



УДК 546.110.23:577.175.856

НАПРАВЛЕННЫЙ БИОСИНТЕЗ КРАТНОМЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ  
ПРОСТАГЛАНДИНА F<sub>2α</sub>

Якушева Л. А., Нагаев И. Ю.\*, Лазуркина Т. Ю.\*,  
Шевченко В. П.\*, Мяжкова Г. И., Евстигнеева Р. П.,  
Мясоедов Н. Ф.\*

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;  
\*Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

С помощью подбора специфических активаторов PGF-редуктазы и определения их оптимального соотношения осуществлен направленный биосинтез PGF<sub>2α</sub> с выходом 45–50%. Используя [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]арахидоновую кислоту, удалось синтезировать кратномеченный PGF<sub>2α</sub> с молярной радиоактивностью 6,1 ТБк/ммоль.

Простагландин F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) нашел широкое применение в кардиологии, акушерстве и гинекологии, а также в животноводстве для регуляции репродуктивной функции животных. Все это определяет большой интерес к исследованиям по направленному биосинтезу PGF<sub>2α</sub>. Кроме того, PGF<sub>2α</sub> может служить исходным соединением для синтеза простагландинов [1], в том числе и меченных тритием.

Известно, что превращение полиеновых кислот в простагландины осуществляется в присутствии полиферментного комплекса простагландинсинтетазы — ряда ферментов, локализованных в мембранах эндоплазматического ретикулума [2]. PG-Эндопероксидаза, одна из составляющих этого комплекса, действуя как циклооксигеназа и пероксидаза, катализирует окисление полиеновой кислоты до эндоперексидов — PGG и PGH соответственно. Активность данного фермента стимулируется соединениями — донорами водорода, например адреналином или гидрохиноном [3]. Затем осуществляется превращение PGH в классические простагландины действием соответствующих изомераз и редуктаз. Найдены различные ингредиенты, способствующие образованию того или иного простагландина. Например, восстановленный глутатион [4] — для PGE; липоевая кислота [5], комплекс ионов меди с дитиотрептом [6, 7], хлористое олово [6], соли магния [8] — для PGF.

Без специально подобранных условий выход PGE при биосинтезе более чем в 15 раз превышает выход PGF.

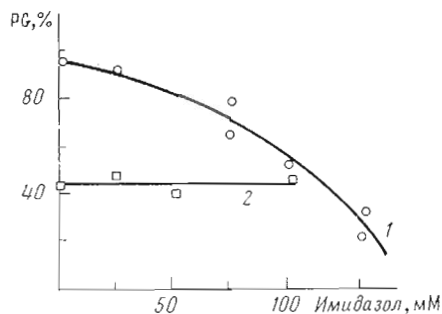
Цель данной работы — исследование возможностей направленного биосинтеза кратномеченного тритием PGF<sub>2α</sub>.

Как отмечалось выше, определенные добавки сильно влияют на состав и соотношение продуктов биосинтеза арахидоновой кислоты. В связи с этим проблема направленного биосинтеза PGF заключается в подборе эффективных ингибиторов биосинтеза других эйкозаноидов и специфического активатора PGF-редуктазы. Одним из потенциальных претендентов на роль ингибитора мог оказаться специфический ингибитор биосинтеза тромбосана [9] — имидазол. Действительно, имидазол показал ингибирующее действие на PGE-изомеразу (рисунок), но при этом выход PGF<sub>2α</sub> практически не изменился (рисунок).

В качестве других добавок, воздействующих на полиферментный комплекс, применялись хлористое олово, липоевая кислота, ионы меди, дитиотрепт, адреналин и гидрохинон (табл. 1, 2). Кроме того, изучалось влияние на выход PGF<sub>2α</sub> времени инкубации и температуры реакционной среды (табл. 3), а также ингибирование биосинтеза экзогенным PGF<sub>2α</sub>.

