



УДК 542.978:612.397.82.35

ИНГИБИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА В ГЕПАТОЦИТАХ КРОЛИКА 3β -(ω -ГИДРОКСИАЛКОКСИ)ХОЛЕСТ-5-ЕНАМИ

© 1996 г. А. В. Малюгин, Д. К. Новиков, В. А. Косых, Е. И. Косенков, Н. В. Медведева, Н. В. Валентинова, А. Я. Штейншнейдер, А. Ю. Мишарин[#]

Институт экспериментальной кардиологии, Кардиологический научный центр РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

Поступила в редакцию 05.12.95 г.

Синтезированы 3β -(2-гидроксиэтокси)-, 3β -(4-гидроксибутокси)-, 3β -(6-гидроксигексилокси)-, 3β -(9-гидроксинонилокси)- и 3β -(2-гидрокси-2-[³H]этокси)холест-5-ены. Методом спинного зонда проведена оценка влияния синтезированных соединений на фазовый переход димиристоилфосфатидилхолина. Исследованы временные и дозовые зависимости включения 3β -(2-гидрокси-2-[³H]этокси)холест-5-ена в гепатоциты кролика (первичная культура). Показано, что 3β -(2-гидроксиэтокси)- и 3β -(4-гидроксибутокси)холест-5-ены ингибируют биосинтез холестерина из [¹⁴C]ацетата в культуре гепатоцитов кролика при 24-ч преинкубации.

Ключевые слова: синтетические стеролы, ингибиторы биосинтеза холестерина, первичная культура гепатоцитов.

Простые алкилхолестерилловые эфиры (3β -алкилхолест-5-ены), являющиеся аналогами холестерилловых эфиров жирных кислот, неоднократно использовались в исследовании метаболизма липопротеинов [1–4]. Имеются данные об ингибировании 3β -полиэтоксихолест-5-еном активности гидроксиметил-CoA-редуктазы (КФ 1.1.1.34) в культуре клеток [5, 6]. Некоторые алкилхолестерилловые эфиры, содержащие в алкильной цепи свободную гидроксильную группу, 3β -(ω -гидроксиалкокси)холест-5-ены, применялись в исследованиях бислойных липидных мембран и пленок [7–11], однако до настоящего времени их биологическая активность не изучалась.

В настоящем сообщении описано получение 3β -(ω -гидроксиалкокси)холест-5-енов (I)–(IV) и проведена оценка их влияния на биосинтез холестерина в первичной культуре гепатоцитов кролика. В соединениях (I)–(IV) полностью сохранен холестерилловый фрагмент, присутствуют гидроксильная группа, необходимая для проявления биологической активности [12], и простая эфирная связь, устойчивая к ферментативному гидролизу. Последнее обстоятельство исключает возможность превращения исследуемых соединений в цитотоксичные метаболиты, в частности в холест-4-ен-3-он [12, 13].

Гомологичные 3β -(ω -гидроксиалкокси)холест-5-ены (I)–(IV) получены реакцией 6β -метокси- $3\alpha,5\alpha$ -циклохолестана (V) с соответствующими диолами в присутствии метансульфонокислоты [14]

(схема). При проведении реакции при 150°C в отсутствие соразтворителя [14] выход целевого продукта снижался по мере уменьшения длины цепи диола и составлял 68, 36 и 12–19% для соединений (IV), (II) и (I)* соответственно. Низкий выход соединения (I) обусловлен плохой растворимостью исходного циклостерола (V) в кипящем этиленгликоле и, как следствие, превращением циклостерола в 3,5-холестадиен. При проведении реакции в сухом диоксане (кипячение в течение 30 мин) выход соединений (I)–(III) составлял 75–80% (табл. 1).

Синтез радиоактивно меченого 3β -(2-гидрокси-2-[³H]этокси)холест-5-ена (I*), необходимого для опытов в культуре клеток, представлен на схеме. Выбор гепатоцитов кролика в качестве клеточной модели для изучения влияния соединений (I)–(IV) на биосинтез холестерина обусловлен тем, что данная культура позволяет оценить важнейшие аспекты метаболизма стероидов в организме: биосинтез холестерина “de novo”, образование холестерилловых эфиров жирных кислот, желчегенез, секрецию и пиноцитоз холестерина в составе липопротеинов [15, 16]. Поскольку биологические эффекты стероидов могут зависеть и от включения их в клеточные мембраны, и от участия во внутриклеточных регуляторных процессах [17], было изучено влияние соединений (I)–(IV) на физические характеристики фосфолипидных бислойных мембран в сравнении с

[#] Автор для переписки.

