



УДК 546.11*2*3:577.175.859'17

ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ КРАТНОМЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ
ПРОСТАГЛАНДИНОВ А, В, F

Шевченко В. П., Лазуркина Т. Ю., Мисоедов Н. Ф.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Изучен процесс образования простагландинов А, В, F из простагландина Е. Из высоко меченых простагландинов Е₁ и Е₂ синтезированы меченные тритием простагландины А₁, А₂, В₁, В₂, F_{1α}, F_{2α}, F_{1β}, F_{2β} с высокими молярными радиоактивностями.

Необходимость получения кратномеченых аналогов для изучения регулярного действия и метаболизма эйкозаноидов общеизвестна. Без них невозможны многие медицинские, биохимические и другие исследования.

Способы получения простагландинов А, В, F из простагландина Е известны [1—3], однако при работе с кратномечеными соединениями эти методики, как правило, неприменимы. Это связано с тем, что в предлагаемых условиях (высокая концентрация реагентов, продолжительное время реакций) лучевая нагрузка столь велика, что выход искомым продуктом становится неудовлетворительным.

Данная работа посвящена отработке методов получения кратномеченых тритием простагландинов А, В и F, при которых выходы целевых препаратов достаточно велики, а радиационные повреждения минимальны.

PGA обычно получают из PGE путем обработки последнего 0,5 н. HCl в диоксане в течение 48 ч при комнатной температуре с выходом 64% в виде трудноразделимой смеси [1]. Для оптимизации условий получения кратномеченого PGA проведена серия экспериментов с варьированием температуры и концентрации соляной кислоты (рис. 1).

Степень превращения PGE в PGA определяли по увеличению поглощения при длине волны 218 нм ($\epsilon=9500$, диоксан) [1].

Из рис. 1а видно, что скорость образования PGA из PGE при комнатной температуре увеличивалась с ростом количества добавленной 1 н. HCl от 5 до 100 мкл. При этом, как показало распределение радиоактивности вдоль аналитических пластинок, радиохимическая чистота PGA максимальна (85—90%) при добавлении к реакционной смеси 20 мкл (время реакции 6 ч). Поэтому для исследования зависимости скорости реакции от температуры в реакционную смесь добавляли 20 мкл 1 н. HCl (рис. 1б).

При 30° С (время реакции 4 ч) и 50° С (время реакции 1 ч) PGE превращается в PGA с выходом 75—80% при радиохимической чистоте 85—95%. Оптимальное время проведения реакций определялось из кинетических кривых, изображенных на рис. 1б. В случае использования в качестве исходных соединений кратномеченных тритием PGE₁ и PGE₂ выход PGA₁ и PGA₂ составил 73—75%.

PGV получали из PGE под действием щелочи [2]. При исследовании образования PGV в зависимости от силы основания и полярности растворителя оказалось, что скорость реакции не менялась при переходе от КОН к этилату натрия и *трет*-бутилату калия в качестве катализаторов, в то время как при увеличении полярности растворителя скорость реакции уменьшалась. Кроме того, исследовалась зависимость скорости изомеризации PGE в PGV от концентрации щелочи и температуры (рис. 2). Степень превращения PGE в PGV определяли по увеличению поглощения при длине волны 279 нм ($\epsilon=28\ 000$).

Сокращения: PG — простагландин.

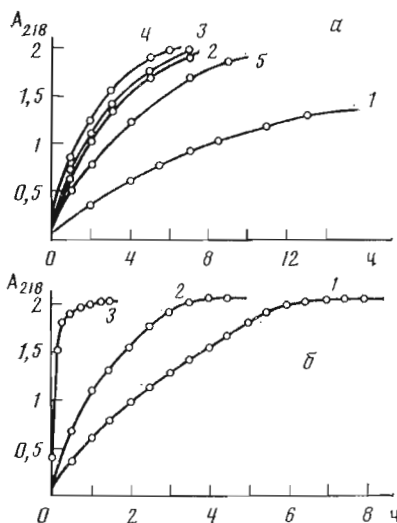


Рис. 1. Кинетика образования PGA_2 из PGE_2 в зависимости от количества добавленной кислоты (а) и от температуры реакционной среды (б). а — t 20° С; количество 1 н. HCl : 5 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4), 200 мкл (5); б — добавлено 20 мкл 1 н. HCl , температура 20 (1), 30 (2), 50° С (3)