Полученные данные показали, что добавление экзогенного PGF<sub>2α</sub> не только полностью ингибировало биосинтез PGF<sub>2α</sub>, но также угнетало био-

Зависимость выхода простагландинов  $E_2$  (1) и  $F_{2\alpha}$  (2) от концентрации имидазола в присутствии 4 мМ адреналина (1, 2) и 5 мМ хлористого олова (2). Условия реакции: арахидоновая кислота 3,3 мМ, 0,24 г гомогената везикулярных желез барана (20 мин, 25° С), 0,1 М трис-НСI-буфер (рН 8,0). Объем инкубационной массы 1,5 мл



синтез других эйкозаноидов (2,3 мМ  $PGF_{2\alpha}$  — на 6%, 3,7 мМ  $PGF_{2\alpha}$  — на 36%).

Преимущество использования хлористого олова в направленном биосинтезе  $PGF_{2\alpha}$  очевидно, так как соотношение  $PGF_{2\alpha}$  —  $PGE_2$  в этом случае равно 44,0 : 3,0 (табл. 1, № 5), в то время как при других сочетаниях добавок лучшим соотношением было 32,7 : 6,6 (табл. 1, № 6).

Исследование зависимости выхода  $PGF_{2\alpha}$  от соотношений адреналин — хлористое олово и гидрохинон — хлористое олово (табл. 2) показало, что максимальный выход наблюдался при соотношении адреналин — хлористое олово 4 : 10, а гидрохинон — хлористое олово 0,9 : 10. Оптимальными временем инкубации и температурой реакционной смеси были 20 мин и 25° С (табл. 3).

Таблица 1

Влияние различных добавок на ферментативный синтез простагландинов  $F_{2\alpha}$  и  $E_2$  \*

Номер опыта	Соединение-добавка	$PGF_{2\alpha}$	$PGE_2$
1	—	19,0	12,0
2	4 мМ адреналин	28,4	7,4
3	2,0 мМ глутатион восстановленный, 4 мМ адреналин	4,0	63,0
4	10 мМ хлористое олово	23,2	3,9
5	10 мМ хлористое олово, 4 мМ адреналин	44,0	3,0
6	2 мМ липоевая кислота, 4 мМ адреналин	32,7	6,6
7	3 мМ дитиотреит, 1,5 мМ сульфат меди, 4 мМ адреналин	54,4	18,7
8	16 мМ сульфат магния, 2,0 мМ глутатион восстановленный	17,6	56,6

\* Условия реакции см. подпись к рисунку; отличия: время — 30 мин, температура — 30° С. Приведена радиоактивность, отвечающая зоне данного простагландина, на пластинке при ТСХ, в процентах от суммарной радиоактивности.

Таблица 2

Влияние концентрации хлористого олова, адреналина и гидрохинона на выход простагландинов  $F_{2\alpha}$  \*

Соединение-добавка, мМ			$PGF_{2\alpha}$	$PGE_2$	Соединение-добавка, мМ			$PGF_{2\alpha}$	$PGE_2$
SnCl <sub>2</sub>	адреналин	гидрохинон			SnCl <sub>2</sub>	адреналин	гидрохинон		
—	4	—	28,1	4,6	10	—	0,9	52,0	—
5	4	—	47,4	—	10	—	1,2	50,0	—
10	4	—	50,0	—	10	—	—	23,2	3,9
15	4	—	33,8	—	10	2	—	44,0	—
20	4	—	21,5	—	10	6	—	47,0	—
10	—	0,3	37,0	—					

\* См. примечание к табл. 1; t 25° С, время 20 мин.