* Для соединения (I) приведены выходы для реакции с 5- и 40-кратным избытком этиленгликоля.

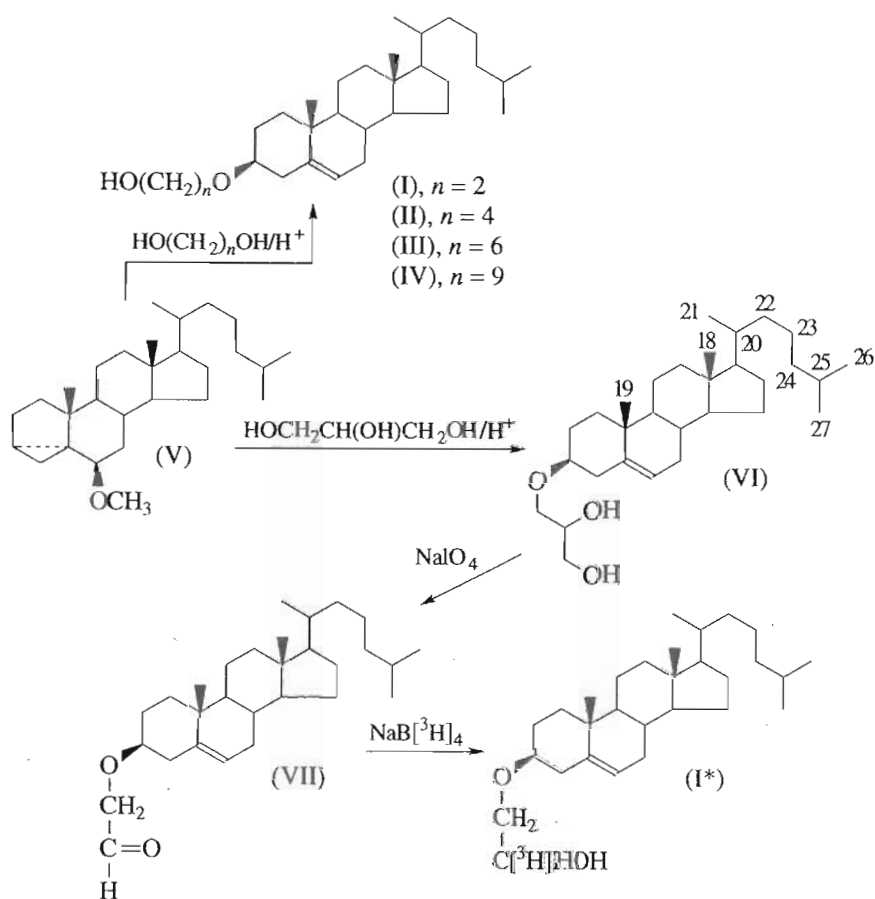


Схема.

холестерином и охарактеризовано связывание стерина (I*) с гепатоцитами в культуре.

О возмущающем действии соединений (I)–(IV) на структуру липидного бислоя димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) судили по изменениям спектров ЭПР парамагнитного зонда – 5-доксил-стеариновой кислоты в составе липосом из DMPC. При 20°C включение соединений (I)–(IV) в липосомы достигало насыщения приблизительно

за 2 ч. Влияние соединений (I)–(IV) на состояние липидного бислоя проявлялось в снижении температуры фазового перехода (T_c) и увеличении ширины интервала фазового перехода (ΔT). Степень упорядоченности ацильных цепей DMPC, характеризуемая величиной $2A_{\text{max}}$ (чем больше $2A_{\text{max}}$, тем упорядоченность выше [18]), при температурах выше T_c в присутствии соединений (I)–(IV) была больше, чем для липосом DMPC без указанных

Таблица 1. Характеристика соединений (I)–(IV)*

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	M^+ (Me_3Si -произв.)	V, мл при элюции ^{4*}	
				CH_3OH	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$, 95 : 5
Холестерин	–	–	–	10.6	27.8
(I)	80 ^{2*}	104	504	12.2	32.2
(II)	75 ^{2*}	90–92	532	14.7	39.8
(III)	76 ^{2*}	84–85	564	16.8	52.0
(IV)	68 ^{3*}	69–70	Не опр.	20.2	62.4

* Элементный анализ (С, Н) для соединений (I)–(IV) удовлетворителен.

