



УДК 577.175.859'17 : 546.11*3

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ
ПРОСТАГЛАНДИНА D₂ С ВЫСОКОЙ МОЛЯРНОЙ
РАДИОАКТИВНОСТЬЮ*Шрам С. И., Вржец П. В.*, Бобрович О. А.*,
Татаринцев А. В.*, Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва;***Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии
им. А. Н. Белозерского*

Определены кинетические параметры ферментативного превращения $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в присутствии препарата PGD-синтазы из крысиного мозга. Установлено, что максимальный выход $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ достигается при концентрации фермента 2,5 мг/мл, позволяющей в 10 раз увеличить скорость превращения $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ относительно контроля с буфером. Осуществлен двухстадийный ферментативный синтез $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ с высокой молярной радиоактивностью (3,15 ТБк/ммоль) из меченного тритием арахидоновой кислоты (3,9 ТБк/ммоль). Об идентичности полученного $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ с природным PGD₂ свидетельствует сохранение функции ингибирования ADP-вызванной агрегации тромбоцитов (IC₅₀ — 53 нМ) и ферментативное превращение его в 15-кето- $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$.

Использование простагландинов, меченных радиоактивными изотопами, в изучении метаболизма и механизма действия природных простагландинов и их синтетических аналогов позволяет значительно повысить чувствительность методов исследования. Важными проблемами в этой связи являются расширение спектра радиоактивно меченных простагландинов, разработка эффективных методов их синтеза и сравнение их с природными аналогами. Настоящая работа посвящена ферментативному синтезу меченного тритием простагландина PGD₂ с высокой молярной радиоактивностью.

PGD — природное полифункциональное соединение, продукт метаболизма полиненасыщенных жирных кислот [1]. Процесс превращения арахидоновой кислоты (AA) в PGD₂ представляет собой две последовательные ферментативные реакции. В результате первой, катализируемой ферментом PGH-синтазой (КФ 1.14.99.1), образуется PGH₂. Вторую реакцию — изомеризацию PGH₂ в PGD₂ — могут осуществлять несколько различных ферментов [2—4].

Одна из особенностей ферментативного синтеза PGD₂ из арахидоновой кислоты — низкая стабильность промежуточного продукта — PGH₂, который в водных растворах спонтанно разлагается с образованием PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ и других продуктов [5]. Поэтому полнота конверсии PGH₂ в PGD₂ будет зависеть от соотношения скоростей ферментативного и неферментативного превращений PGH₂. Как следует из уравнения Михаэлиса — Ментен для скорости ферментативной реакции, это соотношение максимально, когда начальная концентрация $[^3\text{H}]\text{PGH}_2 \cdot (\text{PGH}_2)_0$, используемого в качестве субстрата, будет значительно меньше величины константы Михаэлиса (K_m) для PGH-PGD-изомеразы (14 мкМ) [4]. Это условие соблюдалось во всех экспериментах по синтезу $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$.

Препарат специфического фермента PGH-PGD-изомеразы (PGD-синтаза, КФ 5.3.99.2), получали из крысиного мозга. В экспериментах по

Сокращения: PG — простагландин, AA — арахидоновая кислота.

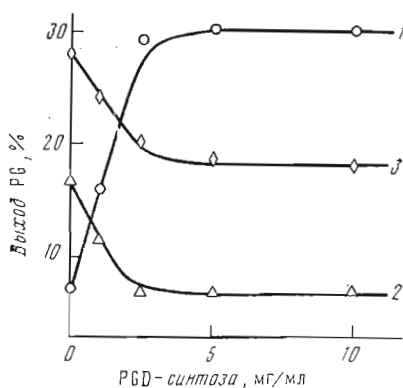


Рис. 1. Зависимость предельного выхода $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (1), $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ (2) и $[^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$ (3) от концентрации PGD-синтазы при использовании в качестве субстрата $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ (5 мкМ)

