



УДК 577.175.82.088.6:547.396'11*3:577.152.14*99.1.062

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МЕЧЕННЫХ
ТРИТИЕМ ПРОСТАГЛАНДИНОВ
ИЗ $[^3\text{H}]$ ЭЙКОЗАТРИЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Дукат Л. П. *, Вржещ П. В., Шевченко В. П. *, Лыс Я. И. *,
Мягкова Г. Н. **, Якушева Л. А. **, Мевх А. Т., Варфоломеев С. Д.,
Федосеев В. М. *, Мясоедов Н. Ф. *

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белоозерского;

* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва;

** Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Изучен процесс препаративного ферментативного получения меченных тритием простагландинов E_1 , $F_{1\alpha}$, H_1 высокой молярной радиоактивности (52–430 ГБк/ммоль) из $[^3\text{H}]$ эйкозатриеновой кислоты. Идентифицированы основные компоненты смеси полученных меченых простагландинов. Изучена зависимость выхода PGE_1 и его молярной радиоактивности от соотношения компонентов полиферментной системы и от молярной радиоактивности субстрата. Даны рекомендации для препаративного получения меченых простагландинов.

Простагландины (PG) — высокоэффективные внутриклеточные биологические регуляторы, которые находят широкое применение в медицине и промышленном животноводстве [1].

Изотопно-меченые простагландины являются одним из основных инструментов для изучения механизма действия и метаболизма этих веществ. В качестве меток чаще всего применяют тритий и углерод-14. Особой ценностью как радиоактивный индикатор обладает тритий благодаря мягкости его излучения, возможности его введения практически в любую органическую молекулу и, наконец, высоким значениям достигаемой молярной радиоактивности [2].

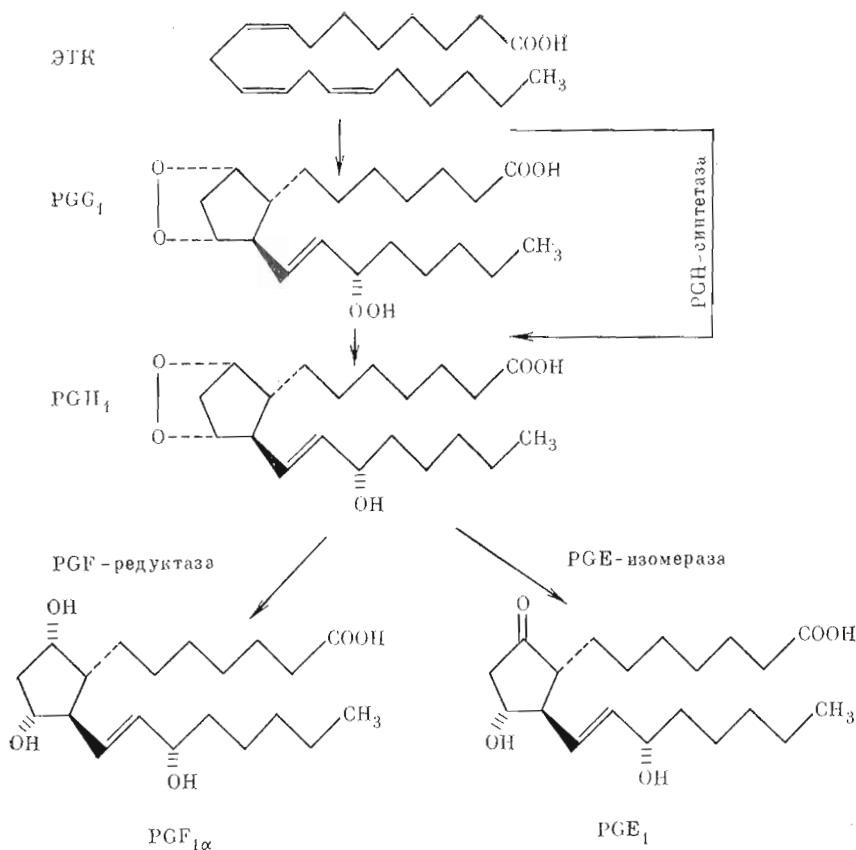
Введение тритиевой метки в органическую молекулу можно осуществить полным химическим синтезом, изотопным обменом, каталитическим гидрированием, «горячим» синтезом, биохимическими методами и т. д. [2].