^{2*} Алкоголиз (V) в диоксане.

^{3*} Алкоголиз (V) в отсутствие растворителя.

^{4*} ВЭЖХ (усл. см. "Экспер. часть").

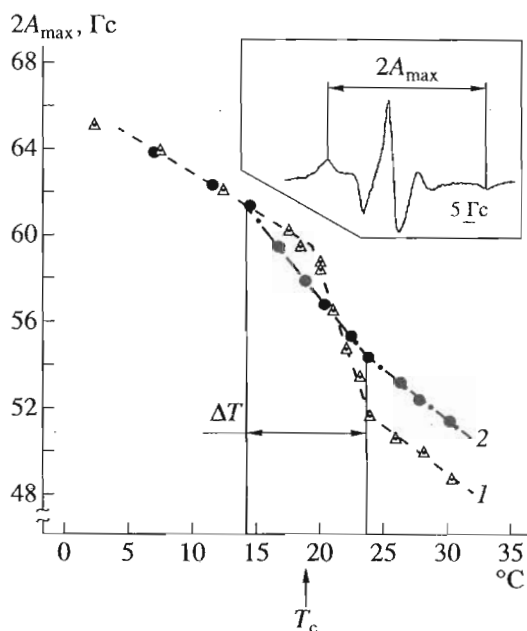


Рис. 1. Зависимость параметра $2A_{\max}$ спектра ЭПР 5-доксилстеарата от температуры в липосомах DMPC (1) и в липосомах DMPC, содержащих 20 мольных % соединения (II) (2). На врезке – экспериментальный спектр 5-доксилстеарата в липосомах DMPC. Показан параметр сверхтонкого расщепления $2A_{\max}$.

добавок (рис. 1, табл. 2). Соединения (I) и (II), обладающие наибольшей полярностью, вызывали наиболее сильные спектральные изменения, однако монотонной зависимости перечисленных параметров от длины гидроксильной цепи не выявлено.

3β -(ω -Гидроксиалкокси)холест-5-ены (I)–(IV), добавленные к первичной культуре гепатоцитов кролика в составе культуральной среды (в концентрации до 150 мкг/мл), не снижали жизнеспособности клеток. Связывание стеролов с гепатоцитами кролика иллюстрирует рис. 2а: включение соединения (I*) (при концентрациях в культуральной среде 1 и 10 мМ) имело насыщаемый характер, равновесие устанавливалось через ~3 ч. Включение стерола (I*) и [^3H]холестерина в гепатоциты кролика линейно возрастало с увеличением их концентрации в культуральной среде (рис. 2б).

Влияние соединений (I)–(IV) на скорость биосинтеза холестерина в гепатоцитах кролика оценивали по включению [^{14}C]ацетата в холестерин [19] при кратковременной (3 ч) и 24-часовой преинкубации клеток с исследуемыми соединениями. Ни одно из исследуемых соединений не влияло на синтез холестерина при 3-часовой инкубации; при 24-часовой инкубации соединения (I) и (II) ингибировали биосинтез холестерина (табл. 3). Поскольку связывание стерола (I*) с клетками достигало равновесия за 3 ч (рис. 2а), а его ингибирующий эффект проявлялся только при длительной инкубации, можно предположить, что снижение скорости биосинтеза холестерина обусловлено участием соединения (I) во внутриклеточных регуляторных процессах.

Гидроксиалкоксизамещенные производные холестерина (I) и (II) заметно снижали скорость биосинтеза холестерина в клетках в противоположность холестерину и его алкиловым эфирам, не проявляющим, как известно [17], ингибирующих свойств. Аналог холестерина, содержащий

