



УДК 615.355

© 1991 г.

В. Ф. Позднев, К. С. Планутис, А. И. Точилкин

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ  
ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗЫ

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Предложен новый метод определения панкреатической холестеролэстеразы с использованием в качестве субстрата холестерилового эфира *транс*-2-гидроксикоричной (*о*-кумаровой) кислоты. При рН 6,6 холестерилкумарат быстро гидролизуетсся свиной панкреатической холестеролэстеразой, освобождаящуюся *о*-кумаровую кислоту определяли флуорометрически при рН 10,4 (возбуждение 363 нм, испускание 494 нм). Метод позволяет определять около 1 мкг панкреатической холестеролэстеразы при 15-минутной инкубации. Субстрат синтезирован конденсацией ацетата *о*-кумаровой кислоты с холестерином с использованием системы ди-*трет*-бутилпирокарбонат — пиридин — 4-диметиламинопиридин.

Холестеролэстераза (КФ 3.1.1.13) — фермент, играющий ключевую роль в процессах транспорта и обмена холестерина в животном организме [1, 2] и составляющий значительную часть панкреатического секрета человека. Уровень секреции и активность холестеролэстеразы колеблется весьма значительно и при панкреатитах и других патологиях отличается от нормы [3]. В связи с этим для оценки физиологического состояния организма и особенно для клинической диагностики различных патологий, связанных с нарушениями функций поджелудочной железы, большой интерес представляют методы определения активности панкреатической холестеролэстеразы, которая в отличие от других ферментов с этой специфичностью достаточно доступна для исследования.

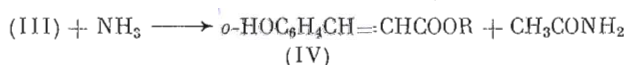
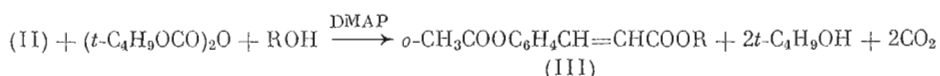
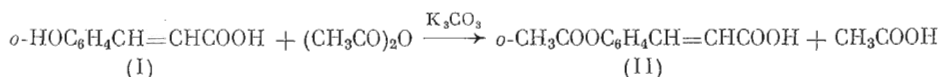
Известно несколько подходов к определению активности этого фермента, различающихся используемыми субстратами и методами детекции продуктов ферментативной реакции. В ряде методов в качестве субстратов использованы хромогенные или флуорогенные эфиры жирных кислот (например, *п*-нитрофенилацетат [4] или флуоресцеиндилаурат [5]). Очевидный недостаток этих методов — низкая или неустановленная специфичность субстратов, поскольку эфиры такого типа могут гидролизываться и другими ферментами (эстеразами или пептидазами). Известны методы с высокой чувствительностью и использующие высокоспецифичные субстраты холестеролэстеразы — холестериновые эфиры радиоактивно меченных жирных кислот [6, 7]. Недостатком этих методов является ограниченная доступность меченых субстратов и высокая трудоемкость. Другие методы определения фермента с использованием естественных субстратов менее чувствительны или более трудоемки, чем при использовании радиоактивных субстратов. Так, образующиеся в результате ферментативного гидролиза жирные кислоты определяли титриметрически после экстракции [8], после отделения хроматографическими методами [9] или прямо в реакционной смеси [10]. Активность холестеролэстеразы определяли также колориметрически [11] или ферментативным методом [12] по образующемуся холестерину после выделения его из реакционной среды. Описан нефелометрический метод определения панкреатической холестеролэстеразы [13], но чувствительность этого метода низкая.

Таким образом, несмотря на большое число известных методов определения холестеролэстеразы, простого и высокочувствительного метода,

пригодного как для научных исследований, так и для клинических анализов, пока не найдено.

