГ E_2) при биохимической окислительной циклизации арахидоновой кислоты [1, 2] найдено 8 возможностей метаболизма арахидоновой и других т. н. эссенциальных жирных кислот с участием целого ряда энзимов [3]. Последние локализованы преимущественно в тех или иных органах животных и человека. В настоящее время осуществляется препаративный синтез, приводящий к образованию ПГ E, и начаты работы по реализации других возможностей, в том числе получения некоторых стабильных ПГ групп D и F, а также нестабильных промежуточных эндоперекисей ПГ групп G и H.



Биохимические методы синтеза ПГ — относительно нестабильных и оптически активных соединений — имеют в определенных условиях преимущества перед химическим синтезом, поскольку они просты и образование побочных продуктов при них минимально.

Среди работ по препаративному получению ПГ E наиболее известна [4], где комплекс энзимов (синтетаза) выделяется из семенных пухляков барана в виде нерастворимого ацетон-пентанового порошка. Этим достигается многократное использование синтетазы, позволяющее



увеличивать выход продукта в 3 раза, по сравнению с выходом при применении гомогената ткани.

В данной статье изложены результаты первого этапа работ по препаративному получению ПГ биохимическим методом.

При осуществлении синтеза ПГ наиболее важными вопросами являются использование активности синтетазы и кинетика образования ПГ.

Активность синтетазы. Количество продукта (P), полученного с некоторого количества энзима (E), определяется уравнениями [5]:

$$[P]_t = [E]_0 \frac{k_2}{k_i} (1 - e^{-k_i t}), \quad (1)$$

$$[P]_\infty = [E]_0 \frac{k_2}{k_i} = \frac{v_0}{k_i}, \quad (2)$$

где v_0 — начальная активность синтетазы, $мкМ/мин$ (далее ед.); k_2 — каталитическая константа синтетазы, $мин^{-1}/нмоль \cdot мг$; k_i — константа скорости инактивации синтетазы, $мин^{-1}$; t — время реакции, мин; $[P]$ и $[E]$ — соответствующие концентрации, $мкМ$ и $мг/мл$.

Константы k_2 и k_i удобно определять по кривой поглощения кислорода с использованием кислородного электрода [5-7]. Полученные значения, в зависимости от времени и качества сбора семенных пузырьков, способа выделения и активации синтетазы, а также условий определения (тип буфера, наличие кофакторов, рН и температура среды), находятся в пределах 20—100 и 0,2—1,0 соответственно. Отметим, что с увеличением значения k_2 для конкретной синтетазы, как правило, увеличивается и значение k_i .

Максимальный выход продукта на единицу активности синтетазы определяется величиной k_i (рис. 1). При низкой концентрации энзима (≈ 100 ед./мл), диктуемой условиями определения k_i по кривой поглощения кислорода, реакция окисления протекает быстро до полной инактивации энзима (рис. 1, Б).

В условиях препаративного синтеза ($\approx 10^4$ ед./мл) значение начальной активности целесообразно устанавливать по образованию продукта в первую минуту окисления. В выбранных нами условиях предварительной активации синтетазы время, необходимое для достижения половины

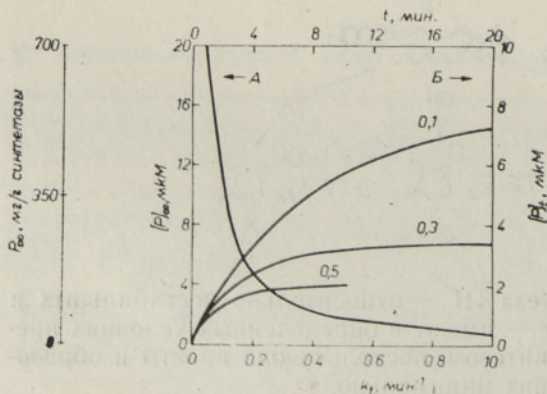


Рис. 1. Зависимость рассчитанных по уравнениям (1), (2) $[P]$ от k_i . Значения P в $мг/г$ синтетазы рассчитаны при $k_2 = 100$ (А) и $[P]_t$ от t при указанных на кривых значениях k_i (Б).