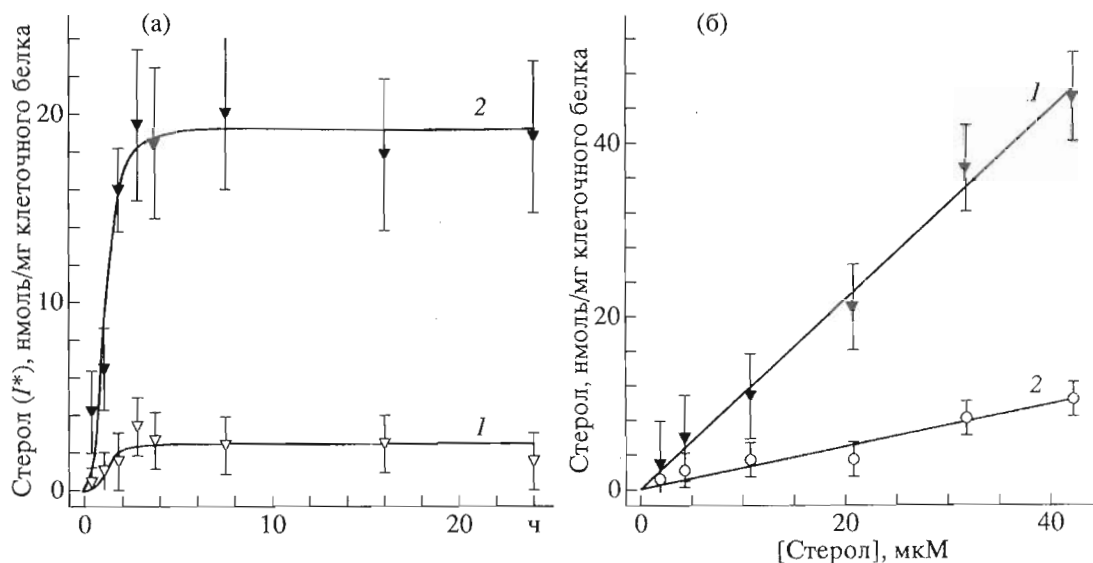


Рис. 2. Включение стерола (I*) и [^3H]холестерина в гепатоциты кролика. (а) – содержание (I*) в клетках в зависимости от времени инкубации при его концентрации в культуральной среде 1 (1) и 10 мкМ (2). (б) – зависимость связывания (I*) (1) и [^3H]холестерина (2) с клетками от концентрации стеролов в среде после 4 ч инкубации.

Таблица 2. Фазовые переходы DMPC при добавлении стерина (I)–(IV)

Стерин*	$2A_{\max}^{**}$, Гс (± 0.2)	ΔT , °С	T_c , °С (± 0.2)
Не добавлен	48.5	2.2 ± 0.2	21.7
Холестерин	49.1	2.4 ± 0.7	20.7
(I)	50.7	8.4 ± 0.5	20.5
(II)	51.4	9.0 ± 0.4	18.8
(III)	49.5	5.8 ± 0.2	20.0
(IV)	50.2	4.5 ± 0.2	19.7

* При мольной доле стерина 20%.

** Параметр сверхтонкого расщепления $2A_{\max}$ измерен при 30°С.**Таблица 3.** Влияние соединений (I)–(IV) на уровень биосинтеза холестерина в первичной культуре гепатоцитов кролика*

Соединение	Концентрация, мкМ	Уровень синтеза холестерина, %
(I)	2.5	85 ± 9
	25	49 ± 6^a
	250	30 ± 4^b
(II)	2.5	81 ± 9
	25	85 ± 3
	250	65 ± 8^a
(III)	2.5	105 ± 5
	25	94 ± 8
	250	105 ± 9
(IV)	2.5	98 ± 11
	25	96 ± 6
	250	103 ± 8

Примечание. а) $p < 0.05$, б) $p < 0.005$.* Включение [^{14}C]ацетата во фракцию холестерина в отсутствие соединений (контроль, 100%) составляло $171\,000$ расп./($\text{мин} \times 1$ мг клеточного белка $\times \text{ч}$) $^{-1}$.