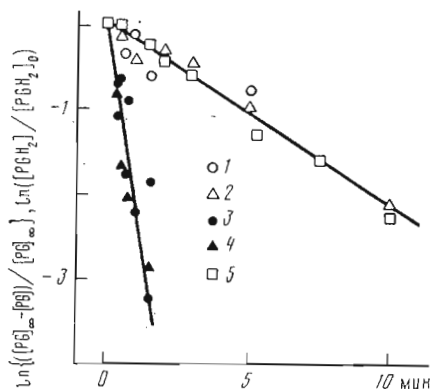


Рис. 2. Линеаризация интегральных кривых накопления $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ и $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) PGD-синтазы (2,5 мг/мл), а также спонтанного разложения PGH_2 (5) для расчета $k_{\text{набл}}^e$ и $k_{\text{набл}}^0$

синтезу $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ использовался препарат фермента, полученный после концентрирования с помощью ультрафильтрации и диализа цитозольной фракции.

В отсутствие фермента $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в результате спонтанного разложения превращается в $[^3\text{H}]$ простагландины D_2 , E_2 и $\text{F}_{2\alpha}$ (7, 17 и 28% соответственно). При добавлении PGD-синтазы выход $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ увеличивается и достигает максимального значения (30%) при концентрации фермента 2,5 мг/мл, тогда как выход $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ и $[^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$ снижается (рис. 1). Такой характер зависимости указывает на существование конкуренции между реакциями ферментативного и неферментативного превращений $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$.

Так как в проводимых экспериментах по синтезу $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ $[\text{PGH}_2]_0 \ll \ll K_m$, скорости превращений $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в присутствии и в отсутствие фермента PGD-синтазы будут характеризоваться значениями наблюдаемых констант скорости реакции первого порядка (относительно субстрата — PGH_2) — $k_{\text{набл}}^e$ и $k_{\text{набл}}^0$ соответственно. Последние определены с помощью линеаризации интегральных кривых, соответствующих расходу субстрата и накоплению продуктов в ходе реакции (рис. 2). Ферментативную реакцию проводили при концентрации ферментного препарата, необходимой для получения максимального выхода $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (2,5 мг/мл). Значения $k_{\text{набл}}^0$ и $k_{\text{набл}}^e$ равны 0,21 и 2,11 мин⁻¹ соответственно. Таким образом, максимальный выход $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ достигается при соотношении скоростей разложения $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в присутствии и в отсутствие ферментного препарата, равном 10.

Препаративный синтез $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ проводили в две стадии. В качестве исходного вещества использовали 1,85 ГБк $[5,6,8,9,11,12,14,15\text{-}^3\text{H}_8]\text{AA}$ (3,7 ТБк/ммоль). На первой стадии $[^3\text{H}]\text{AA}$ превращали в $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ под действием PGH -синтазы из везикулярных желез барана (рис. 3а, б). Выход $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ после очистки с помощью препаративной ТСХ равнялся 20–25%.

В дальнейшем было проведено сравнение субстратных свойств для PGD-синтазы двух препаратов $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ — до и после очистки методом ТСХ. При использовании очищенного препарата выход $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (относительно $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$) оказался почти в 2 раза выше.

Ферментативное превращение $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (рис. 3в, г) под действием PGD-синтазы осуществляли при определенных выше условиях: выход $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ составил 30%, а молярная радиоактивность равнялась 3,15 ТБк/ммоль.

Высокоспецифичным тестом на соответствие структуры полученного $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ структуре природного PGD_2 могло бы быть его окисление под