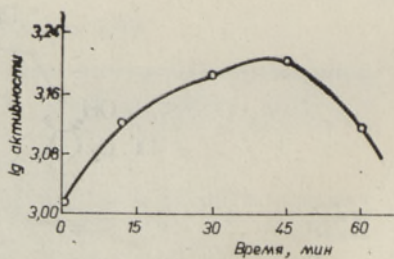
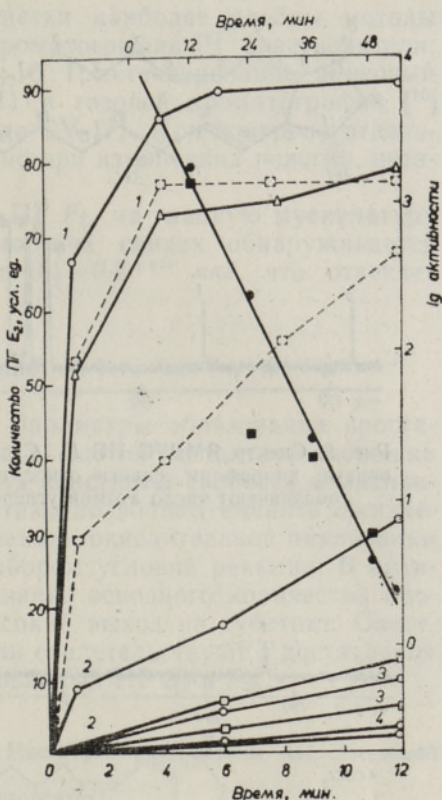


Рис. 2. Зависимость v_0 на первой ступени синтеза от времени активации. Значения v_0 рассчитаны из суммарного выхода ПГ E_2 на четырех последовательных ступенях синтеза с учетом распределения продукта по ступеням и времени (см. рис. 3).

Рис. 3. Зависимость выхода ПГ E_2 от времени окисления в последовательных циклах работы синтетазы (неокрашенные точки слева; номера на кривых указывают очередность циклов) и инактивация синтетазы в циклах (темные точки справа). \circ и Δ (\square) — две партии арахидоновой кислоты. Условия работы активированной синтетазы: 75 мг/мл, ЭДТА-буфер 30 мМ, субстрат (S) 3,4 мМ, глутатион 2 мМ, гидрохинон 0,5 мМ, температура 32 °С. Пунктиром обозначена временная зависимость количества ПГ E_2 на первой ступени синтеза при $[S]_0 = 4,2$ мМ (вверху) и 2,5 мМ (внизу).



максимальной активности, составляет ≈ 10 мин (рис. 2). В случае активации оксибензеном это время равно 3,5 мин [7].

Кинетика образования ПГ E_2 . При высоких концентрациях энзима (50—100 мг/мл) скорость реакции образования ПГ E_2 в течение 10—20 мин падает до нуля, но реакция возобновляется после замены жидкой реакционной среды свежей. Данное свойство ПГ-синтетазы является основой ступенчатого проведения синтеза ПГ E_2 при многократном использовании синтетазы [4], хотя образования ингибитора в реакционной среде до сих пор никому доказать не удалось.

В присутствии активированной синтетазы и при оптимальной концентрации субстрата на первой ступени синтеза образуется 65—80% всего количества ПГ E_2 , получаемого при многоступенчатом синтезе, до полной инактивации синтетазы (рис. 3). Уменьшение ступеней синтеза имеет большое значение, поскольку на первой ступени с активирован-

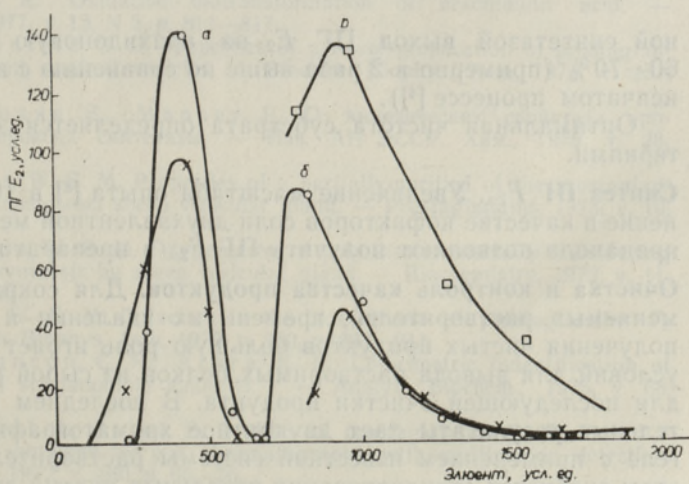


Рис. 4. Кривые элюирования ПГ E_2 (а, б) и ПГ $F_{2\alpha}$ (в) из колонок с силикагелем: а — первая ступень очистки, элюент хлороформ—метанол; б — вторая ступень очистки, элюент гексан—этиловый эфир уксусной кислоты; в — вторая ступень очистки, элюент — тот же, что в б.

