



УДК 577.158+546

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ  
В [<sup>3</sup>H]ЭЙКОЗАТРИЕНОВОЙ КИСЛОТЕ, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ  
ГЕТЕРОГЕННОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ

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

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
им. А. Н. Белозерского;*

*\* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Изучено внутримолекулярное распределение трития в молекуле (8Z, 11Z, 14Z)-8,11,14-эйкозатриеновой кислоты, полученной методом гетерогенного каталитического восстановления ацетиленового предшественника тритием в растворе. С помощью периодат-перманганатного окисления показано, что распределение трития зависит от параметров реакции восстановления. Получена меченая кислота высокой молярной радиоактивности (3120 ГБк/ммоль), содержащая тритиевую метку практически только при двойных связях. Показано отсутствие кинетических изотопных эффектов при ее ферментативной циклизации, катализуемой РGN-синтетазой из везикулярных желез барана. Предложен метод селективной экстракции ионных ассоциатов жирной кислоты с метиленовым синим для определения ее молярной радиоактивности в процессе биосинтеза простагландинов.

Все возрастающий интерес к биологической роли простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов обуславливает необходимость разработки эффективных методов получения меченых предшественников этих веществ — полиеновых жирных кислот. Такие методы должны давать соединения с высокой молярной радиоактивностью и высоким выходом, а также обеспечивать простоту операций и низкую стоимость конечного продукта. Этим требованиям отвечает метод гетерогенного каталитического восстановления (ГКВ) полииновых кислот тритием [1]. Использование метода ГКВ предполагает осуществление контроля за распределением метки в молекуле продукта, так как известно, что при ГКВ метиловых эфиров полииновых кислот на металлах палладиевой группы наряду с реакцией селективного восстановления тройных связей происходят по крайней мере четыре нежелательных процесса: дальнейшее насыщение образующихся двойных связей (так называемое перегидрирование), реакция изотопного обмена в аллильных положениях, Z → E-изомеризация и миграция двойных связей по цепи [2]. Реакцию «перегидрирования» подавляют с помощью различных дезактивирующих катализатор добавок: диацетата свинца, хинолина, пиридина [3]. Кроме того, продукты этой реакции легко отделяются при очистке конечного продукта. Хроматография на силикагеле, пропитанном солями серебра, позволяет избавиться от E-изомеров и продуктов миграции двойной связи [2, 4]. Однако очистить продукт от примесей, различающихся только наличием трития в аллильных положениях, обычными методами, очевидно, нельзя, и поэтому при проведении ГКВ особенно важно исключить реакции изотопного обмена.

Распределение изотопов водорода в молекуле полиеновой жирной кислоты может иметь решающее значение для кинетики накопления продуктов ее ферментативного (и неферментативного) окисления. Так, окисление (13S)-13-<sup>3</sup>H-эйкозатриеновой кислоты (ЭТК) РGN-синтетазой из ве-

Сокращения: ГКВ — гетерогенное каталитическое восстановление, ЭТК — (8Z, 11Z, 14Z)-8,11,14-эйкозатриеновая кислота.

зикулярных желез барана [5] или липоксигеназой из соевых бобов [6] сопровождается значительным изотопным эффектом. Включение атомов дейтерия в метиленовые положения пентадиеновых структур октадекатриеновой кислоты также приводит к торможению ее конверсии в продукты как под действием липоксигеназ из соевых бобов и из тромбоцитов человека, так и в результате неферментативного окисления [7].

Данная работа посвящена исследованию распределения тритиевой метки в препаратах [ $^3\text{H}$ ]эйкозатриеновой кислоты, полученной методом ГКВ ацетиленового предшественника тритием на катализаторах палладиевой группы, с целью выбора условий, при которых побочные процессы сводятся к минимуму.

Фермент РGH-синтетаза (КФ 1.14.99.1) из везикулярных желез барана осуществляет превращение (8Z, 11Z, 14Z)-8, 11, 14-эйкозатриеновой кислоты в простагландин  $\text{H}_1$ . Эта реакция протекает специфично по отношению к структуре и стереоизомерии субстрата [8] и может служить тестом на сохранение исходной конфигурации меченной тритием ЭТК. Лимитирующей стадией реакции окислительной циклизации ЭТК является отщепление 13-*pro-S*-атома водорода [5]. Поэтому, если в процессе ГКВ не происходит включения трития в метиленовые положения пентадиеновой структуры ЭТК, в частности в положение 13S, при окислительной циклизации [ $^3\text{H}$ ]ЭТК в присутствии РGH-синтетазы изотопные эффекты не должны наблюдаться. В случае же замедления конверсии меченых молекул ЭТК по сравнению с немечеными есть основание предполагать наличие метки в метиленовых положениях C-10 и C-13 молекулы жирной кислоты.

