



УДК 547.39:546.3

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПИДОВ, МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ,
ГЕТЕРОГЕННЫМ КАТАЛИТИЧЕСКИМ ИЗОТОПНЫМ ОБМЕНОМ
С ГАЗООБРАЗНЫМ ТРИТИЕМ В РАСТВОРЕ

2. ПОЛУЧЕНИЕ [³H]АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ
В ПРОСТАГЛАНДИНЫ E₂ И V₂

Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Описан новый метод получения [³H]арахидоновой кислоты, основанный на гетерогенном каталитическом изотопном обмене метиларахидоната с газообразным тритием. Предварительно были изучены гидрирующие и обменные свойства катализатора Линдлара на примере метилолеата и метилстеарата. При омылении метилового эфира [³H]арахидоновой кислоты отмечено уменьшение удельной активности. Показана пригодность полученной [³H]арахидоновой кислоты для приготовления меченых простагландинов.

Несмотря на то что радиоактивные полиненасыщенные жирные кислоты получили широкое применение в разнообразных биологических и биохимических исследованиях, описанные в литературе методы их получения обладают рядом существенных недостатков. Попытки получить меченые ненасыщенные жирные кислоты методом Вильцбаха [1] приводят в основном к присоединению трития по двойным связям. Поэтому предложен целый ряд методов, основанных на синтезе соединений, содержащих либо тройные связи, селективно восстанавливаемые газообразным тритием до двойных, либо кетонную группу с последующим восстановлением тритийсодержащими соединениями [2–5]. Так, восстановлением тройных связей до двойных была получена [³H]арахидоновая кислота с высокой удельной активностью [6]. Однако этот метод связан с трудоемким синтезом исходной полииновой кислоты и необходимостью тщательного отделения *транс*-изомеров, образующихся наряду с *цис*-изомерами при восстановлении тритием. Поэтому разработка новых простых способов прямого введения тритиевой метки в полиненасыщенные жирные кислоты представляется актуальной задачей.

Один из таких возможных способов — введение трития непосредственно в арахидоновую кислоту, полученную из природных источников, методом гетерогенного каталитического изотопного обмена с газообразным тритием в растворе. Преимущества этого метода обсуждались в предыдущем сообщении [7]. Главная трудность состоит в получении катализатора с минимальной гидрирующей активностью, но сохраняющего в достаточной мере способность катализировать гетерогенный изотопный обмен. Прове-

Таблица 1

Гидрирование метилолеата и изотопный обмен в метилстеарате на дезактивированном катализаторе

| Время реакции, ч | Гидрирование метилолеата, % | Изотопный обмен в метилстеарате, % |
|------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 | 3 | 0,65 |
| 3 | 6 | 1,1 |
| 5 | 7,5 | 1,5 |

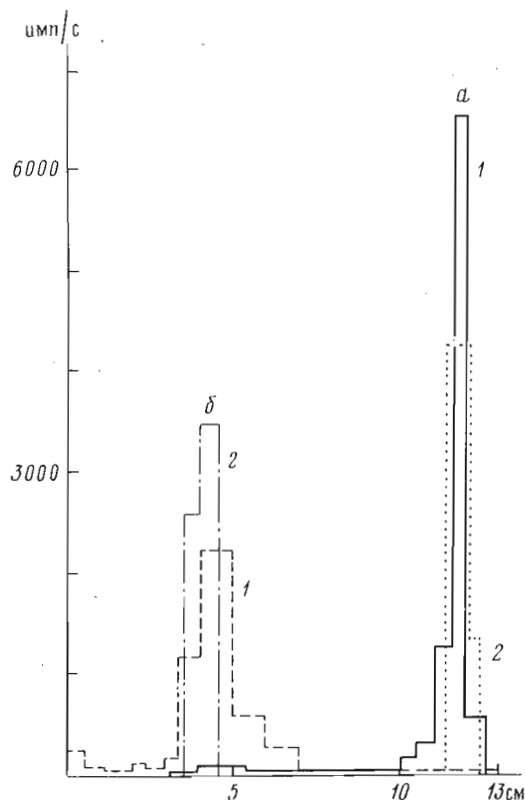
Таблица 2

Зависимость изотопного обмена в метилстеарате от растворителя

| Растворитель | Уд. акт., мКи/ммоль | Растворитель | Уд. акт., мКи/ммоль |
|--------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Диоксан | 1,07 | <i>изо</i> -Пропанол | 1,18 |
| Метанол | 1,08 | <i>изо</i> -Бутанол | 1,32 |
| Этанол | 1,21 | Петролейный эфир | 1,35 |