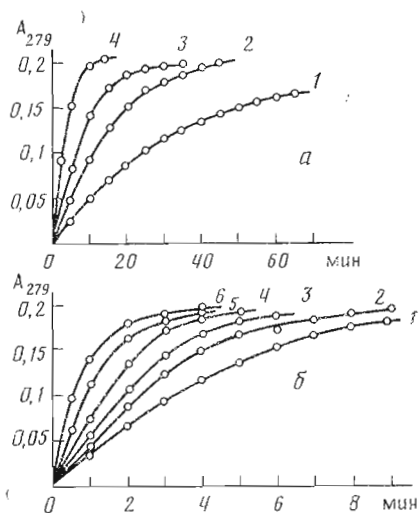


Рис. 2. Кинетика образования PGV_2 из PGE_2 в зависимости от количества добавленной щелочи (а) и от температуры реакционной среды (б). а — t 25° С; количество 8 н. KOH : 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 мкл (4); б — добавлено 20 мкл 8 н. KOH , температура 25 (1), 30 (2), 35 (3), 40 (4), 45 (5), 50° С (6)

При увеличении концентрации щелочи и температуры скорость реакции увеличивается, причем уже при 30° С при добавлении 8 н. KOH начиная с 10 мкл выход PGV во всех случаях 85–95%. Оптимальное время проведения реакций определялось из кинетических кривых, показанных на рис. 2.

На основании исследований для препаративного получения кратномеченных тритием PGV реакцию проводили при 35° С в течение 10 мин в присутствии 20 мкл 8 н. KOH . Выход $[\text{}^3\text{H}]\text{PGV}$ составил 79–80%.

Для оценки возможного влияния изотопных факторов на скорость превращения PGE_2 в PGV_2 была изучена кинетика этого процесса для PGE_2 , $[\text{}^5, \text{}^6, \text{}^8, \text{}^{11}, \text{}^{12}, \text{}^{14}, \text{}^{15}\text{-}^3\text{H}_7]\text{PGE}_2$ и $[\text{}^5, \text{}^6, \text{}^8, \text{}^{11}, \text{}^{12}, \text{}^{14}, \text{}^{15}\text{-}^2\text{H}_7]\text{PGE}_2$ (рис. 3а). Кинетика подобного процесса может быть описана уравнением

$$v = k[\text{PGE}_2] \cdot [\text{OH}^-],$$

где k — константа скорости дегидратации при данной температуре.

При проведении реакции с добавлением большого избытка щелочи (20 мкл 8 н. KOH на 8 мкг PGE_2) скорость реакции является функцией лишь концентрации PGE_2 и может быть описана уравнением

$$\ln \frac{[\text{PGE}_2]_0}{[\text{PGE}_2]_0 - [\text{PGV}_2]} = k't,$$

где k' — кажущаяся константа скорости дегидратации при данной температуре.

Выбранная нами математическая модель согласуется с экспериментальными данными. Наблюдается линейная зависимость логарифма отношения начальной концентрации PGE_2 к концентрации PGE_2 в данный момент от времени (рис. 3б). Константа скорости для природного PGE_2 оказалась равной $2,246 \cdot 10^{-4}$, для $[\text{}^2\text{H}]\text{PGE}_2$ — $1,316 \cdot 10^{-4}$, для $[\text{}^3\text{H}]\text{PGE}_2$ — $1,775 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, т. е. скорость дегидратации $[\text{}^2\text{H}]\text{PGE}_2$ ниже скорости дегидратации $[\text{}^3\text{H}]\text{PGE}_2$. Это можно объяснить тем, что процесс дегидратации для этих соединений, по-видимому, должен начинаться с отщепления изотопа водорода от молекулы простагландина с образованием ацилоксидного сопряженного основания. Затем происходит мономолекулярное выделение OH^- из сопряженного основания и образование двойной

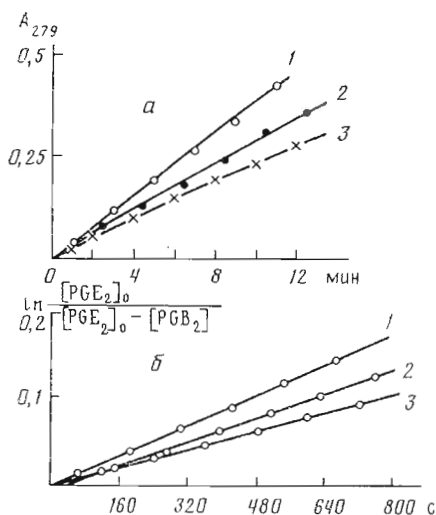


Рис. 3. Кинетика образования PGV_2 из PGE_2 (1), $[^3H]PGV_2$ из $[^3H]PGE_2$ (2), $[^2H]PGV_2$ из $[^2H]PGE_2$ (3) (20 мкл 8 н. КОН, $35^\circ C$, 10 мин). а — изменение поглощения во времени; б — зависимость величины логарифма отношения начальной концентрации PGE_2 к концентрации PGV_2 в данный момент от времени

связи, сопряженной с карбонильной группой. Поэтому изотоп водорода, принимая участие в химических превращениях, влияет на скорость дегидратации. Относительно небольшой изотопный эффект можно объяснить тем, что скорость реакции дегидратации в основном определяется скоростью отщепления гидроксильной группы. Наименьшую константу скорости при дегидратации $[^2H]PGE_2$ можно объяснить многостадийностью процесса и перекрытием эффекта снижения скорости в медленно протекающих стадиях за счет смещения равновесия в быстро протекающих стадиях, а также специфическим сдвигом нулевых уровней энергии активированных комплексов медленных стадий при отщеплении изотопа [4].