Нами предложен простой и высокочувствительный метод определения панкреатической холестеролэстеразы, основанный на использовании доступного и специфического субстрата — холестерилового эфира *o*-кумаровой (*транс*-3-(2-гидроксифенил)-2-пентеновой) кислоты (холестерил-*o*-кумарата, далее — холестерилкумарат (IV)) [14, 15]. В результате ферментативного гидролиза сложноэфирной связи в холестерилкумарате освобождается *o*-кумаровая кислота (I), которая, как было установлено ранее [16], интенсивно флуоресцирует в щелочной среде. В настоящей работе описан новый, более простой метод синтеза холестерилкумарата и приведены результаты исследования его гидролиза под действием очищенной холестеролэстеразы из поджелудочной железы свиньи.

Ранее [15] для синтеза холестерилкумарата был использован хлорангидрид *O*-метилоксикарбонил-*o*-кумаровой кислоты, который получали в две стадии. Гидроксильную группу *o*-кумаровой кислоты блокировали обработкой метилоксикарбонилхлоридом и затем защищенную кислоту превращали в хлорангидрид, которым ацилировали холестерин. Защитную группу удаляли осторожным омылением щелочью, но частичного отщепления холестерина при этом избежать не удавалось. В усовершенствованной методике для защиты фенольного гидроксила использована ацетильная группа, которую вводили с помощью уксусного ангидрида. Конденсация ацетата *o*-кумаровой кислоты с холестерином проводили в одну стадию с использованием системы *ди-трет*-бутилпирирокарбонат — пиридин — 4-диметиламинопиридин (DMAP) [17] и затем ацетильную группу удаляли аммиаком в водно-органическом растворе при умеренном нагревании. В этих условиях отщепления холестерина не происходит и холестерилкумарат образуется с более высоким выходом и лучшего качества, чем ранее [15].



ROH = холестерин

В предварительных экспериментах методом тонкослойной хроматографии было установлено, что холестерилкумарат действительно гидролизует панкреатической холестеролэстеразой с образованием кислоты (I), но самопроизвольного гидролиза (без фермента) не происходит в интервале pH 6—10 и времени инкубации до 60 мин. Другие ферменты, способные гидролизовать сложные эфиры и присутствующие в панкреатическом соке совместно с холестеролэстеразой (трипсин, химотрипсин, липаза), не гидролизуют холестерилкумарат в условиях определения эстеразы. Спектры возбуждения и испускания холестерилкумарата и кислоты (I) представлены на рис. 1 и 2. Зависимость интенсивности флуоресценции *o*-кумаровой кислоты от pH приведена на рис. 3. И хотя, как следует из этого графика, флуоресценция кислоты (I) при pH  $\geq 11$  несколько возрастает, при определении активности холестеролэстеразы с использованием кумарата (IV) в качестве субстрата *o*-кумаровую кислоту определяли по ее флуоресценции при pH 10,4, поскольку при более высоких pH увеличивается вероятность щелочного гидролиза холестерилкумарата. Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации кислоты (I) линеен в пределах 0—18 мкг (рис. 4). Количество образующегося в процессе ферментативной реакции *o*-кумарата линейно зависит от времени инкубации (рис. 5) и от количества фермента, добавленного в реакционную смесь (рис. 6). Кумарат (IV) гидролизует панкреатической холестеролэстеразой с максимумом активности в той же