Изотопные эффекты были исследованы нами путем сравнения молярных радиоактивностей исходного ( $A_0$ ) и непрореагировавшего ( $A_t$ ) субстрата при высоких степенях конверсии (ср. [9]). Наличие изотопных эффектов должно приводить к росту величины  $A_t/A_0$  с увеличением степени конверсии субстрата в продукты, тогда как в отсутствие изотопных эффектов  $A_t/A_0=1$ . Для определения общей концентрации непрореагировавшей ЭТК был использован метод экстракции хлороформом солей органических кислот из щелочных растворов в виде их ионных ассоциатов с катионным красителем — метиленовым синим [10]. Мы показали, что простагландины в отличие от своих жирнокислотных предшественников не образуют экстрагируемых в хлороформ ионных ассоциатов. Данные по экстракции ассоциатов арахидоновой кислоты с метиленовым синим в присутствии  $\text{PGE}_2$  и  $\text{PGF}_{2\alpha}$  свидетельствуют (рис. 1), что трех—пятикратный избыток простагландинов не влияет на определение кислоты. Использование экстракции ассоциатов с катионным красителем нам представля-

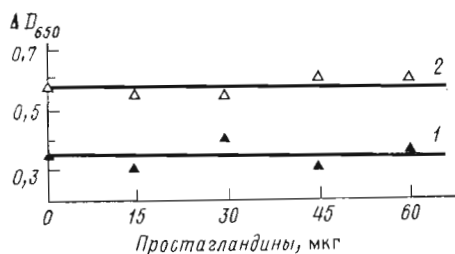


Рис. 1

Рис. 1. Экстракция арахидоновой кислоты метиленовым синим в присутствии  $\text{PGE}_2$  и  $\text{PGF}_{2\alpha}$ : 1 —  $\text{PGE}_2$ , 12 мкг арахидоновой кислоты, 2 +  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 17 мкг арахидоновой кислоты. Условия эксперимента см. в «Экспер. части»

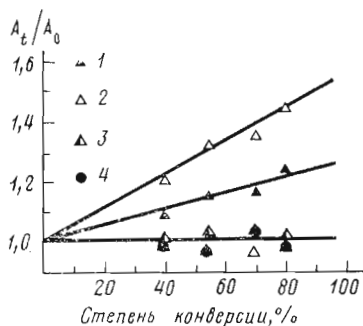


Рис. 2

Рис. 2. Обогащение тритием непрореагировавшего субстрата при ферментативном окислении в присутствии РGH-синтетазы: 1 — 1-й препарат [ $^3\text{H}$ ]ЭТК (111 ГБк/ммоль), 2 — 2-й препарат [ $^3\text{H}$ ]ЭТК (936 ГБк/ммоль), 3 — 3-й препарат [ $^3\text{H}$ ]ЭТК (3120 ГБк/ммоль), 4 — [ $^3\text{H}$ ]арахидоновая кислота (4084 ГБк/ммоль). Условия инкубации см. в «Экспер. части»

Условия реакции гетерогенного каталитического восстановления 8,11,14-эйкозатриеновой кислоты тритием в растворе

Препарат	Концентрация трития, %	Растворитель	Катализатор	Давление, ГПа	Время реакции, мин	Выход, %		A <sub>0</sub> , ГБк/ммоль
						химический	радиохимический	
1	3	Пиридин	А	333	120	9	95	111
2	80	Дюксан	А	200	120	13	95	936
3	100	»	Б	200	20	39	95	3120

Таблица 2

Распределение трития \* во фрагментах после периодат-перманганатного окисления разных препаратов [<sup>3</sup>H]эйкозатриеновой, [<sup>3</sup>H]арахидоновой и немеченой эйкозатриеновой кислоты