Влияние условий инкубации на ферментативный синтез простагландинов \*

Температура, °С	Время реакции, мин	PGF <sub>2α</sub>	PGE <sub>2</sub>
25	5	9,8	—
25	10	16,7	—
25	20	50,6	—
25	30	47,0	4,0
25	20	50,6	—
30	20	45,2	—
35	20	32,3	13,7

\* См. примечание к табл. 1; 10 мМ SnCl<sub>2</sub>, 4 мМ адреналин.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что в продуктах инкубации арахидоновой кислоты (3,3 мМ) с 0,24 г гомогената везикулярных желез барана в присутствии 10 мМ хлористого олова, 0,9 мМ гидрохинона или 4 мМ адреналина в течение 20 мин при 25°С присутствовал практически один PGF<sub>2α</sub> с выходом ~50%. Есть основания считать одной из причин неполной степени превращения арахидоновой кислоты в PGF<sub>2α</sub> ингибирование PGH-синтетазы конечным продуктом биосинтеза PGF<sub>2α</sub>.

Отработанная методика позволила при использовании [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]арахидоновой кислоты (молярная радиоактивность 6,3 ТБк/ммоль) получить [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]PGF<sub>2α</sub> с молярной радиоактивностью 6,1 ТБк/ммоль и выходом 40–45%.

### Экспериментальная часть

Простагландины, арахидоновая кислота, восстановленный глутатион, адреналин, гидрохинон, дитиотреит, липоевая кислота, неорганические соли – коммерческие препараты. Растворители очищали по стандартным методикам. [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]-Арахидоновая кислота получена по методу [10]. Полиферментный комплекс выделяли по методу [11]. Выход PGE<sub>2</sub> определяли спектрофотометрически по методу [12]. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония). Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью регистрации трития ~30% в диоксановом сцинтилляторе [13]. Для анализа полученных соединений использовали ТСХ на пластинках «Silufol» (ЧССР) в системе хлороформ – метанол – уксусная кислота (90 : 9 : 1) для простагландинов (R<sub>f</sub> для E<sub>2</sub> – 0,32, для F<sub>2α</sub> – 0,21), а также в системе хлороформ – ацетон (1 : 1) для их метиловых эфиров (R<sub>f</sub> для E<sub>2</sub> – 0,68, для F<sub>2α</sub> – 0,45), сопоставляя их хроматографическую подвижность с хроматографической подвижностью стандартов. Для определения распределения радиоактивности вдоль пластинки использовали Bertold/2027 (ФРГ). Кроме того, идентификацию полученных PGE<sub>2</sub> и PGF<sub>2α</sub> проводили с помощью ВЭЖХ на хроматографе «Милихром» (колонка 2×60 мм, Силасорб C<sub>18</sub> 7,5 мкм, система метанол – вода (4 : 3, pH 3)), сравнивая их коэффициенты удерживания (отношение исправленного объема удерживания к «мертвому» объему колонки) с коэффициентами удерживания стандартов (7,8 для PGE<sub>2</sub> и 9,2 для PGF<sub>2α</sub>). Препаративную очистку кратномеченного тритием PGF<sub>2α</sub> осуществляли с помощью ВЭЖХ в тех же условиях, что и анализ. Радиохимическая чистота препарата – 95–97%.

*Ферментативный синтез* простагландинов осуществляли инкубацией 5 мкмоль арахидоновой кислоты, содержащей 20 мКи [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]арахидоновой кислоты с 0,24 г ферментного препарата в присутствии различных добавок (табл. 1–3, рисунок). Реакцию проводили в 0,1 М трис-НСI-буфере, pH 8,0. Объем реакционной смеси 1,5 мл. Реакцию инцидировали добавлением в инкубационную смесь спиртового раствора арахидоновой кислоты. Порядок добавления компонентов обусловлен неустойчивостью PGH<sub>2</sub> и возможностью неферментативного разрушения его до PGE<sub>2</sub> и PGF<sub>2α</sub> [14].