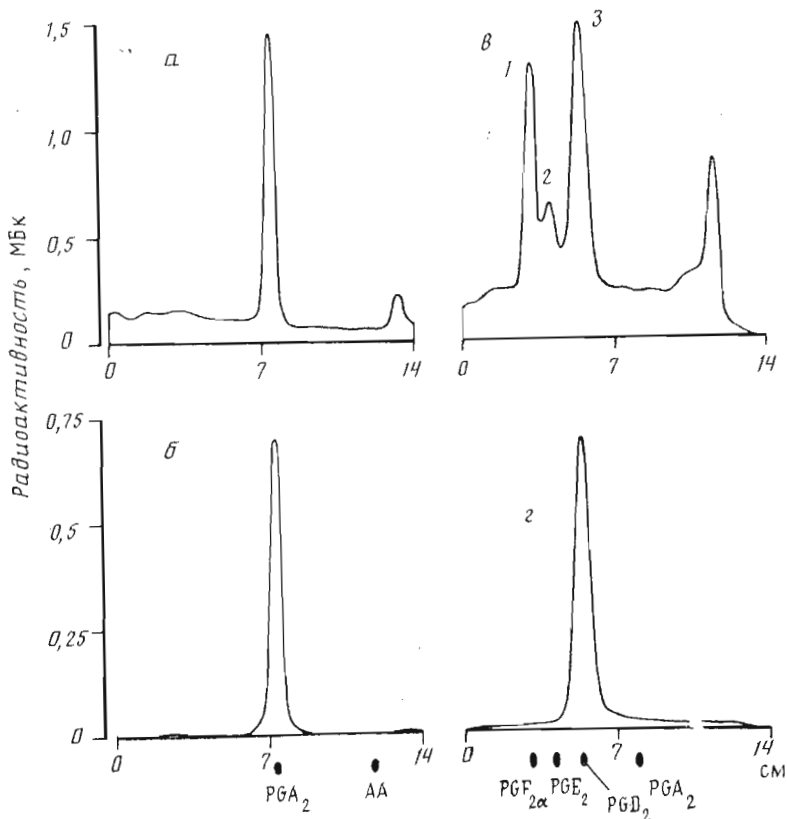


Рис. 3. Анализ радиоактивных продуктов, полученных на различных стадиях preparative синтеза $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$, методом ТСХ в системах растворителей А (для а, б) и Б (для в, г): синтез $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ из $[^3\text{H}]\text{AA}$ (а); очистка $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ (б); превращение $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (а), пик 1 — $[^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$, 2 — $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$, 3 — $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$; очистка $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ (в). Внизу показано положение маркеров на пластинке

действием фермента 15-гидроксипростагландин-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.141). 15-кето- PGD_2 в щелочной среде находится в виде енолят-аниона и обладает характерным спектром (свойственным только 15-кетопроизводным простагландинов типа D) с максимумом при 415 нм [6].

Для анализа $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ использовался препарат фермента, выделенный из тромбоцитов человека. Совпадение спектров продуктов окисления полученного нами $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ и стандартного немеченого PGD_2 (рис. 4) показывает тождественность препаратов.

Известно, что PGD_2 — сильный ингибитор агрегации тромбоцитов [6], протекающей в присутствии ингибитора PGH -синтазы индометацина. $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ также ингибировал ADP-вызванную агрегацию тромбоцитов (рис. 5). Полученный нами препарат $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ с IC_{50} , равной 53 мкМ, в этом эксперименте полностью идентичен препарату фирмы Amersham (Англия).

Таким образом, полученный ферментативным синтезом $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ проявляет свойства, характерные для природного PGD_2 : ингибирует агрегацию тромбоцитов, а также способен превращаться в биологически неактивный метаболит под действием специфического фермента простагландин-дегидрогеназы. Поэтому он может быть использован для исследований метаболизма и механизма действия природного PGD_2 .

Экспериментальная часть

В работе использовались: $[5,6,8,9,11,12,14,15\text{-}^3\text{H}_8]\text{AA}$ (3,7 ТБк/ммоль), полученная в Институте молекулярной генетики АН СССР; $[5,6,8,9,12,14,15\text{-}^3\text{H}_7]\text{PGD}_2$ (5,92 ТБк/ммоль) — Amersham (Англия); AA — Fluka

