

УДК 577.152.311/547.8/548.73

ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ ПЕЧІНКИ СВИНІ ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОМУ ГІДРОЛІЗІ ПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ

С. А. Андронаті
Є. А. Шестеренко
О. В. Севастьянов
І. І. Романовська
В. І. Павловський
К. О. Семенішина
В. Є. Осетров

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського
НАН України, Одеса

E-mail: romairina@gmail.com

Оскільки комерційні препарати карбоксилестерази печінки свині є високовартісними, розроблення простих і доступних методів отримання карбоксилестерази для використання у стереоселективному гідролізі нових естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону є актуальним завданням. Створено ефективний і доступний метод виділення карбоксилестерази з мікросомальної фракції печінки свині з виходом за протеїном 2,24 мг/г тканини і естеразною активністю 149 мкмоль/хв на 1 мг протеїну. З використанням нативного електрофорезу в препараті карбоксилестерази виявлено 19 протеїнових фракцій, 11 з яких (73 % від загального протеїну) мають естеразну активність. Уперше за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині проведено стереоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з отриманням S-енантіомера субстрату.

Ключові слова: карбоксилестераза, мікросомальна фракція, печінка свині, електрофорез, ди-(*n*-нітрофеніл)фосфат, енантіоселективний гідроліз, 3-ацилокси-1,4-бенздіазепін-2-они.

Карбоксилестераза (КФ 3.1.1.1) локалізована переважно в ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів [1] і відповідає за метаболізм та активацію структурно різноманітних лікарських речовин і проліків, що мають у своєму складі естерну або амідну групи [2, 3].

Ензим має широку субстратну специфічність [4, 5] і високу стереоселективність, тому є перспективним як каталізатор стереоселективного гідролізу або синтезу органічних сполук [6], у тому числі естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону — потенційних анксиолітиків і гіпноседативних лікарських засобів.

Частково очищені препарати карбоксилестерази отримують з мікросомальної фракції клітин печінки свині, яку виділяють методом ультрацентрифугування при 105 000 g [7], або з печінки у вигляді ацетонних порошоків [8], що потребує застосування дорогого обладнання або значної кількості токсичних розчинників (більше 10 дм³ ацетону), тривалого проведення процесу в умовах низьких температур (–30 °С).

Відомо, що препарати карбоксилестера-

зи, як високо- так і частково очищені, складаються з низки ізоформ ензиму, однак ці ізоформи мають подібну специфічність і їх можна використовувати в стереоселективному гідролізі й синтезі як один ензим [9].

Оскільки стереоселективність карбоксилестерази печінки свині стосовно нових естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону не вивчено, метою цієї роботи було розроблення доступного й ефективного способу отримання частково очищеного препарату карбоксилестерази печінки свині (КЕПС), дослідження його властивостей як каталізатора енантіоселективного гідролізу 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, який має високу спорідненість до центральних бенздіазепінових рецепторів ЦНС.

Матеріали і методи

Мікросомальну фракцію (МФ) печінки свині одержували методом низькошвидкісної седиментації в присутності іонів Ca²⁺ [10], модифікованим відповідно до [11]. Виділену

МФ (концентрація протеїну 12,5 мг/см³) інкубували в присутності 0,1 М Na₄P₂O₇ (рН 8,0) і 0,1 М ЕДТА за перемішування впродовж 30 хв при 37 °С, охолоджували до 0 °С і центрифугували 30 хв за 17 000 об/хв. До супернатанту додавали сульфат амонію до 70% насичення при перемішуванні (0 °С), після чого центрифугували в аналогічних умовах. Осад ресуспендували у трис-НСІ буферному розчині (0,01 М, рН 8,0), що містив 0,5 М КСІ, потім розчин насичували сульфатом амонію в тих самих умовах до 45% і центрифугували при 17 000 об/хв 30 хв, після чого насичували отриманий супернатант до 70% і центрифугували в аналогічних умовах. Осад реекстрагували за 45% насичення сульфатом амонію і екстракт переосаджували насиченням до 70%. Одержані осад розчиняли у трис-НСІ буферному розчині (0,01 М, рН 8,0) й об'єднували; сумарну фракцію (45–70% насичення) діалізували проти того самого буферного розчину при 0 °С.

У виділеному препараті карбоксилестерази визначали вміст протеїну за методом Лоурі в модифікації Хартрі [12] та естеразну активність (за 1-нафтилацетатом) [13].