вцинальную диольную группу, рацемический глицерилхолестерилэфир (VI), ингибировал синтез холестерина в клетках гепатомы Нер G2 (неопубликованные результаты), однако концентрация, вызывающая 50% ингибирование синтеза (ID_{50} 8.6×10^{-5} М), была выше, чем для соединения (I) (ID_{50} 2.4×10^{-5} М). Полагаем, что полученные результаты могут оказаться полезными в поиске новых структур, регулирующих метаболизм холестерина в клетках печени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ПМР-спектры записаны на приборе Bruker WM 500 в дейтерохлороформе. В качестве внутреннего стандарта использовался сигнал CHCl_3 в CDCl_3 ($\delta = 7.24$ от TMS). Приведены значения хим. сдвигов (δ , м. д.) и констант спин-спинового взаимодействия (J , Гц). ТСХ проводили на TLC- и HPTLC-пластинках с силикагелем G фирмы Merck в системах гексан–бензол (3 : 2), толуол–этилацетат (9 : 1, 7 : 1, 3 : 1), толуол–ацетон (9 : 1 и 5 : 1). Для обнаружения веществ использовали 5% раствор треххлористой сурьмы в сухом хлороформе и 5% раствор молибдата аммония в 10% серной кислоте. ВЭЖХ проводили на приборе Du Pont 8800, оснащенный колонкой Octadecyl Si (Serva), в метаноле и смеси метанол–вода (95 : 5) в изократическом режиме со спектрофотометрическим детектированием при 210 нм. Препаративную хроматографию проводили на силикагеле L 40–100 (Chemapol) и силикагеле G 40 (Merck), а также на пластинках PSC Kieselgel (Merck). Триметилсилильные производные получали обработкой 0.5 мг стерина смесью, состоящей из 20 мкл N,N-(бис-триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 1% триметилхлорсилана, 20 мкл абс. ацетонитрила и 10 мкл сухого пиридина. ГХ-МС-анализ проводили на приборе АБИ, снабженном колонкой DB 5 (0.32 мм \times 60 м; 0.3 мкм), при 295°С.

Этиленгликоль получен от фирмы Merck, [^3H]холестерин, [^{14}C]ацетат и $\text{NaB}[^3\text{H}]$ – от фирмы Amersham, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол и 1,9-нонандиол синтезированы из соответствующих дикарбоновых кислот фирмы Merck этерификацией метанолом в присутствии метансульфокислоты с последующим восстановлением диэфиров алюмогидридом лития. 6 β -Метокси-3 α ,5 α -циклохолестан (V) получали известным методом [20] и дважды кристаллизовали из смеси бензол–метанол (1 : 5).

3 β -(2-Гидроксиэтокси)холест-5-ен (I). Смесь 10.0 г (25 ммоль) 6 β -метокси-3 α ,5 α -циклохолестана (V), 6.0 мл (6.7 г, 107 ммоль) абс. этиленгликоля, 40 мл абс. диоксана и 100 мг метансульфокислоты кипятили 30 мин, контролируя протекание реакции методом ТСХ в системе гексан–толуол (3 : 2). Затем прибавляли избыток насыщенного раствора NaHCO_3 , экстрагировали хлороформом (3 \times 50 мл), хлороформный раствор промывали водой, сушили, остаток упаривали с ацетоном. Продукт выделяли двукратной перекристаллизацией из ацетона. Маточник упаривали, остаток наносили на колонку (2.8 \times 12 см) с силикагелем, уравновешенную толуолом, продукт элюировали смесью толуол – этилацетат (7 : 1) и кристаллизовали из ацетона. Суммарный выход 8.60 г. ПМР-спектр: 0.671 (с, 3H, CH_3 -18); 0.852 (д, 3H, J 6.6) и

0.857 (д, 3Н, *J* 6.6) (СН₃-26 и СН₃-27); 0.907 (д, 3Н, *J* 6.6, СН₃-21); 0.997 (с, 3Н, СН₃-19); 3.191 (м, 1Н, Н-3); 3.578 (м, 2Н, СОСН₂); 3.704 (т, 2Н, НОСН₂); 5.343 (м, 1Н, Н-6).

3β-(4-Гидроксипропаноил)холест-5-ен (II) получали из 1 г соединения (V) и 2.2 мл 1,4-бутандиола в присутствии следов метансульфонокислоты в диоксане по методике, описанной выше для синтеза соединения (I), выделяли на колонке с силикагелем в системе толуол–этилацетат (7 : 1) и кристаллизовали из ацетона. Выход 870 мг. ПМР-спектр: 0.661 (с, 3Н, СН₃-18); 0.847 (д, 3Н, *J* 6.6) и 0.852 (д, 3Н, *J* 6.6) (СН₃-26 и СН₃-27); 0.900 (д, 3Н, *J* 6.6, СН₃-21); 0.983 (с, 3Н, СН₃-19); 3.161 (м, 1Н, Н-3); 3.500 (м, 2Н, СОСН₂); 3.627 (т, 2Н, НОСН₂); 5.329 (м, 1Н, Н-6).

