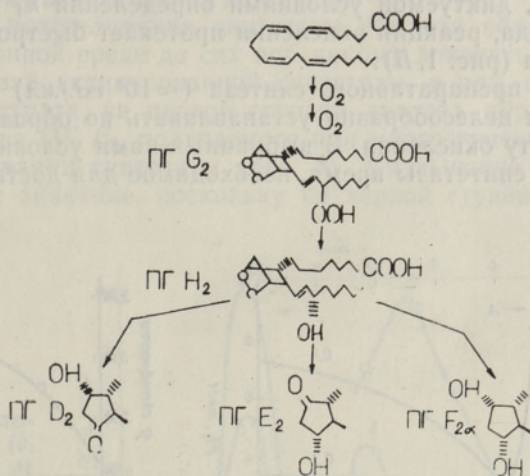


Ю. ЛИЛЛЕ, А. МЯННИК, А. ЯГОМЯГИ,  
Н. САМЕЛЬ, Т. САКС

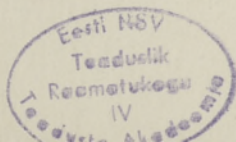
### О ПРЕПАРАТИВНОМ БИОСИНТЕЗЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУПП E И F С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕАЗЫ В ВИДЕ АЦЕТОН-ПЕНТАНОВОГО ПОРОШКА

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

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, pH 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 ( $\approx 100 \text{ ед./мл}$ ), диктуемой условиями определения  $k_i$  по кривой поглощения кислорода, реакция окисления протекает быстро до полной инактивации энзима (рис. 1, Б).

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

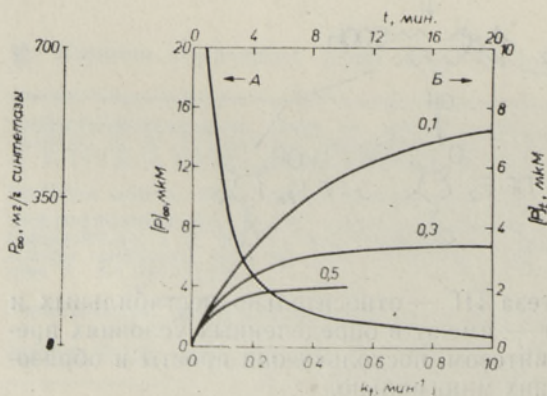


Рис. 1. Зависимость рассчитанных по уравнениям (1), (2)  $[P]$  от  $k_i$ . Значения  $P$  в  $\text{мг/г}$  синтетазы рассчитаны при  $k_2 = 100$  (А) и  $[P]_t$  от  $t$  при указанных на кривых значениях  $k_i$  (Б).

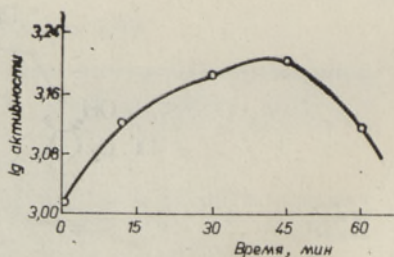
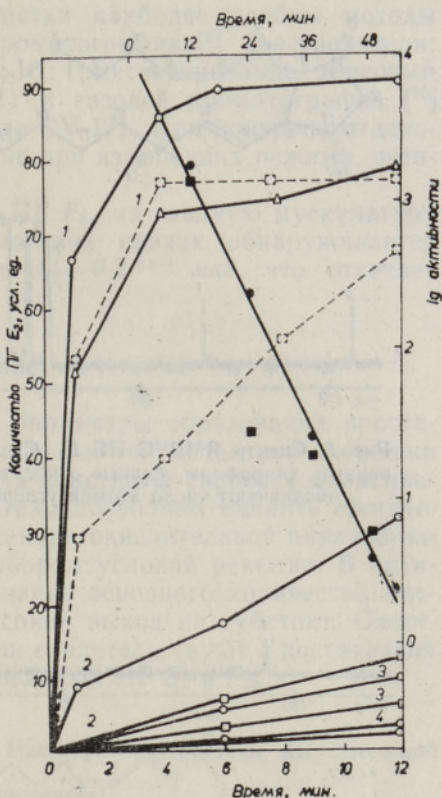


Рис. 2. Зависимость  $v_0$  на первой ступени синтеза от времени активации. Значения  $v_0$  рассчитаны из суммарного выхода ПГ  $E_2$  на четырех последовательных ступенях синтеза с учетом распределения продукта по ступеням и времени (см. рис. 3).