Препарат [ <sup>3</sup> H]ЭТК или контроль	A <sub>0</sub> , ГБк/ммоль	Содержание трития во фрагментах, %			
		[ <sup>3</sup> H]H <sub>2</sub> O	[ <sup>3</sup> H](CH <sub>2</sub> (COOH)) <sub>2</sub>	[ <sup>3</sup> H]HO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CO <sub>2</sub> H	[ <sup>3</sup> H]CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H
1	111	60,7±2,4	31,2±1,3	2,9±0,3	0,3±0,04
2	936	42,2±1,9	44,8±2,0	4,1±0,3	6,3±0,4
3	3120	79,8±3,6	12,9±0,8	3,2±0,3	1,9±0,2
[ <sup>3</sup> H]арахидоновая кислота	4084	88,1±3,7	11,4±0,7	0	0
ЭТК + [ <sup>3</sup> H]H <sub>2</sub> O (1,85 ГБк)	—	0	9,1±0,5	0,3±0,03	0,1±0,02

\* В случае препаратов 1—3 приведенные данные усреднены по результатам трех экспериментов, и случае контрольных опытов — по результатам четырех экспериментов.

ется наиболее подходящим методом для определения молярной радиоактивности непрореагировавшего субстрата, так как в результате одних и тех же операций происходит и отделение непрореагировавшей кислоты (что позволяет определять ее радиоактивность), и установление общей ее концентрации путем измерения оптической плотности хлороформного экстракта. Вследствие быстрой и необратимой инактивации фермента PGN-синтетазы в процессе реакции [11] кинетику окисления ЭТК можно определять только в ограниченном промежутке времени. Поэтому для быстрой остановки процесса реакцию смесь подкисляли до pH 3,0 и проводили экстракцию субстрата и продуктов реакции этилацетатом. Органические кислоты из этилацетатного экстракта переводили в водную фазу при pH 10,0, а затем осуществляли избирательную экстракцию полярных ассоциатов ЭТК с метиленовым спиром.

В настоящей работе были исследованы свойства трех препаратов меченой тритием ЭТК, различавшихся условиями проведения процесса ГКВ метилового эфира ацетиленового предшественника тритием в растворе (см. табл. 1).

На рис. 2 представлены результаты измерения молярной радиоактивности субстрата в зависимости от степени его ферментативного превращения для различных препаратов [<sup>3</sup>H]ЭТК и [<sup>3</sup>H]арахидоновой кислоты. Как видно из рис. 2, в случае 1-го и 2-го препаратов [<sup>3</sup>H]ЭТК наблюдается заметное замедление конверсии меченого субстрата по сравнению с немеченым. Для 3-го препарата [<sup>3</sup>H]ЭТК и взятого в качестве контроля препарата [<sup>3</sup>H]арахидоновой кислоты фирмы Amersham (содержащего тритий только при двойных связях) скорость конверсии меченого и немечено-

го субстрата была одинаковой (отношение  $A_i/A_0=1$ ). Таким образом, третий препарат [ $^3\text{H}$ ]ЭТК и [ $^3\text{H}$ ]арахионовая кислота не проявляют изотопных эффектов при окислительной циклизации, катализуемой РГН-синтетазой из везикулярных желез барапа.

В процессе периодат-перманганатного окисления [ $^3\text{H}$ ]ЭТК образуются четыре продукта: тритиевая вода, малоновая, пробковая и капроновая кислоты. Измерение радиоактивности этих веществ позволяет оценить содержание трития в четырех фрагментах молекулы [ $^3\text{H}$ ]ЭТК: при двойных связях, в положениях С-10 и С-13, в карбоксильном и алкильном участках [2].

Результаты изучения внутримолекулярного распределения тритиевой метки в молекуле [ $^3\text{H}$ ]ЭТК приведены в табл. 2. Их рассмотрение показывает, что основной побочной реакцией процесса каталитического восстановления тритием в нашей системе является включение  $^3\text{H}$  в положения С-10 и С-13 жирной кислоты, которое составляет 45, 30 и 13% по радиоактивности для 2-го, 1-го и 3-го препаратов [ $^3\text{H}$ ]ЭТК соответственно. Неожиданным оказался результат периодат-перманганатного окисления препарата [ $^3\text{H}$ ]арахионовой кислоты фирмы Amersham, в результате которого мы обнаружили 11% радиоактивности в малоновой кислоте. Поскольку в этом препарате, по данным фирмы, 100% радиоактивности локализовано при двойных связях, возникло предположение, что тритий включается в малоновую кислоту за счет изотопного обмена с образующимися молекулами тритиевой воды в процессе окисления. И действительно, когда немеченая ЭТК была подвергнута периодат-перманганатному окислению в присутствии тритиевой воды, в малоновую кислоту включилось 9% от начальной активности тритиевой воды. Изотопный обмен метиленовых водородов малоновой кислоты с тритиевой водой сопровождается, следовательно, процесс периодат-перманганатного окисления метиленразделенных полиненасыщенных жирных кислот и приводит к кажущемуся увеличению содержания трития в метиленовых положениях пентадиеновых структур. Тем не менее можно сделать качественный вывод относительно уменьшения содержания трития при С-10 и С-13 в ряду 2-й — 1-й — 3-й препарат [ $^3\text{H}$ ]ЭТК, а 13 и 11% содержания трития в малоновой кислоте после окисления [ $^3\text{H}$ ]ЭТК 3-го препарата и [ $^3\text{H}$ ]арахионовой кислоты фирмы Amersham обусловлены, по-видимому, изотопным обменом с тритиевой водой.