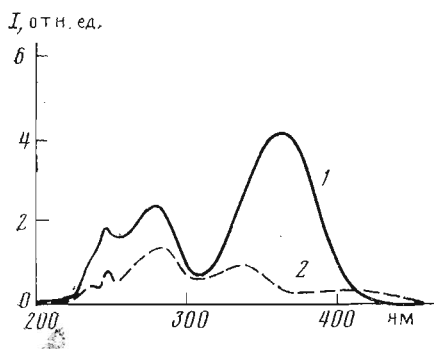


Рис. 1

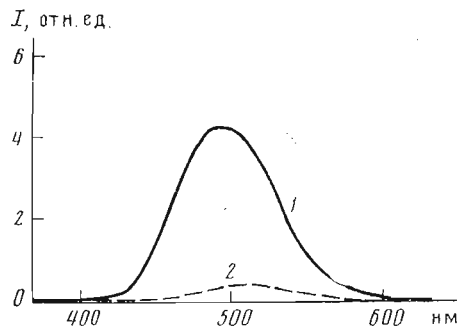


Рис. 2

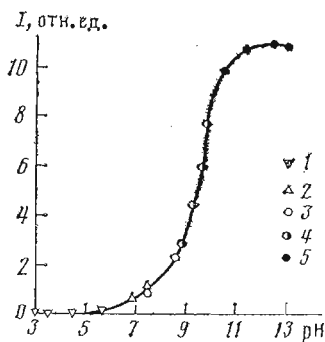


Рис. 3

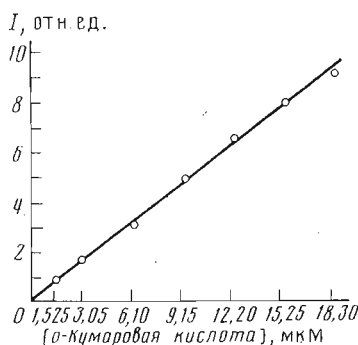


Рис. 4

Рис. 1. Спектры возбуждения *o*-кумаровой кислоты (1) и холестерилкумарата (2) в 0,02 М карбонат-боратном буфере, pH 10,4, содержащем тритон X-100.  $\lambda_{\text{исп}}$  494 нм, температура 20° С

Рис. 2. Спектры испускания *o*-кумаровой кислоты (1) и холестерилкумарата (2) в 0,02 М карбонат-боратном буфере, pH 10,4, содержащем тритон X — 100.  $\lambda_{\text{возб}}$  363 нм, температура 20° С

Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции *o*-кумаровой кислоты (200 нг/мл, объем пробы 3 мл) от pH ( $\lambda_{\text{возб}}$  363 нм,  $\lambda_{\text{исп}}$  494 нм). Использованы 50 мМ растворы ацетата натрия (1), натрий-фосфатного буфера (2), трис-NCl (3), натрий-боратного буфера (4) с последующим подщелачиванием 1 М NaOH (5)

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации *o*-кумаровой кислоты в 0,02 М карбонат-боратном буфере, pH 10,4 ( $\lambda_{\text{исп}}$  494,  $\lambda_{\text{возб}}$  363 нм)

области pH (pH 5,8—6,8), что и при гидролизе природных субстратов [6, 7]. Чувствительность методики позволяет определять около 1 мкг фермента при 15-минутной инкубации.

Таким образом, методика определения холестеролэстеразы с использованием в качестве субстрата холестерилкумарата и флуорометрической детекцией *o*-кумаровой кислоты отличается простотой и достаточно высокой чувствительностью. Метод несомненно представляет практический интерес, о чем свидетельствует успешное его использование в клинической диагностике панкреатитов [3].

#### Экспериментальная часть

Применяли трипсин (КФ 3.4.21.4; Worthington, США), химотрипсин (КФ 3.4.21.1; опытный завод Института химии АН Эстонии); холестеролэстераза (КФ 3.1.1.13) из поджелудочной железы свиньи получена по ранее описанному методу [4]. Активность фермента по *n*-нитрофенилацетату соответствовала удельной активности чистого фермента [4]. Препарат с содержанием белка 0,7 мг/мл (определяли по Лоури и др. [18]) не гидролизывал казеин и, следовательно, не содержал трипсина и химотрипсина, гидролизующих *n*-нитрофенилацетат.

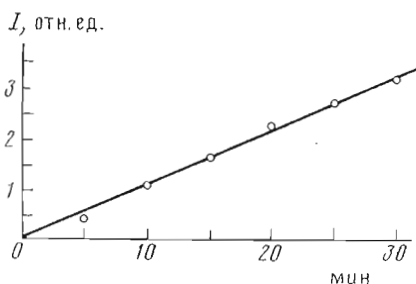


Рис. 5

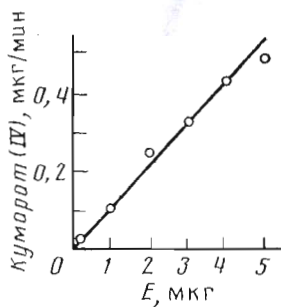


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость флуоресценции *o*-кумаровой кислоты от времени инкубации кумарата (IV) с холестероластеразой. Условия реакции — в «Экспер. части»

Рис. 6. Зависимость начальной скорости гидролиза холестерилкумарата от количества холестероластеразы, добавленного в инкубационную смесь (конечный объем 0,21 мл). Условия эксперимента — в «Экспер. части».

Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 UV 254 (Merck, ФРГ) в системе гептан — этилацетат, 3 : 1. Пятна продуктов детектировали в УФ-свете. Холестерин и холестерилкумарат окрашивали реактивом Дениже (раствор  $\text{HgSO}_4$  в 1 М серной кислоте) с последующим нагреванием при  $100^\circ\text{C}$ , *o*-кумаровую кислоту и кумарат (IV) окрашивали реактивом Паули. ИК-спектры снимали в таблетках с KCl на спектрометре Pye-Unicum SP 1000 (Англия). Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре RF-5000 (Schimadzu, Япония). При определении ферментативной активности использовали флуориметр фирмы Opton (МВН, ФРГ).

*О-Ацетилкумаровая кислота (II)*. К смеси 3,3 г (20 ммоль) *o*-кумаровой кислоты, 3 г  $\text{K}_2\text{CO}_3$  и 0,5 мл 10% водного раствора гидроксида тетраэтиламмония в 15 мл ацетона при перемешивании добавляли по каплям за 10 мин раствор 3 мл уксусного ангидрида в 10 мл ацетона. Смесь перемешивали 20 мин, добавляли тремя порциями 10 мл воды, перемешивали 1 ч, добавляли 20 мл воды и 25 мл 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и перемешивали еще 30 мин. Осадок отделяли, промывали водой, высушивали и получали 4,0 г (96%) соединения (II) с т. пл.  $148\text{--}150^\circ\text{C}$ ,  $R_f$  0,16. ИК-спектр: 1765, 1700 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1650 ( $\text{C}=\text{C}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . Найдено, %: С 63,78; Н 5,12.  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ . Вычислено, %: С 64,06; Н 4,9.

*Холестерилловый эфир О-ацетилкумаровой кислоты (III)*. Раствор 2,2 г (10,6 ммоль) соединения (II), 3,8 г (9,8 ммоль) холестерина, 0,3 мл пиридина, 50 мг 4-диметиламинопиридина, 3 мл (13 ммоль) ди-*трет*-бутилпирокарбоната в 20 мл этилацетата перемешивали 16 ч при  $20^\circ\text{C}$ , разбавляли 30 мл этилацетата, промывали водой, 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , водой, 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , водой, насыщенным раствором NaCl, высушивали  $\text{MgSO}_4$  и упаривали в вакууме при  $40^\circ\text{C}$ . Остаток кристаллизовали из метанола и получали 5,3 г (94%) ацетата (III), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Для анализа перекристаллизовывали из этанола. Т. пл.  $116\text{--}117^\circ\text{C}$ ,  $R_f$  0,76. ИК-спектр: 1775 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), 1740 ( $\text{COO}$ ), 1650 ( $\text{CH}=\text{CH}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . Найдено, %: С 79,5; Н 9,7.  $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_4$ . Вычислено, %: С 79,4; Н 9,4.

*Холестерилловый эфир о-кумаровой кислоты (IV)*. Суспензию 4,5 г (7,8 ммоль) ацетата (III) в 25 мл ацетона, 15 мл хлороформа и 5 мл 25% аммиака перемешивали при  $40^\circ\text{C}$  до исчезновения исходного продукта в реакционной смеси (3—3,5 ч; контроль ТСХ). Раствор разбавляли хлороформом, обрабатывали как при получении соединений (III), остаток кристаллизовали из этанола. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом и после высушивания в вакууме получали 3,7 г (89%) кумарата (IV) с т. пл.  $203\text{--}204^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} +5,9^\circ$  (с 1, тетрагидрофуран),  $R_f$  0,65.

ИК-спектр: 1690 (COO), 1650 (CH=CH)  $\text{cm}^{-1}$ . Найдено, %: С 81,2; Н 9,9.  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_3$ . Вычислено, %: С 81,15; Н 9,8.