Для вычисления энергии активации дегидратации PGE с образованием PGA и PGV была определена зависимость констант скорости от температуры в арренгусовских координатах (для вычисления констант скорости реакций при разных температурах использовалась приведенная выше математическая модель).

Вычисленные таким образом энергии активации дегидратации PGE^* и в случае образования PGA (кислый катализ), и в случае образования PGV (основной катализ) сопоставимы (7,1–8,5 ккал/моль). Это, по-видимому, связано с тем, что в обеих реакциях величина энергии активации определяется энергией активации реакции отщепления гидроксильной группы от молекулы простагландина.

Величины молярных радиоактивностей меченых простагландинов, полученных из $[^3H]PGE$

Соединение	Молярная радиоактивность, ТБк/ммоль	Соединение	Молярная радиоактивность, ТБк/ммоль
PGA_1	1,4	$PGF_{1\alpha}$	1,7
PGA_2	4,3	$PGF_{1\beta}$	1,7
PGV_1	1,3	$PGF_{2\alpha}$	5,2
PGV_2	3,9	$PGF_{2\beta}$	5,2

PGF получали восстановлением PGE при 10-кратном избытке $NaBH_4$. Реакцию вели 30–40 мин при комнатной температуре [3]. Изучение кинетики этой реакции показало, что реакция полностью проходит за 5 мин при 25% мольном избытке $NaBH_4$ и комнатной температуре. В результате восстановления образовывалась смесь PGF_α и PGF_β , причем по-

* Аналогично исследованиям по превращению PGE_2 в PGA_2 и PGV_2 (рис. 1, 2) проведены исследования по превращению PGE_1 в PGA_1 и PGV_1 . При этом оказалось, что закономерности образования PGA_1 и PGA_2 , PGV_1 и PGV_2 при изменении температуры реакционной смеси, концентрации щелочи и кислоты одни и те же. Энергии активации дегидратации PGE_1 и PGE_2 практически идентичны.

следнего получалось несколько больше. Эта смесь легко разделялась с помощью хроматографии на силикагеле. Выход PGF_{α} составил 35–36%, $PGF_{1\beta}$ — 37–39, $PGF_{2\alpha}$ — 34–36, $PGF_{2\beta}$ — 39–40%.

Все высокоочищенные препараты были получены с радиохимической чистотой 95–97%. Их выходы приведены в тексте, а молярные радиоактивности — в таблице.

Экспериментальная часть

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью регистрации 12% в диоксановом сцинтилляторе. УФ-спектры снимали на спектрофотометре Spereord M40 (ГДР). Распределение радиоактивности вдоль пластинки определяли на сканере Berthold/2027 (ФРГ). Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки Silufol (ЧССР). ТСХ простагландинов проводили в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота (90 : 9 : 1). PGE_1 и PGE_2 — коммерческие препараты отечественного производства, PGA , PGB , PGF_1 — коммерческие препараты фирмы Serva (ФРГ). Обсчет кривых (рис. 1, 2) производили на ПЭКВМ «Искра-226». $[5,6,8,11,12,14,15\text{-}^3H_7]PGE_2$ и $[5,6,8,11,12,14,15\text{-}^3H_7]PGE_2$ (молярная радиоактивность 5,5 ТБк/ммоль) получены биосинтетическим путем из соответствующих высокоочищенных полиеновых кислот с использованием в качестве ферментного препарата микросомальной фракции гомогената везикулярных желез барана по методу [5]. $[5,6\text{-}^3H_2]PGE_1$ (1,8 ТБк/ммоль) получен селективным гидрированием *трет*-бутилдиметилсилильного производного PGF_2 по методу [6]. Этиловый спирт марки ос.ч. и диоксан «для УФ-спектроскопии» (Chemapol, ЧССР) использовали для снятия УФ-спектров без дополнительной очистки. Кинетические кривые снимали на спектрофотометре Spereord M40 (ГДР) при длине волны 218 нм для PGA и 279 нм для PGB . Молярный коэффициент поглощения этих простагландинов при данных длинах волны составляет 9500 [1] и 28 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ [2] соответственно. $NaBH_4$ перекристаллизовывали из воды.

Для снятия кинетических кривых изомеризации PGE в PGA использовали раствор 230 мкг PGE в 3 мл диоксана и вели реакцию при разных концентрациях HCl и температурах (рис. 1).