Как следует из табл. 1 и 2, молярная радиоактивность и распределение метки в молекуле [ $^3\text{H}$ ]ЭТК существенным образом зависят от параметров реакции восстановления. При краткосрочном (20 мин) проведении реакции в диоксане при давлении газообразного трития 200 ГПа с использованием катализатора Линдлара (3-й препарат) как удельная радиоактивность получаемого продукта, так и содержание трития при двойных связях максимальны.

Таким образом, в работе показано, что метод ГКВ в найденных нами условиях позволяет получить меченую ЭТК, которая по распределению метки (в пределах ошибки метода периодат-перманганатного окисления), по молярной радиоактивности, приходящейся на одну двойную связь, и по поведению в реакции окислительной циклизации, катализуемой РГН-синтетазой, удовлетворяет требованиям, предъявляемым к ней как субстрату для синтеза меченых простагландинов.

### Экспериментальная часть

[5,6,8,9,11,12,14,15- $^3\text{H}_s$ ]Арахидоновая кислота — препарат фирмы Amersham, метиловый эфир 8,11,14-эйкозатриинового кислоты 98% чистоты по данным ГЖХ — препарат, полученный в МИТХТ им. М. В. Ломоносова. Реакцию ГКВ тритием проводили на установке, описанной в работе [12], при молярном соотношении палладий — вещество 1 : 1. Катализаторы на основе палладия готовили по методу [13]. Использовали катализатор А — 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (холодное осаждение) и катализатор Б — 5% Pd/BaSO<sub>4</sub>, обработанный диацетатом свинца по Линдлару (см. табл. 1). Химическую чистоту [ $^3\text{H}$ ]ЭТК определяли методом ГЖХ (хроматограф

Varian-2100, 3% SE-30 на хромосорбе WHP, 80–100 меш, температура колонки 170°С, гелий, 30 мл/мин, пламенно-ионизационный детектор); удерживаемый объем измеряли относительно метилстеарата: для метилового эфира 8,11,14-эйкозатриинового кислоты он составлял 2,60, а для метилового эфира 8,11,14-эйкозатриеновой кислоты — 4,58.

Полученные меченые кислоты в виде метиловых эфиров были очищены от продуктов «перегидрирования» ТСХ в системе гексан — эфир (9 : 1) и от продуктов миграции двойной связи по цепи и *E*-изомеров ТСХ на пластинках Silufol, импрегнированных 12% раствором нитрата серебра, в системе бензол — этилацетат — диоксан — уксусная кислота (10 : 10 : 10 : 1,4) [2]. Омыление метиловых эфиров проводили по методу [3].

Внутримолекулярное распределение трития в меченой кислоте определяли методом ее периодат-перманганатного окисления [2]. Содержание трития при двойных связях вычисляли по уменьшению радиоактивности смеси продуктов реакции окисления после отгонки тритиевой воды в результате четырехкратной обработки метанолом и бензолом. Радиоактивность фрагментов, образовавшихся в результате окисления меченой кислоты, определяли после их разделения с помощью метода ТСХ на пластинках Silufol в системе хлороформ — метанол — 4 н. аммиак (65 : 25 : 14) [2].