Фракційний склад препарату КЕПС досліджували методом SDS-електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) в системі Леммлі на приладі Helicon, Росія. Забарвлення здійснювали з використанням барвника Кумасі R-250.

Нативний електрофорез виконували в 10% ПААГ за Орнстейн і Девіс [14]. Одну частину гелю забарвлювали Кумасі R-250 для прояву протеїнових фракцій. Іншу — обробляли субстратом карбоксилестерази для виявлення ензиматичної активності.

Вплив селективного інгібітора карбоксилестерази ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфату, синтезованого відповідно до [15], визначали в діапазоні концентрацій від 0,88 до 180 мкМ.

Ступінь гідролізу 1-метил-5-феніл-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону оцінювали за зменшенням кількості естерних груп спектрофотометрично гідроксаматним методом при λ 540 нм [16]. Ензиматичний гідроліз 1-метил-5-феніл-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону проводили протягом 2,5 год у розчині диметилсульфоксид : К-фосфатний буфер, 0,0167 М, рН 7,0, в об'ємних співвідношеннях 2 : 3, за температури 37 °С і естеразної активності ензиму 100 Од/см³. За одиницю естеразної активності приймали кількість ензиму, що каталізує гідроліз 1 мкмоль 1-нафтилацетату за 1 хв.

Результати та обговорення

Нами розроблено доступний спосіб виділення препарату карбоксилестерази, що полягає в отриманні МФ печінки методом низькошвидкісної седиментації з використанням Ca²⁺, подальшою екстракцією ензиму розчином пірофосфату натрію і фракціонуванням сульфатом амонію.

Показано, що заміна часткової солюбілізації мембран МФ дезоксихолатом натрію на екстракцію пірофосфатом натрію спричинила збільшення виходу за протеїном, підвищення естеразної активності виділеного ензиму (табл. 1), що, можливо, зумовлено не тільки поверхнево-активними властивостями пірофосфату, але й високою іонною силою його розчину. Це дало змогу більш селективно екстрагувати карбоксилестеразу з мікросомальних мембран.

Таблиця 1. Характеристики виділених препаратів КЕПС

Екстрагент	Вихід протеїну, мг/г тканини	Естеразна активність, Од/мг
Пірофосфат натрію	2,24±0,07	149,0±5,8
Дезоксихолат натрію	0,20±0,01	38,4±1,2

Вміст фосфоліпідів у препараті знижено в 5 разів порівняно з МФ.

Основні етапи виділення карбоксилестерази за допомогою пірофосфату натрію наведено в табл. 2. Встановлено, що додаткове переосадження осаду, отриманого після 45% насичення сульфатом амонію, сприяло збільшенню виходу за загальною естеразною активністю препарату сумарної фракції з 110·10³ до 137,9·10³ Од, тобто на 26%.

Виділений препарат карбоксилестерази повністю зберігав ензиматичну активність протягом 6 міс при –10 °С у 0,01 М трис-НСІ буферному розчині, рН 8,0.

Методом SDS-електрофорезу проведено дослідження протеїново-фракційного складу препарату КЕПС (рис. 1).

Показано наявність 26 протеїнових фракцій, які можна об'єднати в 4 зони (табл. 3).

Протеїни з найменшою молекулярною масою розташовані в діапазоні з відносною електрофоретичною рухомістю *R_f* 0,92–0,71 (№ 1–6). Частка протеїнів цієї зони в загальному спектрі — 18,2%. Основна фракція (№ 2) має молекулярну масу 14,4 кДа. Протеїни другої зони (№ 7–13) мають електрофоретичну рухомість від 0,68 до 0,51. Питома частка їх у загальному спектрі — 24,2%. Середня молекулярна маса протеїнів — близько 30 кДа.

Таблиця 2. Характеристика етапів виділення карбоксилестерази з печінки свині

Препарат	Об'єм, см ³	Загальний вміст протеїну		Естеразна активність		
		мг	%	Загальна активність		Питома активність, Од/мг
				Од·10 ³	Вихід, %	
Гомогенат	1513	85100	100	255,3	100,0	3,0
Супернатант 9000 g	3331	63500	74,6	222,3	86,7	3,5
Мікросомальна фракція	277	13500	15,9	174,2	67,6	12,9
Фракція після екстракції Na ₄ P ₂ O ₇	2116	4200	4,9	149,5	58,1	35,6
Фракція (NH ₄) ₂ SO ₄ (45–70%)	52	740	0,9	110,0	42,7	148,7
Фракція об'єднана*	60	870	1,0	137,9	53,8	158,5

* Складається з фракції (NH₄)₂SO₄ (45–70%) та фракції, що додатково отримана переосадженням осаду (NH₄)₂SO₄ (0–45%).