Ферментативный синтез меченых простагландинов из соответствующих предшественников представляется наиболее перспективным, так как позволяет получить меченые соединения в мягких условиях без заметных радиолитических разрушений. Процесс протекает одностадийно и быстро. При этом получают простагландины природной конфигурации с высокой молярной радиоактивностью. Кроме того, ферментативный синтез простагландинов протекает специфично по отношению к структуре и стереоизомерии субстрата и может служить тестом на сохранение исходной конфигурации меченной тритием эйкозатриеновой кислоты ($[^3\text{H}]$ ЭТК) [3].

Цель данной работы — изучение превращения в простагландины $[^3\text{H}]$ ЭТК высокой молярной радиоактивности (936 ГБк/ммоль), полученной гетерогенным каталитическим гидрированием ацетиленового предшественника газообразным тритием на палладиевых катализаторах.

В качестве катализатора ферментативного синтеза простагландинов использовали простагландинсинтетазный комплекс из везикулярных желез барана (схема). Основным продуктом реакции при использовании свежеприготовленных микросом является простагландин E_1 (PGE_1) [4]. Фермент PGE -изомеразы отличается крайней нестабильностью ($\tau_{1/2} \approx 30$ мин при 25°C) [5], и в процессе дальнейшей обработки микросом (отмывка:

Сокращения: PG — простагландин, ЭТК — 8,11,14-эйкозатриеновая кислота.



перхлоратом натрия и солиubilизация мембранных белков твином-20) PGE-изомеразная активность препарата полностью теряется, что дает возможность рассматривать свежевыделенные микросомы (М) как препарат биферментной системы (PGH-синтетаза + PGE-изомераза), а солиubilизированный белок (S) — как первый компонент этой системы (PGH-синтетазу).

Идентификация продуктов ферментативного синтеза. На рис. 1, где представлено распределение радиоактивности экстрагированных продуктов биосинтеза после разделения их ТСХ, отмечено пять зон со значениями R_f 0,12; 0,21; 0,37; 0,62 и 0,83. Первые четыре зоны совпадают по хроматографической подвижности с $PGF_{2\alpha}$, PGE_2 , PGB_2 и ЭТК, которые были использованы в качестве стандартов. Подвижности простагландинов E_2 , $F_{2\alpha}$ и B_2 в условиях ТСХ близки к подвижностям простагландинов E_1 , $F_{1\alpha}$ и B_1 соответственно [6]. Вещество с R_f 0,83 нами не было идентифицировано.

Идентичность основного продукта биосинтеза, имеющего R_f 0,21, простагландину E_1 установили путем его щелочной изомеризации в PGB_1 [7]. Для этого выделенное с пластинки вещество растворяли в 2,5 мл смеси этанол — вода (10 : 2) и добавляли 100 мкл 8 М KOH — в УФ-спектре появлялось характерное для PGB_1 поглощение с максимумом при 278 нм [7]. При этом вещество с R_f 0,21 полностью превращалось в индивидуальный радиоактивный продукт с R_f 0,37, как и стандартный PGB_2 . В дальнейшем щелочной изомеризацией пользовались для количественного определения PGE_1 .

Продукт биосинтеза с R_f 0,37 элюировали с хроматограммы и установили его идентичность простагландину H_1 следующими методами [8]:

1) инкубация элюата с микросомами везикулярных желез барана, после чего 50% радиоактивности перемещалось из зоны R_f 0,37 в зону с R_f 0,21

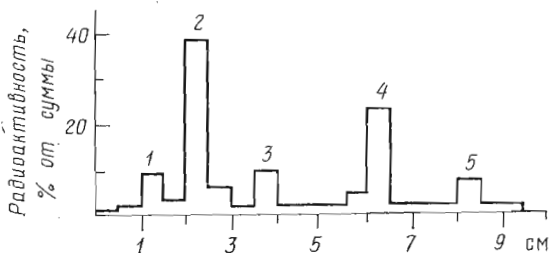


Рис. 1

Рис. 1. Радиохроматограмма реакционной смеси после инкубации [^3H]ЭТК с микро-сомами везикулярных желез барана. Условия — см. «Экспер. часть»; взято микросом 50 мкг, солиubilizированных микросом 150 мкг, время инкубации 5 мин. 1 — $\text{PGF}_{1\alpha}$, 2 — PGE_1 , 3 — PGH_1 , 4 — ЭТК, 5 — не идентифицировано. За 100% принята суммарная радиоактивность пластинки