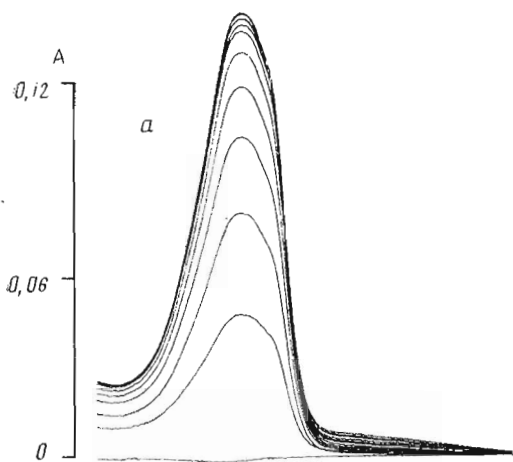


Рис. 4. Спектры 15-кетопроизводных PGD_2 (а) и $^3\text{H}\text{PGD}_2$ (б), образующихся под действием 15-гидроксипростагландин-дегидрогеназы (10 мкг/мл). В случае PGD_2 спектры (снизу вверх) снимали с интервалом 5 мин, а $^3\text{H}\text{PGD}_2$ — через 30 мин после добавления фермента

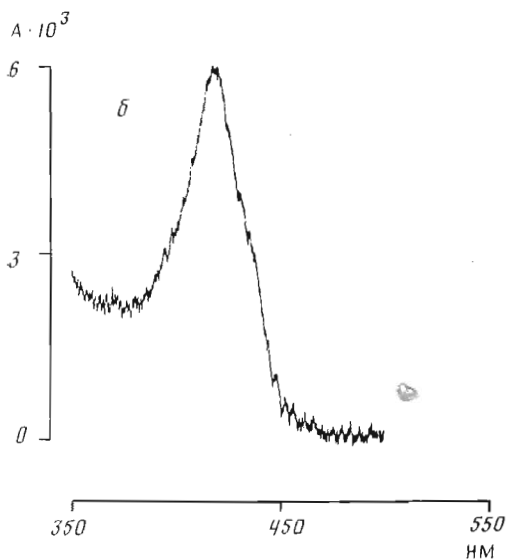


Рис. 5. Зависимость скорости ADP вызванной агрегации тромбоцитов в присутствии индометацина (20 мкМ) от логарифма концентрации синтезированного (1) и коммерческого (2) препарата $^3\text{H}\text{PGD}_2$

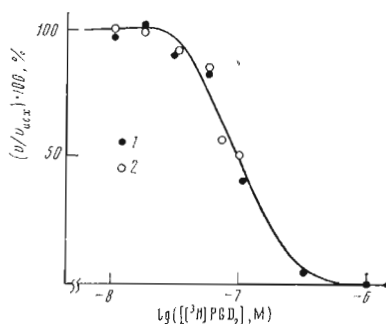


Рис. 4

Рис. 5

(Швейцария); простагландины A_2 , D_2 , E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ — коммерческие препараты (СССР, Таллинн); ADP, дитиотреит, гемин (Fe^{3+} — протопорфирин IX) — препараты Sigma (США); *L*-адреналин, тиобарбитуровая кислота — препараты Serva (ФРГ); DEAE-целлюлоза и Р-целлюлоза — Whatman (Англия); Blue — Sepharose CL-6B — Pharmacia F. C. (Швеция); силикагельные пластинки с толщиной слоя 0,2 мм (Merck, ФРГ). Остальные реактивы соответствуют марке ос. ч. Ацетон, используемый для хранения PGH_2 и $^3\text{H}\text{PGH}_2$, предварительно перегоняли с перманганатом калия и хранили над молекулярными ситами 4 Å (ГДР).

PGH_2 и $^3\text{H}\text{PGH}_2$ получали по методу [7] с применением частично очищенного препарата PGH -синтазы из везикулярных желез барана. Активность препарата PGH -синтазы из везикулярных желез была равной 7,5 мкмоль АА/(мин · мг) ($[\text{AA}]_0$ — 0,2 мМ, рН 8; 25° С). Выделение PGH_2 и $^3\text{H}\text{PGH}_2$ из экстракта реакционной смеси проводили с помощью препаративной ТСХ при -20° С в системе этилацетат — гексан — изопропанол — уксусная кислота, 15 : 9 : 1 : 0,05 (А). Очищенные препараты PGH_2 и $^3\text{H}\text{PGH}_2$ были стабильными в течение 1,5—2 мес со времени их получения при хранении в ацетоне при -40° С под аргоном. Концентрацию определяли по тиобарбитуровому тесту на малоновый диальдегид, который образуется при разложении PGH_2 в реагенте, используемом для анали-

за малонового диальдегида (0,3% раствор тиобарбитуровой кислоты в 0,1 н. HCl) [8].