Микросомную фракцию выделяли из везикулярных желез барана с дополнительной обработкой перхлоратом натрия по методу [14] и использовали в виде суспензии в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащей 4,8 мг белка/мл. Реакцию ферментативной циклизации [<sup>3</sup>H]ЭТК проводили в объеме 200 мкл при 36°С. Состав реакционной смеси: 5·10<sup>-4</sup> М субстрат, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,1% твин-20, 10<sup>-3</sup> М восстановленный глутатион, 10<sup>-3</sup> М адреналин, 4·10<sup>-6</sup> М гемин. Инкубацию проводили в течение 20, 40, 60 и 180 с. Реакцию останавливали подкислением 5 мкл 8% НСООН (до рН 3,5). Экстракцию проводили 200 мкл этилацетата. Водную фракцию отбрасывали. 100 мкл органической фракции добавляли к 1 мл 5 мМ раствора метиленового синего в 200 мМ Na-боратном буфере (рН 10,0) и энергично встряхивали 30 с на установке для встряхивания пробирок «Миксер ВП» (СССР). Органический слой отбрасывали, к 1 мл водной фазы добавляли 1 мл хлороформа и проводили экстракцию связанной с метиленовым синим ЭТК. Хлороформный экстракт разбавляли 1,5 мл хлороформа, после чего измеряли поглощение на спектрофотометре Hitachi-124 (Япония) при 650 нм [10]. Точно такая же процедура, но в отсутствие фермента и при разных концентрациях кислоты проводилась при построении калибровочной кривой для нахождения зависимости  $\Delta D_{650}$  от концентрации кислоты. После определения оптической плотности хлороформный экстракт обесцвечивали добавлением нескольких миллиграммов дитионита натрия и помещали 0,5 мл его в 5 мл диоксанового сцинтиллятора для определения радиоактивности непрореагировавшей [<sup>3</sup>H]ЭТК.

Радиоактивность измеряли дифференциальным методом на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark III (Searle, США) с эффективностью регистрации трития, равной 35%.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам МИТХТ им. М. В. Ломоносова Г. И. Мягковой и Л. А. Якушевой за предоставление препарата эйкозатриинового кислоты.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gray J. I., Russell L. F. J. Amer. Oil Chem. Soc., 1979, v. 54, № 1, p. 36–43.
2. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. Химия природ. соединений, 1980, № 2, с. 148–157.
3. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 906–910.
4. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Волгин Ю. В., Бергельсон Л. Д. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 9, с. 1338–1344.
5. Hamberg M., Samuelsson B. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 22, p. 5336–5343.
6. Hamberg M., Samuelsson B. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 22, p. 5329–5335.
7. Hamberg M. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 793, № 1, p. 129–132.
8. Van Dorp D. A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1971, v. 180, № 1, p. 181–195.

9. Меландер Л., Сондерс У. Скорости реакций изотопных молекул. М.: Мир, 1983, с. 101.
10. Корейман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975, с. 227.
11. Мевх А. Т., Вржец П. В., Швядас В. Ю.-К., Варфоломеев С. Д., Мяжкова Г. И., Якушева Л. А. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 5, с. 695-702.
12. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 5, с. 730-736.
13. Lindlar H. Helv. chim. acta, 1952, B. 35, № 2, S. 446-449.
14. Van der Ouderaa F. J., Buytenhek M., Nugteren D. H., Van Dorp D. A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 487, № 2, p. 315-331.

Поступила в редакцию  
19.VII.1984  
После доработки  
26.IX.1984

## TRITIUM LABEL DISTRIBUTION IN [<sup>3</sup>H]EICOSATRIENOIC ACID OBTAINED BY HETEROGENEOUS CATALYTIC HYDROGENATION

DUCAT L. P., VRZHESHCH P. V., SHEVCHENKO V. P.\*, LYS Ya. I.,  
MEVKH A. T., VARFOLOMEEV S. D., MYASOEDOV N. F.\*, FEDOSEEV V. M.

*A. N. Belozersky Laboratory, M. V. Lomonosov State University, Moscow;*

*\* Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Intramolecular distribution of tritium in the labelled eicosatrienoic acid obtained by heterogeneous catalytic hydrogenation of an acetylenic precursor with gaseous tritium in solution has been investigated. Tritium distribution depends on the catalytic hydrogenation parameters. The labelled acid possesses high specific activity (3120 GBq/mmol) and contains tritium only at the double bonds. Lack of kinetic isotope effects during its oxidation catalyzed by PGH-synthetase from ovine vesicular glands was found. Specific activity of the labelled acid in course of prostaglandin biosynthesis can be determined by selective extraction of ionic associates of the acid with methylene blue.