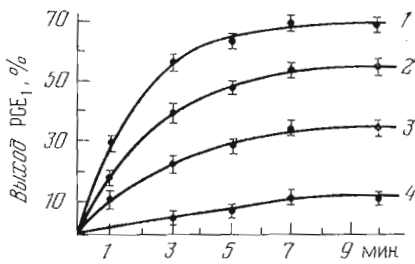


Рис. 2

Рис. 2. Выход простагландина E_1 (по реакции щелочной изомеризации) в зависимости от концентрации восстановленного глутатиона (мМ): 1 — 1,5; 2 — 1,0; 3 — 0,5; 4 — 0. Взято микросом 50 мкг, время инкубации 5 мин, остальные условия — см. «Экспер. часть»

(PGE_1) и 26% — в зону с R_f 0,12 ($\text{PGF}_{1\alpha}$). При такой же процедуре в отсутствие фермента в зону с R_f 0,21 переходило 12% радиоактивности и в зону с R_f 0,12 — 5% за счет неферментативного разрушения вещества [6];

2) восстановление вещества с R_f 0,37 действием SnCl_2 . В результате 52% радиоактивности переходило в зону с R_f 0,12 ($\text{PGF}_{1\alpha}$). Эти данные позволяют заключить, что вещество с R_f 0,37 — простагландин H_1 , промежуточный продукт ферментативного синтеза.

Кинетика накопления продуктов при ферментативном синтезе. Выход продуктов при ферментативном превращении [^3H]ЭТК при разных соотношениях белковых фракций М и S не является линейной функцией от времени проведения реакции; это отражает тот факт, что первый фермент биферментной системы (PGH -синтетаза) инактивируется в процессе реакции [9].

Согласно табл. 1, по мере обогащения реакционной смеси белковой фракцией S с высокой PGH -синтетазной активностью, но без PGE -изомеразной активности в реакционной смеси увеличивается количество простагландина $\text{F}_{1\alpha}$. Соотношение $\text{PGF}_{1\alpha}/\text{PGE}_1$ равно нулю в отсутствие белковой фракции S и достигает наибольшего значения ($0,6 \pm 0,08$) в отсутствие белковой фракции М. Это дает основание считать, что появление простагландина $\text{F}_{1\alpha}$ в системе обусловлено исключительно неферментативным разрушением простагландина H_1 , который в водной среде неустойчив ($\tau_{1/2} = 5$ мин) и распадается с образованием простагландинов E_1 и $\text{F}_{1\alpha}$, 12-*L*-оксигептадекадиеновой кислоты и малонового диальдегида [6].

Выход простагландина E_1 в изучаемой системе зависит от концентрации восстановленного глутатиона, специфического кофактора PGE -изомеразы [10]. Изменение концентрации восстановленного глутатиона, влияя на конечный выход продукта, не меняет форму кинетических кривых (рис. 2). Полученный результат доказывает, что лимитирующим звеном в биферментной системе является PGH -синтетаза, которая быстро и необратимо инактивируется в процессе реакции. Пренебрежимо малый выход PGE_1 в отсутствие восстановленного глутатиона (рис. 2, 4) свидетельствует о том, что PGE_1 в нашей системе образуется в основном за счет специфического расщепления PGH_1 в присутствии PGE -изомеразы.

Влияние молярной радиоактивности исходной кислоты. В табл. 2 показана зависимость выхода PGE_1 и его молярной радиоактивности от соотношения белковых фракций М и S и от молярной радиоактивности исходной кислоты при одинаковых условиях инкубации. В качестве субстрата была использована [^3H]ЭТК двух молярных радиоактивностей — 111 и 936 ГБк/ммоль.