Идентификацию и определение чистоты $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ проводили с помощью реакции восстановления его в $[^3\text{H}]\text{PGF}_{2\alpha}$ под действием SnCl_2 . Аликвоту, содержащую 0,5—1 МБк $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в 10 мкл ацетона, помещали в пробирку. После удаления ацетона под вакуумом к $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ одновременно добавляли 10 мкл раствора SnCl_2 (50 мг/мл) в метаноле и 100 мкл воды. После интенсивного встряхивания в течение 1 мин радиоактивные продукты экстрагировали этилацетатом ($3 \times 0,4$ мл), разделяли с помощью ТСХ в системе этилацетат — 2,2,4-триметилпентан — уксусная кислота — вода, 110 : 50 : 20 : 100 (Б) и анализировали.

Для определения радиоактивности аликвоту реакционной смеси или препарата простагландина помещали во флакон, содержащий 1 мл 1% раствора додецилсульфата натрия, и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 10 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8 и измеряли радиоактивность на приборе Mark-II (США). Предварительная обработка раствором додецилсульфата натрия необходима для разрушения мембранных компонентов и клеток. Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури [9].

PGD-синтазу получали из 13 г головного мозга (кроме продолговатого мозга и мозжечка) беспородных крыс. После извлечения мозг промывали в 10% растворе сахарозы, гомогенизировали в 70 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7) с 1 мМ дитиотреитом. Гомогенат (75 мл) центрифугировали 90 мин при 100 000 g и полученный супернатант концентрировали в ячейке для ультрафильтрации до объема 20 мл. Концентрированный препарат фермента диализовали 5 ч в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7) с 1 мМ дитиотреитом (2×1 л). Полученный таким образом препарат PGD-синтазы (500 мг) с максимальной активностью 4,2 нмоль $\text{PGH}_2/(\text{мин} \cdot \text{мг})$ хранили при -70°C .

Реакцию изомеризации $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ в $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ под действием PGD-синтазы проводили при стандартных условиях. Пробирку, содержащую аликвоту $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ (2,18 МБк) в 10 мкл ацетона, помещали на несколько минут (до полного удаления растворителя) под вакуум. Затем к $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ добавляли 100 мкл раствора фермента в 0,1 М трис-HCl (рН 9,5) и инкубировали с перемешиванием при 25°C . Концентрация ферментного препарата и время проведения реакции определялись условиями эксперимента. В опытах по определению кинетики накопления продуктов реакцию останавливали добавлением 10 мкл раствора SnCl_2 (50 мг/мл) в метаноле. Продукты реакции экстрагировали этилацетатом ($3 \times 0,4$ мл) и анализировали распределение радиоактивных продуктов после ТСХ в системе растворителей Б в присутствии стандартных простагландинов A_2 , D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ (по 2 мкг). Зоны, соответствующие этим простагландинам, обнаруживали парами иода, а радиоактивные продукты — сканированием радиоактивности на приборе Berthold 27/N (ФРГ). PGA_2 применяли как маркер PGH_2 ввиду их близкой хроматографической подвижности.

Значения наблюдаемых констант скорости разложения PGH_2 и $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ ($k_{\text{набл}}^0$ и $k_{\text{набл}}^e$) определяли графически, исходя из стандартных уравнений, описывающих кинетику реакций первого порядка. Полученные из экспериментальных точек интегральные кинетические кривые линеаризовали в координатах: $\ln \{[\text{PG}]_\infty - [\text{PG}]/[\text{PG}]_\infty\}$ или $\ln ([\text{PGH}_2]/[\text{PGH}_2]_0)$ от времени инкубации ($[\text{PG}]$ и $[\text{PGH}_2]$ — текущие концентрации PG и PGH_2 ; $[\text{PG}]_\infty$ — предельная концентрация PG при определенной концентрации субстрата и фермента).