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  $\Delta$  ( $\square$ ) — 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  $\approx 10$  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-

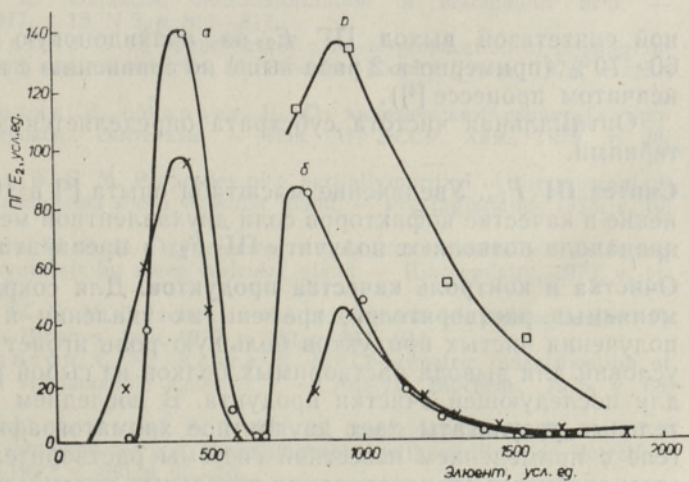


Рис. 4. Кривые элюирования ПГ  $E_2$  (а, б) и ПГ  $F_{2\alpha}$  (в) из колонок с силикагелем: а — первая ступень очистки, элюент хлороформ—метанол; б — вторая ступень очистки, элюент гексан—этиловый эфир уксусной кислоты; в — вторая ступень очистки, элюент — тот же, что в б.



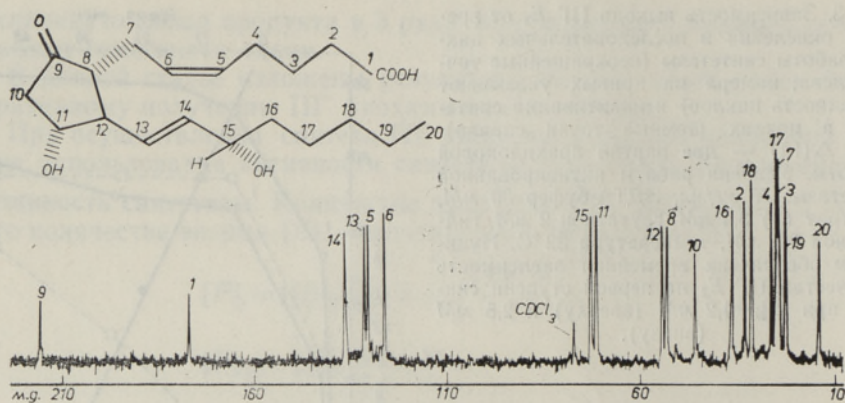


Рис. 5. Спектр ЯМР<sup>13</sup>С ПГ  $E_2$ . Спектрометр WH-90, растворитель дейтерированный хлороформ, сдвиги относительно тетраметилсилана. Цифры у пиков обозначают число атомов углерода, начиная с карбоксильной группы.

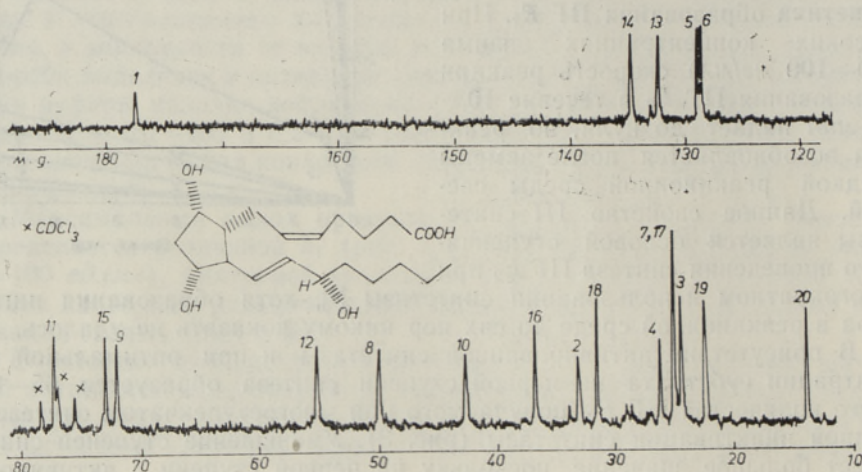


Рис. 6. Спектр ЯМР<sup>13</sup>С ПГ  $F_{2\alpha}$  (в дейтерированном метаноле).

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 ЯМР<sup>13</sup>C [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 PGE<sub>2</sub> 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 <sup>13</sup>C NMR spectra of products and the data of action on smooth muscle are given.