По мере повышения концентрации белковой фракции S, обогащенной PGH -синтетазой, происходит увеличение выхода по массе меченого про-

Выход продуктов инкубации [^3H]ЭТК (%) при различных соотношениях компонентов ферментной системы

S – солибилизованные микросомы, М – микросомная фракция. Условия инкубации см. в «Экспер. части»

S	M	Время, мин	PGF _{1α}	PGE ₁	PGH ₁	ЭТК	Не идентифицировано
50	0	1	—	—	9	75	11
		5	7	9	12	54	15
		10	8	12	15	45	19
0	50	1	—	12	—	80	5
		5	—	21	—	65	10
		10	—	30	—	50	18
150	50	1	—	22	—	72	3
		5	—	41	6	44	5
		10	8	43	10	26	11
300	50	1	—	32	—	60	5
		5	13	53	10	11	13
		10	15	56	12	—	13

Таблица 2

Выход и молярная радиоактивность [^3H]PGE₁ при различных соотношениях белковых фракций S и M и при разной молярной радиоактивности исходной кислоты

Молярная радиоактивность исходной кислоты 936 (А) и 111 ГБк/ммоль (Б). Условия инкубации см. в «Экспер. части», время инкубации 10 мин

Белок (мкг) во фракциях		Относительный выход [^3H]PGE ₁ , % от исходной кислоты				Молярная радиоактивность [^3H]PGE ₁ , ГБк/ммоль	
S	M	по массе		по радиоактивности		А	Б
		А	Б	А	Б		
0	50	52	49	31	43	430	52
150	50	78	74	43	61	428	53
300	50	86	84	56	71	435	53

Таблица 3

Гидрирование 8,11,14-эйкозатриинового кислоты газообразным тритием

Концентрация трития в смеси с водородом, %	Растворитель	Катализатор	Давление, гПа	Метиловый эфир [^3H]ЭТК		[^3H]ЭТК (после омыления)		
				Выход, %	Радиохимическая чистота, %	Выход, %	Радиохимическая чистота, %	Молярная радиоактивность, ГБк/ммоль
3	Диоксан	5% Pd/BaSO ₄ + хинолин	200	15	95	60	95	111
3	Пиридин	5% Pd/BaSO ₄	333	45	95	60	95	111
80	Диоксан	5% Pd/BaSO ₄ + хинолин	200	15	95	86	95	936

дукта, которое не зависит от начальной радиоактивности субстрата (табл. 2). В то же время молярная радиоактивность PGE₁ во всех случаях составляет ~50% молярной радиоактивности исходной кислоты, так как в процессе биосинтеза тритиевая метка вымывается. При этом соотношение белковых фракций на молярную радиоактивность PGE₁ не влияет.

Выход по радиоактивности можно рассматривать как своеобразный радиохимический к. п. д. ферментативного синтеза. Из табл. 2 видно, что увеличение молярной радиоактивности исходного субстрата от 111 до 936 ГБк/ммоль уменьшает выход меченого продукта (PGE₁) примерно в 1,3 раз. По-видимому, это связано либо с изотопными эффектами, т. е. при обогащении тритием субстрата его превращение в PGE₁ происходит мед-

леннее, либо с ингибированием ферментов продуктами радиоллиза, возникающими при распаде трития.

Таким образом, независимо от состава катализатора и от исходной радиоактивности радиоактивность основного продукта биосинтеза PGE, составляет 46–48% молярной радиоактивности субстрата.

Эти результаты дают основание рекомендовать для препаративного получения [^3H]PGE, молярной радиоактивности от 50 до 500 ГБк/ммоль метод ферментативного синтеза с использованием в качестве субстрата [^3H]ЭТК вдвое большей молярной радиоактивности.

Экспериментальная часть

Применяли простагландин E_2 производства Института химии АН ЭССР, глутатион восстановленный, гемин (феррипротопорфирин) и трис(оксиметил)аминометан(трис) фирмы Sigma (США), *L*-адреналин (Merck, ФРГ), простагландины $\text{F}_{2\alpha}$ и B_2 (Upjohn, США), метиловый эфир ЭТК 98%-ной чистоты (по данным ГЖХ) производства МИТХТ. Катализаторы на основе палладия готовили по методу [11] с применением 5% Pd/BaSO₄. Гидрирование ацетиленового предшественника ЭТК смесью трития и водорода проводили в ампулах, которые использовали в работе [12] (условия гидрирования — в табл. 3). [^3H]ЭТК очищали по методу [13]. Химическую чистоту определяли ГЖХ (хроматограф Varian 2100; 3% SE-30, на хромосорбе W-HP, 80–100 меш; температура колонки 170°С; гелий, 30 мл/мин; пламенно-ионизационный детектор. Удерживаемый объем измеряли относительно удерживаемого объема метилстеарата: для метилового эфира 8,11,14-эйкозатриинового кислоты — 2,60, для метилового эфира ЭТК — 1,58).