3β-(6-Гидроксигексаноил)холест-5-ен (III) получали из 1 г соединения (V) и 2.5 мл 1,6-гександиола в присутствии следов *n*-толуолсульфонокислоты в диоксане по методике, описанной выше для синтеза соединения (I), выделяли на колонке с силикагелем в системе толуол–этилацетат (7 : 1) и кристаллизовали из ацетона. Выход 910 мг. ПМР-спектр: 0.664 (с, 3Н, СН₃-18); 0.846 (д, 3Н, *J* 6.6) и 0.852 (д, 3Н, *J* 6.6) (СН₃-26 и СН₃-27); 0.902 (д, 3Н, *J* 6.6, СН₃-21); 0.987 (с, 3Н, СН₃-19); 3.109 (м, 1Н, Н-3); 3.442 (м, 2Н, СОСН₂); 3.629 (т, 2Н, *J* 6.7, НОСН₂); 5.328 (м, 1Н, Н-6).

3β-(9-Гидроксинонилокси)холест-5-ен (IV). Смесь 1.0 г (2.5 ммоль) 6β-метокси-3α,5α-циклохолестана (V), 3.1 г (19 ммоль) 1,9-нонандиола и 10 мг *n*-толуолсульфонокислоты нагревали 12 мин при 150°C, контролируя ход реакции методом ТСХ в системе гексан–толуол (3 : 2). Затем реакционную смесь экстрагировали толуолом (3 × 20 мл), толуольный экстракт промывали насыщенным NaHCO₃, сушили, упаривали с 5 г силикагеля и остаток наносили на колонку (2.8 × 12 см) с силикагелем, уравниваемую толуолом; продукт элюировали смесью толуол–этилацетат (9 : 1) и кристаллизовали из ацетона при –20°C. Суммарный выход 850 мг. ПМР-спектр: 0.664 (с, 3Н, СН₃-18); 0.850 (д, 3Н, *J* 6.6) и 0.854 (д, 3Н, *J* 6.6) (СН₃-26 и СН₃-27); 0.903 (д, 3Н, *J* 6.6, СН₃-21); 0.987 (с, 3Н, СН₃-19); 3.109 (м, 1Н, Н-3); 3.430 (м, 2Н, СОСН₂); 3.622 (т, 2Н, *J* 6.6, НОСН₂); 5.328 (м, 1Н, Н-6).

3β-[(2*R*,*S*)-3-Дигидроксипропилокси]холест-5-ен (VI). Смесь 400 мг (1.0 ммоль) соединения (V), 3 мл (3.78 г, 41 ммоль) глицерина, 10 мл сухого диоксана и 50 мкл метансульфонокислоты кипятили 30 мин, выливали в 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, трижды экстрагировали равным объемом хлороформа, хлороформный слой сушили, упаривали, остаток наносили на колонку (1.2 × 8 см) с силикагелем, уравниваемую бензолом; продукт элюировали смесью бензол–этилацетат (3 : 1),

упаривали, сушили и очищали препаративной ТСХ в системе гексан–ацетон (3 : 1) и перекристаллизацией из ацетона. Выход 220 мг (60%). ПМР-спектр: 0.666 (с, 3Н, СН₃-18); 0.850 (д, 3Н, *J* 6.6) и 0.854 (д, 3Н, *J* 6.6) (СН₃-26 и СН₃-27); 0.900 (д, 3Н, *J* 6.6, СН₃-21); 0.995 (с, 3Н, СН₃-19); 3.199 (м, 1Н, Н-3); 3.520–3.750 (м, 4Н) и 3.820 (м, 1Н) – протоны глицеринового фрагмента; 5.342 (м, 1Н, Н-6).

3β-(2-Оксобутилокси)холест-5-ен (VII). К раствору 200 мг соединения (VI) в смеси 2 мл метанола и 5 мл диоксана порциями прибавляли 300 мг NaO₄, смесь перемешивали 1 ч, после чего разбавляли 20 мл воды. Продукт экстрагировали бензолом (3 × 30 мл), бензольный экстракт сушили, упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем в бензоле. Получили 120 мг стеклообразного продукта (VII), содержащего не более 8% примесей (данные ТСХ и ЯМР) и дающего положительную реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином. Полученное вещество без дальнейшей очистки было использовано на стадии восстановления.