*Получение кратномеченного PGF<sub>2α</sub>*. Ферментный препарат (0,1 мл, 5 мг белка) в 0,1 М трис-НСI-буфере, pH 8, суспендировали в 0,05 мл того же буфера, содержащего 0,3 мкмоль адреналина и 0,9 мкмоль хлористого олова, затем добавляли 0,3 мкмоль [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]арахидоновой кислоты с молярной радиоактивностью 6,3 ТБк/ммоль. Инкубацию проводили 20 мин при 25°С. Реакцию останавливали добавлением 2 М раствора лимонной кислоты до pH 3, разбавляли 2 мл воды и экстрагировали простагландины хлороформом (5×1 мм). Объединенные экстракты промывали водой, сушили сульфатом натрия, сушитель отфильтровывали, раствор упаривали и очищали продукт высокоэффективной хроматографией. Выход

и молярная радиоактивность приведены в тексте. [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]PGF<sub>2α</sub> с удельной радиоактивностью 37 МБк/мл хранили в растворе вода – этанол (3:7) при -16° С.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Whittaker N. // *Tetrahedron Lett.* 1977. № 32. P. 2805–2808.
2. Pace-Asciak C. R. // *Prostaglandins.* 1977. V. 13. № 5. P. 811–817.
3. Egan R. W., Gale P. M., Kuehl F. A. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 9. P. 3295–3302.
4. Ogino N., Miyamoto T., Yamamoto S. // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. № 3. P. 890–895.
5. Marnett L. G., Wilcozi C. L. // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. V. 487. № 1. P. 222–230.
6. Дукот Л. П., Вржеш П. В., Шевченко В. П., Лыс Я. И., Мягкова Г. И., Якушева Л. А., Мевх А. Т., Варфоломеев С. Д., Федосеев В. М., Мясоедов Н. Ф. // *Биоорганической химии.* 1984. Т. 10. № 10. С. 1395–1400.
7. Lee R. E., Land W. E. M. // *Biochim. et biophys. acta.* 1972. V. 260. № 2. P. 203–211.
8. Устынюк Т. К., Брагинцева Л. М., Бобылев Р. В., Коваленко В. А., Тимофеева Ю. М. // *Фармация.* 1983. № 1. С. 20–22.
9. Chignard M., Vargaftig B. B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1978. V. 85. № 4. P. 1631–1639.
10. Шевченко В. П., Нагаев Н. Ю., Лазуркина Т. Ю., Мясоедов Н. Ф., Мягкова Г. И., Якушева Л. А., Евстигнеева Р. П. // *Радиохимия.* 1985. Т. 27. № 2. С. 81–89.
11. Шевченко В. П., Фетисова И. В., Лазуркина Т. Ю., Нагаев Н. Ю., Мясоедов Н. Ф. // *Химия природ. соединений.* 1985. № 3. С. 319–322.
12. Bugdeman M., Samuelsson B. // *Clin. chim. acta.* 1964. V. 10. № 5. P. 566–568.
13. Kinnard F. E. // *Rev. Sci. Instr.* 1957. V. 28. P. 293.
14. Nugteren D. H., Hazelhof E. // *Biochim. et biophys. acta.* 1973. V. 326. № 3. P. 448–461.

Поступила в редакцию  
7.IV.1987

После доработки  
7.VII.1987

#### DIRECTED BIOSYNTHESIS OF PROSTAGLANDIN F<sub>2α</sub> MULTIPLE-LABELLED WITH TRITIUM

YAKUSHEVA L. A., NAGAEV I. Yu.\*, LAZURKINA T. Yu.\*,  
SHEVCHENKO V. P.\*, MYAGKOVA G. I., EVSTIGNEEVA R. P.,  
MYASOEDOV N. F.\*

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology;*

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

By selecting specific activators of PGF reductase and determining their optimal ratio, we have performed the directed biosynthesis of PGF<sub>2α</sub> with a 45–50% yield. With the use of [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H<sub>8</sub>]arachidonic acid, multiple-labelled PGF<sub>2α</sub> with molar radioactivity 6.4 TBe/mmol has been synthesised.