Ферментативный синтез простагландинов проводили по методу [14]. 50 мкМ [^3H]ЭТК (936 ГБк/ммоль) инкубировали в присутствии простагландинсинтетазы в течение 1–10 мин при 36°С. Состав реакционной смеси: буферный раствор 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,1% твин-20, 10⁻³ М восстановленный глутатион, 10⁻³ М адреналин, 4·10⁻⁶ М гемин, микросомы и (или) солюбилизованный препарат белка (5 мг/мл). Объем реакционной смеси 200 мкл. Реакцию останавливали добавлением лимонной кислоты до рН 3,0, экстрагировали 500 мкл этилацетата. Органическую фазу высушивали 6 мг Na₂SO₄ и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 0,5 мл этанола и аликвоты по 50 мкл анализировали на силуфолу UV 254 (ЧССР) в системе этилацетат — этанол — уксусная кислота (100 : 1 : 1); обнаружение осуществляли фосфорномолибденовой кислотой. Препаративное разделение проводили на пластинках Merck (ФРГ). Все растворители для хроматографии — производства «Союзреактив» марки ч. д. а.

Препараты микросом и солюбилизованных микросом получали по методу [15] из везикулярных желез барана.

Молярную радиоактивность продуктов определяли путем измерения массы и радиоактивности полученного меченого простагландина E_1 . Массу измеряли фотометрически после щелочной изомеризации [7]. Радиоактивность регистрировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark-III (США), эффективность регистрации трития в диоксановом сцинтилляторе 35%.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 124 (Япония).

ЛИТЕРАТУРА

1. Osterling T. O., Morozowich W., Roseman T. I. J. Pharm. Sci., 1972, v. 61, № 12, p. 1861–1895.
2. Эванс Э. Тритий и его соединения. М.: Атомиздат, 1970, с. 87.
3. Hamberg M., Samuelsson B. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 22, p. 5336–5343.
4. Feigen L. P., Hyman A. L. Fed. Proc., 1981, v. 40, № 7, p. 1985–1986.
5. Ogino N., Miyamoto T., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 3, p. 890–894.
6. Nugteren D. H., Hazelhof E. Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 326, № 3, p. 448–461.
7. Bygdeman M., Samuelsson B. Clin. chim. acta, 1964, v. 10, № 5, p. 566–568.

8. Hamberg M., Samuelsson B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70, № 3, p. 889-892.
9. Samuelsson B. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 13, p. 3011-3014.
10. Cheng W. Y., Wyche A., Lysz Th., Needleman P. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 24, p. 14632-14634.
11. Lindlar H. Helv. chim. acta, 1952, v. 35, № 2, p. 446-449.
12. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Берггальсон Л. Д. Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 736-741.
13. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Берггальсон Л. Д. Химия природн. соедин., 1980, № 2, с. 148-157.
14. Лилле Ю., Мянник А., Ягомляги А., Самель Н., Сакс Т. Изв. АН ЭССР. Химия, 1979, т. 28, № 3, с. 145-150.
15. Ogino N., Miyamoto T., Yamamoto S., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 3, p. 840-845.

Поступила в редакцию
27.XII.1983
После доработки
9.IV.1984

ENZYMATIC SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELED PROSTAGLANDINS FROM [³H]EICOSATRIENOIC ACID

DUKAT L. P.,* VRZHESHCH P. V., SHEVCHENKO V. P.,*
LYS Ya. I.,* MYAGKOVA G. I.,** YAKUSHEVA L. A. **, MEVKH A. T.,
VARFOLOMEEV S. D., FEDOSEEV V. M.,* MYASOEDOV N. F.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

**Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow; **M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical
Technology, Moscow*

The preparative enzymatic synthesis of tritium-labeled prostaglandins E₁, F_{1α} and H₁ of high specific activity (52-430 GBQ/mmol) from [³H]eicosatrienoic acid has been described. The main components of the mixture of labeled prostaglandins have been identified. The dependence of the yield of labeled PGE₁ and its specific activity on the ratio of the components of the enzymatic system and on the specific activity of the substrate has been studied.