3β-(2-Гидрокси-2-[³H]этокси)холест-5-ен (I*). К раствору 2.4 мг соединения (VII) в 300 мкл диоксана и 100 мкл метанола при охлаждении прибавляли избыток NaB[³H]₄ (1 мг, 50 Ки/мкмоль). Смесь перемешивали 1 ч при комнатной температуре, прибавляли 100 мкл ацетона, перемешивали еще 10 мин и разбавляли 5 мл хлороформа. Хлороформный раствор трижды промывали 500 мкл насыщенного раствора сульфата натрия, упаривали и остаток хроматографировали на пластинке в системе толуол–этилацетат (7 : 1). Зону, содержащую радиоактивный (I*), элюировали этилацетатом, этилацетат упаривали и продукт дважды перекристаллизовывали, растворяя в 100 мкл кипящего ацетона с последующим выдерживанием раствора в течение 1 ч при –10°C. Выход радиоактивного соединения (I*), идентичного, по данным ТСХ и ВЭЖХ, соединению (I), составлял 1.6 мг.

Липосомы DMPC получали ультразвуковой обработкой 8 мг DMPC (Sigma) в 2 мл трис-НСl-буфера, рН 7.4, содержащего 0.14 М NaCl, в течение 45 мин при 50°C с последующим центрифугированием при 30000g в течение 5 мин или фракционированием на колонке (1.6 × 60 см) с биогелем А-50 М (Bio-Rad). Концентрацию DMPC определяли по липидному фосфору. Полученную липидную дисперсию вносили в пробирки, содержащие исследуемый стерин в виде сухой пленки (20 мольных %), и повторяли ультразвуковую обработку.

О влиянии стеролов (I)–(IV) на фазовое превращение DMPC судили по спектрам ЭПР липосом, содержащих 1% 5-доксилстеарата. Раствор 5-доксилстеариновой кислоты (Aldrich) в EtOH добавляли к липосомам до соотношения 1 моль

5-доксилстеарата/100 моль DMPC. Конечная концентрация спирта не превышала 0.5% (v/v), что не влияло на спектр ЭПР образца. Для оценки влияния стеролов на фазовое превращение DMPC в качестве спектрального параметра, характеризующего структурные изменения DMPC, было выбрано расстояние между указанными на рис. 1 (врезка) экстремумами спектра ЭПР ($2A_{\max}$). Зависимость $2A_{\max}$ от температуры аппроксимировали прямыми. Фазовый переход DMPC характеризовали параметрами ΔT (интервал фазового перехода), длиной (по оси абсцисс) отрезка с максимальным наклоном, и T_c – серединой интервала ΔT . Спектры ЭПР регистрировали на приборе E-109 Varian, оснащенный термоприставкой, при мощности СВЧ 20 мВт, частоте модуляции 100 кГц и амплитуде высокочастотной модуляции 2 Гс.

Гепатоциты выделяли из печени кролика породы шиншилла перфузией средой Игла, содержащей 0.05% коллагеназы и 0.005% трипсина [21]. Клетки вносили в 24-ячеечные пластиковые платы с плотностью 2×10^5 клеток/см² и культивировали в минимальной среде Игла, содержащей эмбриональную сыворотку теленка (10%), L-глутамин (2 мМ), канамицин (100 мкг/мл) и незаменимые аминокислоты (1%), при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Биосинтез холестерина. Гепатоциты преинкубировали со спиртовыми растворами соединений (I)–(IV) 3 и 24 ч. Концентрация этанола в культуральной среде в опытах и контроле (в отсутствие соединений) составляла 0.8% (по объему). Скорость биосинтеза холестерина оценивали по методу [19]. После инкубации с исследуемыми соединениями клетки промывали фосфатным буфером, культуральную среду заменяли на свежую, содержащую 0.1 мМ 1-[¹⁴C]CH₃COONa (5 мКи/мл среды), и продолжали инкубацию 3 ч. Клетки трижды промывали фосфатным буфером, нейтральные липиды экстрагировали смесью гексан–изопропанол (3 : 2) [19]. Клеточный остаток использовали для определения белка [22]. Липидный экстракт упаривали досуха в токе азота, липиды разделяли ТСХ в системе гексан–эфир–уксусная кислота (70 : 30 : 1), проявляли 10% раствором фосфорномolibденовой кислоты в этаноле; зоны, содержащие холестерин, соскабливали и определяли радиактивность в толуольном сцинтилляторе. Уровень биосинтеза холестерина рассчитывали по включению радиактивной метки в холестерин, нормируя на клеточный белок. Каждое определение проводили в четырех повторях. Включение радиоактивной метки в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100%. Достоверность полученных различий (*p*) оценивали по критерию Стьюдента.