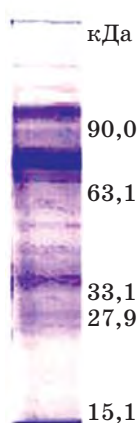


Рис. 1. Електрофореграма препарату карбоксилестерази (SDS-електрофорез)

Перша і друга зони представлені, ймовірно, баластними протеїнами і продуктами деградації. Протеїни найбільш вираженої зони розташовані в діапазоні з R_f 0,45–0,23 (№ 14–21). Їхня частка в спектрі — 43,1%. Протеїни з найбільшою молекулярною масою утворюють зону з рухомістю від 0,22 до 0,10 (№ 22–26). Частка протеїнів цієї зони в загальному спектрі становить 14,6%.

У виділеному препараті КЕПС фракції з молекулярною масою $52,5 \pm 7,8$ — $69,3 \pm 7,6$ кДа можуть відповідати субодиницям молекули КЕПС. Отримані результати узгоджуються з наведеними в літературі даними про структуру молекули КЕПС [9]; відомо, що М. м. комерційного препарату КЕПС становить 162–168 кДа, молекула ензиму складається з трьох субодиниць α , β і γ з М. м. 58,2, 59,7 і 61,4 кДа, відповідно.

З використанням нативного електрофорезу (рис. 2) у препараті КЕПС виявлено 19 протеїнових фракцій, 11 з яких (73,0% від загального протеїну) виявляють естеразну активність (табл. 4).



Рис. 2. Електрофореграми (нативний електрофорез) препарату карбоксилестерази: (1–19 — номер фракції): А — естеразна активність фракції; Б — протеїнові фракції

Відомо, що селективним необоротним інгібітором карбоксилестераз є ди-(*n*-нітрофеніл)фосфат [9]. Нами показано, що активність ензиму повністю пригнічувалась ди-(*n*-нітрофеніл)фосфатом (180 мкМ), що підтверджує відсутність інших естераз.

Уперше за допомогою карбоксилестерази МФ в розроблених умовах (рН = 7,0, 37 °С, 2,5 год, концентрація ДМСО 40%) здійснено стереоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (рис. 3) з 50%-м ступенем трансформації.

У результаті проведення енантіоселективного гідролізу рацемату 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону в суміші існують дві оптично активні сполуки (II і III).

Однак на відміну від наведених у літературі даних про більшу конформаційну стабільність заміщених по першому положенню 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-онів [17], нами було показано, що сполука II (структуру підтверджено методами ТПШХ, УФ-спектроскопії та мас-спектрометрії) рацемізується в процесі гідролізу і наступного виділення.

Таблиця 3. Протеїнові фракції препарату карбоксилестерази печінки свині (SDS-електрофорез)

№	R_f	Питома частка протеїнової фракції у спектрі, %	Молекулярна маса, кДа
1	0,92	4,14 ± 0,55	< 14,4
2	0,90	7,20 ± 1,07	14,4 ± 3,0
3	0,89	2,04 ± 0,57	15,1 ± 3,8
4	0,81	1,84 ± 0,71	18,4 ± 4,5
5	0,76	1,60 ± 0,48	21,0 ± 5,2
6	0,71	1,39 ± 0,37	23,4 ± 4,7
7	0,68	2,05 ± 0,23	25,1 ± 2,8
8	0,66	2,18 ± 0,35	27,7 ± 3,0
9	0,64	3,38 ± 0,35	27,9 ± 3,0
10	0,61	2,79 ± 0,20	27,9 ± 3,0
11	0,58	6,61 ± 0,90	33,1 ± 3,5
12	0,55	3,03 ± 0,37	36,7 ± 4,0
13	0,51	4,13 ± 0,24	41,7 ± 4,5
14	0,45	2,92 ± 0,26	45,5 ± 5,0
15	0,41	3,16 ± 0,44	52,5 ± 7,8
16	0,38	3,00 ± 0,15	56,2 ± 6,2
17	0,35	5,46 ± 0,53	61,0 ± 6,7
18	0,33	18,58 ± 1,43	63,1 ± 7,0
19	0,29	4,10 ± 0,47	69,3 ± 7,6
20	0,26	3,97 ± 0,91	71,6 ± 7,8
21	0,23	1,91 ± 0,45	81,3 ± 10,0
22	0,22	2,10 ± 0,37	83,2 ± 10,0
23	0,19	9,08 ± 1,46	90,0 ± 10,0
24	0,15	0,97 ± 0,19	100,0 ± 12,0
25	0,13	0,34 ± 0,02	140,0 ± 16,8
26	0,10	2,08 ± 0,09	300,0 ± 36,0