Получение высокоочищенных триглицеридов простагландинов A_1 и A_2 . 23 мкг $[^3H]PGE_1$, растворяли в 0,3 мл диоксана, добавляли 2 мкл 1 н. HCl и выдерживали реакционную смесь 4 ч при 30°С или 1 ч при 50°С. Затем реакционную смесь несколько раз упаривали с метанолом до полного удаления соляной кислоты, растворяли остаток в 0,1 мл метанола и очищали с помощью ТСХ. Меченый PGA_1 идентифицировали, сопоставляя его хроматографическую подвижность с хроматографической подвижностью стандарта. Зону, содержащую PGA_1 , вырезали и экстрагировали этилацетатом (1 мл×3). $[^3H]PGA_2$ получали из $[^3H]PGE_2$ аналогичным образом (таблица).

Для снятия кинетических кривых изомеризации PGE в PGB брали раствор 8 мкг PGE в 0,3 мл этанола и вели реакцию при разных температурах и концентрациях KOH (рис. 2), а также меняли полярность растворителя, используя смесь спирта с водой в соотношениях 4 : 1; 3 : 1; 1 : 3; 1 : 4. При этом скорости реакции менялись в отношении 3,6 : 2,5 : 1,4 : 1,0 соответственно.

Получение высокоочищенных триглицеридов простагландинов B_1 и B_2 . 8 мкг $[^3H]PGE_1$ растворяли в 0,3 мл спирта, добавляли 2 мкл 8 н. KOH и выдерживали 10 мин при 35°С. Затем раствор подкисляли 1 н. уксусной кислотой до pH 2, упаривали несколько раз с метанолом, растворяли остаток в 2 мл этилацетата, промывали водой, сушили сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 0,1 мл метанола и очищали с помощью ТСХ. Меченый PGB_1 идентифицировали, сопоставляя его хроматографическую подвижность с хроматографической подвижностью стандарта. Зону, содержащую PGB_1 , вырезали и экстрагировали этилацетатом (1 мл×3). Аналогично получали $[^3H]PGB_2$ из $[^3H]PGE_2$ (таблица).

Получение высокоочищенных триглицеридов простагландинов F_{α} и F_{β} . К 20 мкг $[^3H]PGE_1$ добавляли 2,5 мкг $NaBH_4$ (25% мольный избыток) в 0,3 мл метанола и выдерживали 5–7 мин при 20°С, затем реакционную смесь подкисляли 1 н. соляной кислотой до pH 3, упаривали метанол, остаток разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом (1 мл×3). Органические слои объединяли, промывали водой (1 мл×2), упаривали, растворяли в 0,1 мл метанола и очищали с помощью ТСХ. Меченые простагландины $F_{1\alpha}$ и $F_{1\beta}$ идентифицировали, сопоставляя их хроматографическую подвижность с хроматографической подвижностью стандартов. Аналогично получали $[^3H]PGF_{2\alpha}$ и $[^3H]PGF_{2\beta}$ из $[^3H]PGE_2$. Зоны, содержащие PGF_{α} (R_f 0,33) и PGF_{β} (R_f 0,24), вырезали и экстрагировали метанолом (2 мл×3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Corey E. J., Andersen N. A., Carlson R. M., Paust J., Vedejs E., Vlattas I., Winter R. E. K. // J. Amer. Chem. Soc. 1968. V. 90. № 9. P. 3245–3247.
2. Wallach D. P., Daniels E. G. // Biochim. et biophys. acta. 1971. V. 231. P. 445–457.
3. Tsao Yung Chen, Chand Nien Pao // Tzu Jan Chin. 1978. V. 1. P. 210. C. A. 1979: 91: 56415k.

4. Гудков В. С. // Успехи химии. 1976. Т. 55. № 3. С. 517-534.
5. Шевченко В. П., Лазуркина Т. Ю., Фетисова И. В., Мясоедов Н. Ф. // Тез. докл. I Всесоюз. совещания по проблеме «Биологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами». Звенигород, 1985. С. 22.
6. Шевченко В. П., Лазуркина Т. Ю., Мясоедов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергелсон Л. Д. // Тез. докл. I Всесоюз. совещания «Синтез и исследования простагландинов». Рига, 1982. С. 59.

Поступила в редакцию
14.VIII.1987

После доработки
24.XI.1987

**CHEMICAL SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED
PROSTAGLANDINS A, B, F**

SHEVCHENKO V. P., LAZURKINA T. Yu., MYASOEDOV N. F.

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

Formation of prostaglandins A, B and F from prostaglandin E has been studied. Synthesis of tritium-labelled prostaglandins A₁, A₂, B₁, B₂, F_{1α}, F_{2α}, F_{1β}, F_{2β} of high molar radioactivity from highly labelled PGE₁ and PGE₂ is described.