денные нами предварительные опыты показали, что 5% Pd/BaSO₄ независимо от растворителя превращает метилолеат количественно в метилстеарат. Поэтому мы провели частичную дезактивацию катализатора диацетатом свинца [8]. Гидрирующая способность полученного катализатора уменьшилась в 5–6 раз при уменьшении скорости изотопного обмена лишь в 2–3 раза. Были получены кинетические данные по гидрированию на этом катализаторе метилолеата и по изотопному обмену в метилстеарате (табл. 1), а также данные о влиянии растворителя на изотопный обмен в метилстеарате (табл. 2). Как видно из табл. 2, природа растворителя практически не влияет на изотопный обмен малополярных метиловых эфиров жирных кислот. Поэтому для дальнейшей работы нами был выбран диоксан, так как он не содержит подвижных протонов, способных вступать в обменные реакции, и обладает относительно высокой температурой кипения и плавления. Реакцию изотопного обмена осуществляли с метиловым эфиром арахионовой кислоты, который более устойчив, легче экстрагируется с катализатора и удобнее для очистки от побочных продуктов, чем соответствующая кислота. С целью уменьшения количества продуктов гидрирования и осмоления время реакции сократили до 3 ч.

После реакции смесь разделяли препаративной ТСХ на силикагеле, импрегнированном азотнокислым серебром. В результате был получен [³H]метиларахидонат, не содержащий посторонних примесей (по данным ТСХ, см. рисунок), с выходом 36% и с уд. акт. 2,5 Ки/ммоль. Следует отметить, что в нашей работе использовался 80% тритий; можно ожидать, что использование 100%-ного трития еще больше увеличит удельную активность препарата. Основные потери при введении трития связаны с образованием продуктов частичного гидрирования и осмоления в процессе реакции и последующей обработки. Ввиду высокой активности полученного [³H]метиларахидоната для омыления использовали препарат, разбавленный перадиоактивным метиларахидонатом в 17 раз (до активности 0,15 Ки/ммоль). Известно, что омыление метиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот представляет значительные трудности из-за их плохой растворимости в водных системах и возможной изомеризации в щелочной среде. В случае меченых эфиров существует дополнительная опасность потери атомов трития в результате обмена с водородом воды при щелочном катализе.



Распределение радиоактивности при ТСХ на пластинках Silufol образцов [^3H]метиларахидоната до (1) и после очистки (2) препаративной ТСХ на силикагеле в бензоле (а) и петролейном эфире (б, 4 прогона)

Для повышения растворимости метиларахидоната в водно-метанольный раствор гидроксида натрия добавляли диоксан. В этой среде омыление проходит на 94% за 2,5 ч при 35–40°. [^3H]Арахидоновую кислоту выделяли из реакционной смеси и использовали для дальнейшей работы без дополнительной очистки (специальным экспериментом с нерадиоактивным метиларахидонатом было показано отсутствие в продукте омыления изомеризованной кислоты). В результате омыления удельная активность уменьшилась почти в 2 раза. Потерю активности можно объяснить как удалением метоксильной группы, так и упомянутым выше обменом трития на водород, (в основном за счет атомов трития, находящихся у аллильных атомов углерода).

Полученную [^3H]арахидоновую кислоту разбавляли нерадиоактивной кислотой до уд. акт. 1,9 мКи/ммоль и использовали в качестве субстрата в биосинтезе простагландинов. Известно, что ферментная система из семенных пузырьков барана (в виде ацетон-пентанового порошка [9]) превращает арахидоновую кислоту в простагландины PGE_2 , PGD_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$, причем, если кофакторами служат глутатион и гидрохинон, преимущественно образуется PGE_2 [9, 10] *.

Мы провели три опыта с [^3H]арахидоновой кислотой. PGE_2 образовывался в среднем с выходом 34% и был идентичен образцу природного PGE_2 по данным ГЖХ-масс-спектрометрии бистриметилсилильного производного его метоксима метилового эфира. Полученный [^3H] PGE_2 имел уд.

* Сокращения простагландинов даны в соответствии с работой [11].

акт. 1,4 мКи/ммоль (при пересчете на неразбавленный [³H]метиларахидонат — 0,77 Ки/ммоль). Одновременно с простагландином PGE₂ при инкубации образовывалось незначительное количество двух радиоактивных продуктов, соответствующих по подвижности при ТСХ простагландинам PGF_{2α} и PGD₂. Из выделенного [³H]PGE₂ щелочной изомеризацией был получен [³H]PGB₂.