Авторы благодарны А.С. Антонову и Н.К. Кабаевой за проведение экспериментов по определению цитотоксичности соединений (I)–(IV), С.В. Витту (ИПВ РАН) за проведение ГХ-МС-анализа, Российскому фонду фундаментальных исследований (РФФИ, проект 95-04-12165), Международному научному фонду, национальной программе “Атеросклероз” (проект № 221) за финансовую помощь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halperin G., Stein O., Stein Y. // *Methods Enzymol.* 1986. V. 129. (Pt B). P. 816–848.
2. Blaner W.S., Halperin G., Stein O., Stein Y., Goodman D.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 794. P. 428–434.
3. Stein Y., Stein O., Olivecrona T., Halperin G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 834. P. 336–345.
4. Halperin G., Gatt S. // *Steroids.* 1980. V. 35. P. 39–42.
5. Fung C.H., Khachadurian A.K. // *Fed. Proc.* 1979. V. 38. P. 311.
6. Fung C.H., Khachadurian A.K. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 676–681.
7. Ahmad M.S., Logani S.C. // *Aust. J. Chem.* 1971. V. 24. P. 143–151.
8. Ahmad M.S., Ansari G.A.S. // *Can. J. Spectrosc.* 1974. V. 19. P. 105–109.
9. Hudec J., Kirk D.N. // *Tetrahedron.* 1976. V. 32. P. 2475–2506.
10. Hagmann W.K., Durette P.L., Ponpipom M.M. // *US Patent* 4652553 (Cl. 514–26, A 61 K31/705). CA. V. 107.7512e.
11. Demel R.A., Lala A.K., Kumari S.N., Van Deenen L.L.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 771. P. 142–150.
12. Smith L.L., Johnson B.H. // *Free Radicals Biol. Med.* 1989. V. 7. P. 285–332.
13. Tomkins G.M., Nichols C.W., Chapman D.D., Hotta S., Chaikoff I.L. // *Science.* 1957. V. 125. P. 936–938.
14. Мишарин А.Ю. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 281–283.
15. Reese J.A., Byard J.L. // *In Vitro.* 1981. V. 17. P. 935–940.
16. Kosykh V.A., Lankin V.Z., Podrez E.A., Novikov D.K., Volgushev S.A., Victorov A.V., Repin V.S., Smirnov V.N. // *Lipids.* 1989. V. 24G. P. 109–116.
17. Smith L.L. *Cholesterol Autoxidation.* N.Y.: Plenum Press, 1981.
18. Spin Labeling – Theory and Applications // Ed. L.J. Berliner. N.Y.: Acad. Press, 1976.
19. Goldstein J.L., Basu S.K., Brown M.S. // *Methods Enzymol.* 1983. V. 98. P. 241–260.
20. Tadanier J., Cole W. // *J. Org. Chem.* 1962. V. 27. P. 4611–4617.
21. Kosykh V.A., Podrez E.A., Novikov D.K., Dolbin A.G., Repin V.S., Smirnov V.N. // *Atherosclerosis.* 1987. V. 68. P. 67–76.
22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.

Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Rabbit Hepatocytes by 3 β -(ω -Hydroxyalkoxy)cholest-5-enes

A. V. Malyugin, D. K. Novikov, V. A. Kosykh, E. I. Kosenkov, N. V. Medvedeva, N. V. Valentinova, A. Ya. Shteinshneider, and A. Yu. Misharin

Institute of Experimental Cardiology, Scientific Cardiological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Tre'tya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia

Abstract—3 β -(2-Hydroxyethoxy)-, 3 β -(4-hydroxybutoxy)-, 3 β -(6-hydroxyhexyloxy)-, 3 β -(9-hydroxynonyloxy)-, and 3 β -(2-hydroxy-2-[³H]ethoxy)cholest-5-enes were synthesized. By means of a spin probe, the influence of the synthesized compounds on the phase transition of dimyristoylphosphatidylcholine were estimated. Time and dose dependences of the incorporation of 3 β -(2-hydroxy-2-[³H]ethoxy)cholest-5-ene into rabbit hepatocytes (the primary culture) were studied. 3 β -(2-Hydroxyethoxy)- and 3 β -(4-hydroxybutoxy)cholest-5-enes were shown to inhibit cholesterol biosynthesis from [¹⁴C]acetate in rabbit hepatocyte cultures upon a 24-hour preincubation.

Key words: synthetic sterols, inhibitors of cholesterol biosynthesis, primary culture of hepatocytes.