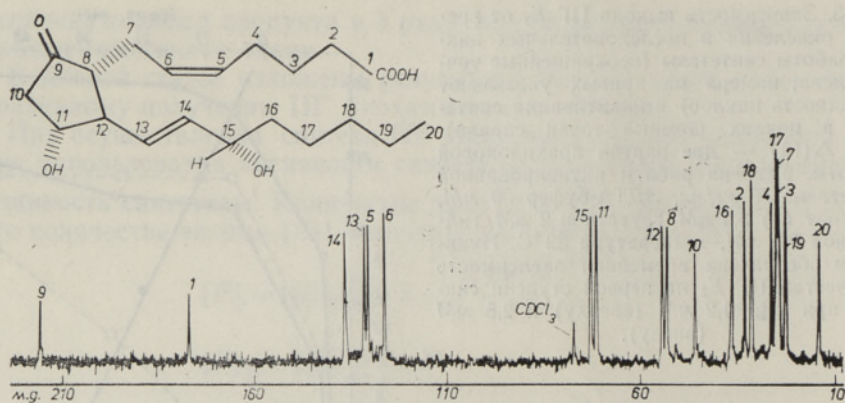


Рис. 5. Спектр ЯМР¹³С ПГ E_2 . Спектрометр WH-90, растворитель дейтерированный хлороформ, сдвиги относительно тетраметилсилана. Цифры у пиков обозначают число атомов углерода, начиная с карбоксильной группы.

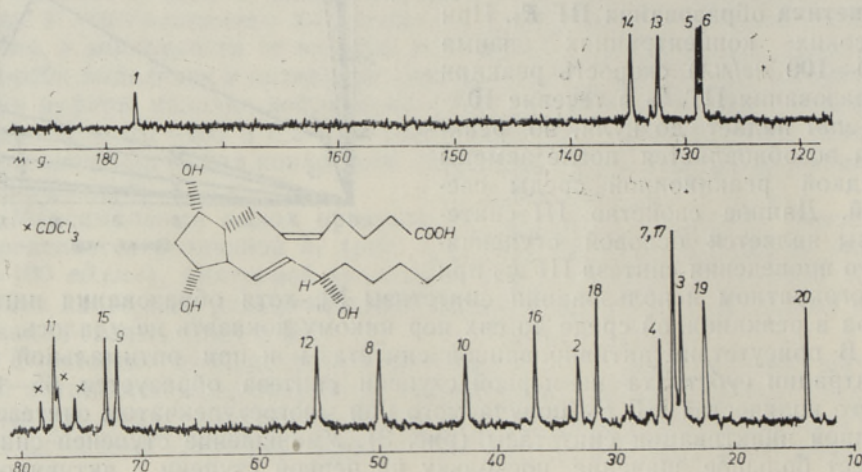


Рис. 6. Спектр ЯМР¹³С ПГ $F_{2\alpha}$ (в дейтерированном метаноле).

ной синтетазой выход ПГ E_2 на арахидоновую кислоту составляет 60—70% (примерно в 2 раза выше по сравнению с выходом в десятиступенчатом процессе [4]).

Оптимальная чистота субстрата определяется экономическими критериями.

Синтез ПГ $F_{2\alpha}$. Увеличение масштаба опыта [8] в 10^3 — 10^4 раз и применение в качестве кофакторов соли двухвалентной меди и 2,3-димеркаптопропанола позволяют получить ПГ $F_{2\alpha}$ в препаративных количествах.

Очистка и контроль качества продуктов. Для сокращения объема применяемых растворителей, времени их удаления и — главное — для получения чистых продуктов большую роль играет выбор оптимальных условий для вывода растворимых белков из сырой реакционной смеси и для последующей очистки продукта. В последнем случае удовлетворительные результаты дает двукратное хроматографирование на силикагеле с применением известной системы растворителей [4] (рис. 4), при этом требуется стандартизация отдельных партий силикагеля.