Таблиця 4. Фракційний склад і ензиматична активність виділеного препарату КЕПС (нативний електрофорез)

№	R_f	Питома частка протеїнової фракції в спектрі, %	
		За протеїном	За естеразною активністю
1	0,85	0,10±0,05	–
2	0,65	1,49±0,15	–
3	0,57	3,84±0,16	–
4	0,52	2,23±0,35	–
5	0,50	3,83±0,13	–
6	0,47	4,32±0,33	–
7	0,44	7,08±0,15	–
8	0,42	4,28±0,33	–
9	0,38	3,62±0,19	0,74±0,33
10	0,33	7,69±0,22	12,57±0,72
11	0,28	10,04±0,71	13,02±1,34
12	0,23	6,22±0,33	11,84±0,64
13	0,21	3,90±0,27	
14	0,18	6,23±0,26	9,50±0,93
15	0,15	5,32±0,40	11,04±1,06
16	0,12	15,40±0,39	17,36±1,42
17	0,09	3,71±0,29	7,75±0,58
18	0,07	2,31±0,16	7,63±0,73
19	0,04	8,41±0,38	8,57±0,72

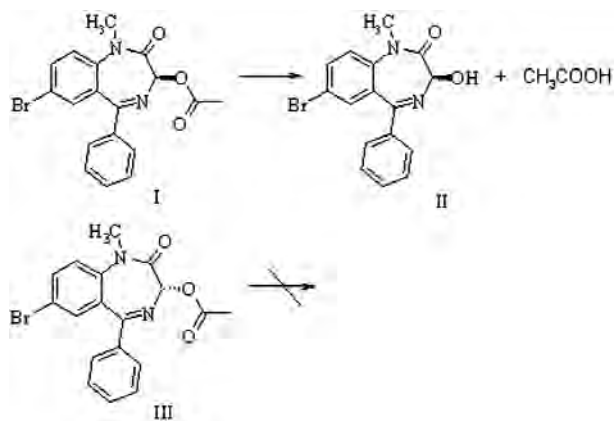


Рис. 3. Ензиматичний гідроліз
3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-
1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону

Підтверджено збереження S-енантіомера субстрату (III) в негідролізованій формі, встановлено його молекулярну і кристалічну структуру $[\alpha]_D^{20} = 195,3^\circ$ [18].

Отримані дані свідчать про більшу специфічність карбоксилестерази МФ печінки свині до R-енантіомера досліджуваного субстрату.

Таким чином, розроблено новий ефективний і доступний метод виділення карбоксилестерази з мікросомальної фракції печінки свині. Методами SDS- і нативного електрофорезу вивчено протеїново-фракційний склад і активність отриманого ензимного препарату. Інгібування ензиму ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфатом підтверджує його належність до сімейства карбоксилестераз. Уперше за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині здійснено енантиoselectивний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, отримано S-енантіомер субстрату. Запропонований ензиматичний спосіб одержання енантиомерів естерів 1,4-бенздіазепін-2-ону є доступним і перспективним для напруження з метою дослідження їхніх фармакологічних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — V. 31, N 1. — P. 620–624.
2. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules.* — 2008. — V. 13, N 2. — P. 412–431.
3. Satoh T., Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases // *Chem. Biol. Interact.* — 2006. — V. 162, N 3. — P. 195–211.
4. Landowski C. P., Lorenzi P. L., Song X. et al. Nucleoside ester prodrug substrate specificity of liver carboxylesterase // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2006. — V. 316, N 2. — P. 572–580.
5. Imai T., Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue // *J. Pesticide Sci.* — 2010. — V. 35, N 3. — P. 229–239.
6. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J. *Hydrolases in organic synthesis.* — Weinheim, Wiley-VCH, 2006. — 368 p.
7. Kleingeist B., Bocker R. Isolation and pharmacological characterization of microsomal human liver flumazenil carboxylesterase // *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* — 1998. — V. 1, N 1. — P. 38–44.
8. Levy M., Ocken P. Purification and properties of pig liver esterase // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1969. — V. 135, N 1. — P. 259–264.
9. Zhu L. M. Applications of pig liver esterases (PLE) in asymmetric synthesis // *Tetrahedron.* — 1990. — V. 46, N 19. — P. 6587–6611.
10. Kamath S. A., Narayan K. A. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, N 1. — P. 53–61.
11. Eriksson L. C. Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 508, N 1. — P. 155–164.
12. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, N 2. — P. 422–427.
13. Yang S., Liu K., Guengerich P. Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction // *Chirality.* — 1990. — V. 2. — P. 150–155.
14. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. *Методы биохимического исследования растений.* — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
15. Moffat J., Khorana H. Tetra-p-nitrophenyl pyrophosphate — a new phosphorylating agent // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1957. — V. 79, N 14. — P. 3741–3746.
16. Balls A. K., Wood H. N. Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // *J. Biol. Chem.* — 1956. — V. 219, N 1. — P. 245–256.
17. Oswald P., Desmet K., Sandra P. et al. Determination of the enantiomerization

energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical fluid chromatography // *J. Chromatogr. B.* — 2002. — V. 779, N 2. — P. 283–295.

18. Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Андронати С. А. и др. Стереоселективный гид-

ролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью свободной и иммобилизованной микросомальной фракции печени свиньи // *Доп. НАН України.* — 2011. — № 2. — С. 166–172.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗДИАЗЕПИНА-2-ОНА

С. А. Андронати, Е. А. Шестеренко,
О. В. Севастьянов, И. И. Романовская,
Е. А. Семенишина, В. И. Павловский,
В. Е. Осетров

Физико-химический институт
им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

E-mail: romairina@gmail.com

Поскольку коммерческие препараты карбоксилэстеразы печени свиньи являются дорогостоящими, разработка простых и доступных методов получения карбоксилэстеразы для использования в стереоселективном гидролизе новых эфиров 1,4-бензодиазепин-2-она является актуальной задачей. Создан эффективный и доступный метод выделения карбоксилэстеразы из микросомальной фракции печени свиньи с выходом по протеину 2,24 мг/г ткани и эстеразной активностью 149 мкмоль/мин на 1 мг протеина. С использованием нативного электрофореза в препарате карбоксилэстеразы выявлено 19 протеиновых фракций, 11 из которых (73% от общего протеина) обладают эстеразной активностью. Впервые с помощью карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи осуществлен стереоселективный гидролиз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она; получен S-энантиомер субстрата.

Ключевые слова: карбоксилэстераза, микросомальная фракция, печень свиньи, электрофорез, ди-(*p*-нитрофенил)фосфат, энантиоселективный гидролиз, 1,4-бензодиазепин-2-оны.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PIG LIVER CARBOXYLESTERASE AND ITS APPLICATION IN STEREOSELECTIVE HYDROLYSIS OF 1,4-BENZODIAZEPINE- 2-ONE DERIVATIVES

S. A. Andronati, E. A. Shesterenko,
O. V. Sevastyanov, I. I. Romanovska,
E. A. Semenishina, V. I. Pavlovsky,
V. E. Osetrov

A. V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Odesa

E-mail: romairina@gmail.com

Since the commercial preparations of pig liver carboxylesterase are expensive, the development of convenient and available methods of carboxylesterase isolation for usage in stereoselective hydrolysis of new 1,4-benzodiazepine-2-one esters is an essential task. An effective and convenient method for isolation of pig liver microsomal carboxylesterase with protein yield 2.24 mg/g tissue and esterase activity of 149 $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein is described in paper. With native electrophoresis usage, 19 protein fractions were found in carboxyl esterase preparation, 11 of which (73% of the total protein) possesses esterase activity. For the first time, using pig liver microsomal carboxyl esterase, the stereoselective 3-acetoxy-7-bromo-1-methyl-5 phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one hydrolysis was accomplished and thus S-enantiomer of substrate was obtained.

Key words: carboxyl esterase, microsomal fraction, pig liver, electrophoresis, di-(*p*-nitrophenyl)phosphate, enantioselective hydrolysis, 1,4-benzodiazepine-2-ones.