Экспериментальная часть

Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью регистрации препаратов ~12% в диоксановом сцинтилляторе [12]. ГЖХ-масс-спектрометрию осуществляли на приборе LKB-9000 (Швеция). УФ-спектры измеряли на приборе Specord UV VIS. Катализатор для изотопного обмена получали из 5% Pd/BaSO₄ и диацетата свинца по методике [8]. Использовали метиларахидонат 99,4% чистоты (по данным ГЖХ). При работе с метиларахидонатом и арахидоновой кислотой по возможности избегали контакта с кислородом воздуха. Ацетоновый порошок семенных пузырьков барана получали по методике [9] и хранили при -20°. Содержание белка в препарате определяли по методу Лоури [13]. Препаративную ТСХ проводили на пластинках размером 13×18 и 9×12 см с закрепленным слоем кизельгеля-G с 5% гипса (Serva, ФРГ); использовали также пластинки, импрегнированные 10% раствором AgNO₃. Для ТСХ использовали системы: бензол — эфир — диоксан, 10 : 1 : 1 (А) и бензол — диоксан — уксусная кислота, 80 : 20 : 2 [14] (Б). Образец природного простагландина PGE₂ был любезно предоставлен д-ром Дж. Пайком (США). Все предварительные опыты, связанные с изучением свойств полученных катализаторов, приводились по методу, описанному в предыдущем сообщении [7].

Реакция изотопного обмена с 80% тритием. В ампулу помещали 0,3 мл диоксана, содержащего 3,5 мг (11 мкмоль) метиларахидоната, вносили 23 мг (11 мкмоль Pd) катализатора, ампулу замораживали в жидком азоте, вакуумировали до давления 10⁻³ мм рт. ст. и заполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст., нагревали до 20° и выдерживали 3 ч при перемешивании на магнитной мешалке. Катализатор отфильтровывали и промывали метанолом (3×10 мл). Фильтрат (200 мКи) разбавляли до 50 мл метанолом и упаривали. Остаток (160 мКи) растворяли в 0,2 мл бензола и наносили в виде полосы на узкую сторону пластинки для ТСХ, импрегнированной AgNO₃. С обеих сторон полосы наносили 2% метиларахидонат в бензоле. Пластинку проявляли в системе (А). Растворитель с пластинки удаляли в токе аргона. Край пластинки обрабатывали кислым раствором КМпО₄. Зону, соответствующую метиларахидонату (R_f 0,3—0,6), элюировали смесью хлороформ — метанол, 2:1. Растворитель удаляли в вакууме при 30°. Остаток растворяли в этилацетате и фильтровали через мелкопористый фильтр. Фильтрат упаривали в вакууме. Выход 1,26 мг (36%) (9,75 мКи). Удельная активность 2,5 Ки/ммоль. Вещество гомогенно по данным ТСХ в бензоле и петролейном эфире (40—60°) на пластинках Silufol (ЧССР) (см. рисунок) и в системе (А) на пластинках для ТСХ, импрегнированных AgNO₃. Аналогичным образом обрабатывали две другие зоны. Активность продуктов восстановления (зона R_f 0,7—1) 126 мКи, продуктов деструкции (R_f 0—0,3) — 22 мКи.

Омыление метилового эфира [³H]арахидоновой кислоты. Растворяли 80 мкг [³H]метиларахидоната и 1,25 мг метиларахидоната в 2 мл смеси 6%-ного водного раствора NaOH, метанола и диоксана (1:1:1) и раствор выдерживали 2,5 ч при интенсивном перемешивании и температуре 35—40° в атмосфере аргона. После охлаждения до 20° смесь разбавляли 3 мл воды и растворитель удаляли в вакууме. Остаток экстрагировали пентаном (1×3 мл). Водную фазу подкисляли до pH 2,5—3 разбавленной соляной кислотой (1:5) и экстрагировали этилацетатом (3×5 мл). Органический слой промывали водой, насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄ и упари-

вали в вакууме. Выход 1,2 мг (94%). Удельная активность 80,6 мКи/ммоль (при пересчете на неразбавленный [^3H]метиларахидонат 1,34 Ки/ммоль). Полученная [^3H]арахионовая кислота была гомогенной при ТСХ на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 в системах А и Б.