Для контроля за всем циклом очистки наиболее удобны методы щелочной деградации, тонкослойной хроматографии [9] (растворители: бензол—диоксан—уксусная кислота 20:10:1; детектирование: анисовый альдегид—этанол—конц. H_2SO_4 1:9:1) и газовой хроматографии [10] (триметилсилиловые производные в фазе OV-17). При контроле отдельных партий конечного продукта, особенно при изменениях режима, незаменим метод ЯМР¹³C [11] (рис. 5, 6).*

Действие синтезированных ПГ E_2 и ПГ $F_{2\alpha}$ на гладкую мускулатуру изолированной матки белых крыс и морских свинок обнаруживается соответственно при дозах 0,1—1,0** и 0,1—0,3*** мкг, что отвечает стандартам.

Заключение

Истинные равновесные и кинетические параметры образования простагландинов в присутствии синтетазы в виде ацетон-пентанового порошка неизвестны. Однако кажущиеся значения константы скорости инактивации и каталитической константы синтетазы позволяют оценить ожидаемый максимальный выход продуктов реакции окислительной циклизации полиеновой кислоты, направляемый выбором условий реакции. В оптимальных условиях достигается образование основного количества продукта на первой ступени синтеза и высокий выход на субстрат. Спектральные и биологические характеристики свидетельствуют о достаточной чистоте и высокой активности синтезированных ПГ E_2 и $F_{2\alpha}$.

* Спектры снимались в секторе физики Института кибернетики АН Эстонской ССР Т. Пехком.

** Измерения О. Раявез (Тартуский госуниверситет).

*** Измерения Р. Боряна (Ереванский медицинский институт).

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Dorp, D. A., Beerthuis, R. K., Nugteren, D. H., Vonkeman, H. The biosynthesis of prostaglandins. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, v. 90, p. 204—207.
2. Bergström, S., Danielsson, H., Samuelsson, B. The enzymatic formation of prostaglandin E_2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, v. 90, p. 207—210.
3. Pace-Asciak, C. R. Oxidative biotransformation of arachidonic acid. — *Prostaglandins*, 1977, v. 13, N 5, p. 811—817.
4. Wallach, P. D., Daniels, G. E. Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from seminal vesicles. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, v. 231, p. 445—457.
5. Лилле Ю., Смородин Е., Марвет Р. О кинетических свойствах простагландин-эндопероксид синтетазы. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1979, т. 28, № 2, с. 108—112.
6. Rome, H. L., Lands, W. E. M. Properties of a partially-purified of the prostaglandin-forming oxygenase from sheep vesicular gland. — *Prostaglandins*, 1975, v. 10, N 5, p. 813—824.
7. Smith, W. L., Lands, W. E. M. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. — *Biochemistry*, 1972, v. 11, N 17, p. 3276—3285.
8. Lee, R. E., Lands, W. E. M. Cofactors in the biosynthesis of prostaglandins F_1 and F_2 . — *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, v. 260, p. 203—211.
9. Kiefer, H. C., Johnson, C. R., Arora, K. L. Colorimetric identification of prostaglandins in subnanomole amounts. — *Analyt. Biochem.*, 1975, v. 68, p. 336—340.
10. Rosello, J., Tusell, J., Gelpi, E. Profiles of prostaglandins A, B, E and F (series I and II) obtained by gas chromatography with multiple-ion detection. — *J. Chromatogr.*, 1977, v. 130, p. 65—76.

11. Cooper, G. F., Fried, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of prostaglandins and some prostaglandin analogs. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, N 5, p. 1579—1584.

*Институт химии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
23/XI 1978

*U. LILLE, A. MANNIK, A. JAGOMAGI,
N. SAMEL, T. SAKS*

E- JA F-GRUPI PROSTAGLANDIINIDE PREPARATIIVNE BIOSÜNTEES ATSETOON-PENTAANPULBRI ABIL

Artiklis on esitatud järeldus, et sünteesi ulatuse ja teostuse määravad protsessi staatilised ja kineetilised parameetrid ning produktide eraldamise ja puhastamise meetodid.

*U. LILLE, A. MANNIK, A. JAGOMAGI,
N. SAMEL, T. SAKS*

ON PREPARATIVE SCALE BIOSYNTHESIS OF PROSTAGLANDINS E AND F GROUPS USING ACETONE-PENTANE POWDER SYNTHETASE

Apparent values of inactivation rate constant and catalytic constant of acetone-pentane powder from sheep vesicular glands were used for the calculation of the biosynthetic capacity of PG-s. The oxygenative cyclization of polyene acids was directed toward E or F group PG-s. In optimal conditions the basic quantity of PGE₂ was formed in the first cycle of synthesis, resulting in yields based on arachidonic acids, 3-fold higher than were hitherto possible using multicycle process. The ¹³C NMR spectra of products and the data of action on smooth muscle are given.