*Определение активности холестеролэстеразы.* К раствору 1 мг кумарата (IV) в 1 мл диэтилового эфира добавляли 40 мкл тритона X-100, эфир упаривали, к остатку добавляли 20 мл 0,3 М калий-фосфатного буфера (рН 6,6), содержащего 5 мМ хлорат натрия, и перемешивали. Раствор субстрата готовили ежедневно. К 200 мкл полученной субстратной смеси, нагретой до 37° С, добавляли 10 мкл раствора фермента с известным содержанием белка и инкубировали 15 мин при 37° С. В начале и конце инкубации отбирали по 100 мкл инкубационной смеси, фиксировали добавлением по 500 мкл 0,2 М карбонат-боратного буфера, рН 10,4. К фиксированным пробам добавляли по 2,8 мл дистиллированной воды, перемешивали и измеряли флуоресценцию при 494 нм (возбуждение при 363 нм). В начале и конце измерений шкалу флуориметра калибровали по *o*-кумаровой кислоте в карбонат-боратном буфере, рН 10,4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. С. 396.
2. Ковалева Г. Г. // Лаб. дело. 1989. № 8. С. 4—9.
3. Логинов А. С., Шибалева Л. О., Планутис К. С., Тимошина И. В., Исакова З. С., Садоков В. М. // Клин. мед. 1988. № 11. С. 82—85.
4. Momen W. E., Brockman H. L. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 486. № 1. P. 103—113.
5. Meyer-Bertenrath J. G. // Enzyme. 1982. V. 28. № 4. P. 336—342.
6. Haley H. J., Fowler J., de Duve C. // J. Lipid Res. 1980. V. 21. № 8. P. 961—969.
7. Severson D. L., Fletcher T. // Atherosclerosis. 1978. V. 31. № 1. P. 21—32.
8. Dole V., Meinertz H. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. № 9. P. 2595—2600.
9. Coultts J., Stanfield D. // Biochem. J. 1967. V. 103. № 2. P. 55.
10. Murthy S., Ganguly J. // Biochem. J. 1962. V. 83. № 3. P. 460—467.
11. Sperry W., Webb M. // J. Biol. Chem. 1950. V. 187. № 1. P. 97—104.
12. Gallo L., Atasoy R., Vahouny G., Treadwell C. // J. Lipid Res. 1978. V. 19. № 7. P. 913—916.
13. Hernandez H., Chaikoff I. // J. Biol. Chem. 1957. V. 228. № 1. P. 447—456.
14. Планутис К. С., Давыдова Г. А., Викторова Л. Н. // Лаб. дело. 1987. № 9. С. 672—674.
15. Планутис К. С., Давыдова Г. А., Тоцилкин А. И., Шпикитер В. О., Ковалева Г. Г., Кириллова С. И. Холестерилловый эфир *o*-кумаровой кислоты в качестве субстрата для определения активности холестеролэстеразы: А. С. 1183539 СССР // Б. И. 1985. № 37. С. 96.
16. Wolfbeis O. S., Begum M., Hochmuth P. // Photochem. and Photobiol. 1986. V. 44. № 4. P. 551—554.
17. Позднее В. Ф. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 725—732.
18. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.

Поступила в редакцию  
6.III.1991

V. F. POZDNEV, K. S. PLANUTIS, A. I. TOCHILKIN

#### A FLUORIMETRIC METHOD FOR ESTIMATING CHOLESTEROLESTERASE ACTIVITY

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Moscow*

A simple and highly specific method for estimating the cholesterol esterase activity is suggested. Cholesterol esterase (EC 3.1.1.13) is incubated with the emulsified substrate, cholesteryl-*o*-coumarate, at pH 6.6 to yield *o*-coumaric (*trans*-2-hydroxycinnamic) acid detected fluorimetrically ( $\lambda_{\text{exc}}$  363 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  494 nm) at pH 10.4. The fluorescence associated with the unhydrolyzed substrate is negligible. Cholesteryl-*o*-coumarate is not hydrolyzed by pancreatic lipase, trypsin, or chymotrypsin under the above conditions. About 1  $\mu\text{g}$  of pancreatic cholesterol esterase can be determined upon 15 min incubation. The substrate was synthesized by condensation of *o*-acetoxy-*trans*-cinnamic acid with cholesterol using the di-*tert*-butyl pyrocarbonate — pyridine — 4-dimethylamino-pyridine system.