Получение [^3H]PGE₂ и [^3H]PGB₂. Встряхивали 36 мкг [^3H]арахионовой кислоты (9,54 мКи) и 1,46 мг арахидоновой кислоты 30 мин с 1,5 мл 30 мМ буфера Na^+ -EDTA (рН 8,0). Добавляли 0,5 мл этого раствора к предварительно проинкубированной в течение 10 мин смеси 80 мг ацетон-пентанового порошка (50 мг белка), полученного из семенных пузырьков барана, 1,2 мг восстановленного глутатиона, 0,09 мг гидрохинона и 1,5 мл того же буфера. Смесь перемешивали 20 мин при 32° и интенсивной аэрации, затем помещали в охлажденную до 5° пробирку (реакционный сосуд ополаскивали 0,5 мл буфера) и отделяли ферментную систему центрифугированием при 19 000g в течение 5 мин при охлаждении. Супернатант подкисляли 2 М лимонной кислотой до рН 3 и экстрагировали хлористым метиленом (3×10 мл). Объединенные экстракты упаривали в вакууме. Остаток растворяли в метаноле. Аликвоту метанольного раствора разбавляли метанолом до объема 3 мл. После измерения начального поглощения при 278 нм к раствору добавляли 10 мкл 8 н. КОН, выдерживали 20 мин при 50° и измеряли поглощение образовавшегося PGB₂ при той же длине волны. По разности показаний вычисляли содержание PGE₂ [15]. Эксперимент выполняли 3 раза. Выход PGE₂ 0,59 мг (34%). Удельная активность 1,13 мКи/ммоль (при пересчете на неразбавленный [^3H]метиларахидонат 0,77 Ки/ммоль). Смесь, содержащую 0,45 мг PGE₂, разделяли на препаративной ТСХ в системе Б. Зоны, соответствующие PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, выделяли. Вещества с силикагеля элюировали метанолом. Растворитель удаляли в вакууме.

Превращали 0,24 мг [^3H]PGE₂ в [^3H]PGB₂ щелочной изомеризацией метанольного раствора [9]. Удельная активность полученного [^3H]PGB₂ 0,44 Ки/ммоль (в расчете на неразбавленный [^3H]метиларахидонат).

PGE₂ (200 мкг), полученный из нерадиоактивной арахидоновой кислоты в тех же условиях, метилировали эфирным раствором диазометана при -5° в течение 20 мин. Растворитель удаляли в вакууме. Метилэфир простагландина PGE₂ превращали в метоксимное производное обработкой пиридиновым раствором солянокислого O-метилгидроксиламина [16]. После удаления пиридина в вакууме остаток обрабатывали смесью пиперидин — триметилсилилпиперидин (1:1) 10 мин при 20°. ГЖХ-масс-спектрометрия полученного производного показала полную идентичность исследуемого образца и образца аналогичного производного природного PGE₂.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nystrom R. F., Mason L. H., Jones E. P., Dutton H. J. (1959) J. Amer. Oil Chem. Soc., 36, 212–214.
2. Tenny K. S. (1961) Diss. Abstr., 22, 1574–1575.
3. Sgoutas D. S., Kummerow F. A. (1964) Biochemistry, 3, 406–408.
4. Granstrom E., Samuelson B. (1969) Eur. J. Biochem., 10, 411–418.
5. Tenny K. S., Gupta S. C., Nystrom R. F., Kummerow F. A. (1963) J. Amer. Oil Chem. Soc., 40, 172–175.
6. Мартон И., Клинг Ф., Танац Б. (1976) в сб. докл. «Органические соединения, меченные радиоактивными изотопами», г. Марианске Лазне, ЧССР, с. 107–110.
7. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д. (1979) Биоорг. химия, 5, 730–734.
8. Lindlar H. (1952) Helv. chim. acta, 35, 446–450.
9. Wallach D. P., Daniels E. G. (1971) Biochim. et biophys. acta, 231, 445–457.
10. Foss P. S., Sih C. J., Takeguchi C., Schnoes H. (1972) Biochemistry, 11, 2271–2277.
11. Nelson N. A. (1974) J. Med. Chem., 17, 911–918.
12. Kinard F. E. (1957) Rev. Sci., 28, 293–295.
13. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265–275.
14. Andersen N. H. (1969) J. Lipid Res., 10, 316–319.
15. Andersen N. H. (1969) J. Lipid Res., 10, 320–325.
16. Paaijmakers J. G. A. M. (1977) J. Chromatogr., 138, 355–372.

Поступила в редакцию
10.XI.1978

PREPARATION OF [³H]LABELED LIPIDS BY HETEROGENEOUS ISOTOPE EXCHANGE WITH GASEOUS TRITIUM IN SOLUTION. II. PREPARATION OF [³H]ARACHIDONIC ACID AND ITS CONVERSION INTO PROSTAGLANDINS E₂ AND B₂

SHEVCHENKO V. P., MYASOEDOV N. F., BEZUGLOV V. V., BERGELSON I. D.

Institute of Molecular Genetics and M. M. Shemyakin Institut of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A new procedure for the preparation of [³H]arachidonic acid by heterogeneous catalytic isotope exchange of methyl arachidonate with gaseous tritium was described. The hydrogenating and exchange properties of the Lindlar catalyst were studied using methyl oleate and methyl stearate, respectively. During saponification of methyl arachidonate a decrease in specific activity from 2.5 to 1.34 Ci/mmol was noted. The utility of the [³H]arachidonic acid thus obtained was exemplified with a preparative biosynthesis of the labeled prostaglandins [³H]PGE₂ and [³H]PGB₂.