Ферментативный синтез $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ проводили с использованием 450 МБк $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$, который был получен из 1,85 ГБк $[^3\text{H}]\text{AA}$. $[^3\text{H}]\text{PGH}_2$ помещали в колбу на 200 мл и добавляли 20 мл раствора PGD-синтазы (до концентрации 2,5 мг/мл) в 0,1 М трис-HCl-буфере (рН 9,5). Через 20 мин инкубации при 20°C в реакционную смесь добавляли 0,8 мл 2 М раствора лимонной кислоты и экстрагировали продукты реакции этилацетатом (4×100 мл). $[^3\text{H}]\text{PGD}_2$ выделяли из экстракта с помощью ВЭЖХ (Gilson) на колонке ($3,3 \times 150$ мм) с Nucleosil C18,5 мкм. Колонку элюиро-

вали 33% ацетонитрилом, содержащим 1% уксусной кислоты, со скоростью 0,1 мл/мин. За выходом радиоактивных продуктов следили с помощью радиодетектора. Фракции, содержащие [^3H]PGD₂, собирали, удаляли растворитель и остаток растворяли в смеси метанол — вода — ацетонитрил, 3 : 2 : 1. Молярную концентрацию [^3H]PGD₂ определяли по ферментативному превращению его в 15-кето-[^3H]PGD₂, как описано ниже. [^3H]PGD₂ был стабилен 4 мес после его получения при -20°C .

15-Гидроксипростагландин-дегидрогеназу выделяли из 75 г осажденных при фракционировании крови человека тромбоцитов (получены на Центральной станции переливания крови, Москва) по методу [6]. Активность очищенного препарата фермента при использовании в качестве субстрата PGD₂ равнялась 1,1 нмоль PGD₂/(мин·мг) ([PGD₂]₀ — 0,2 мМ, рН 9; 25°C).

Реакцию ферментативного окисления [^3H]PGD₂ и PGD₂ в соответствующие 15-кетопроизводные проводили следующим образом. В спектрофотометрическую кювету на 1,5 мл вносили 0,2 мкмоль NADP, 10 мкг препарата 15-гидроксипростагландин-дегидрогеназы и доводили объем до 1 мл 0,1 М трис-HCl (рН 9) с 1 мМ дитиотреитом. Реакцию начинали добавлением 50 нмоль PGD₂ или 6,29 МБк [^3H]PGD₂ в 10 мкл этилового спирта (в кювету сравнения вместо PGD₂ или [^3H]PGD₂ добавляли этиловый спирт). После выравнивания базовой линии записывали спектры поглощения в интервале 350—550 нм. Кюветы термостатировали при 25°C . Для расчета концентраций 15-кетопроизводных PGD₂ и [^3H]PGD₂ использовали молярный коэффициент поглощения, равный $46\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 415\text{ нм}$, рН 9,5) [6].

Определение скорости и степени ADP-вызванной агрегации тромбоцитов проводили с использованием плазмы, богатой тромбоцитами, как было описано ранее [10]. К 250 мкл плазмы, богатой тромбоцитами, добавляли [^3H]PGD₂ в 10 мкл воды, индометацин (5 нмоль) и предынкубировали 2 мин при 25°C . Агрегацию инициировали добавлением ADP (1,25 нмоль). Внесение всех компонентов и дальнейшую инкубацию осуществляли при постоянном перемешивании и температуре 25°C . Степень агрегации тромбоцитов определяли по изменению поглощения и рассеивания света относительно плазмы, лишенной тромбоцитов. Из полученных кинетических кривых рассчитывали начальные скорости агрегации тромбоцитов в присутствии и в отсутствие [^3H]PGD₂ (v и $v_{\text{исх}}$ соответственно).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nugteren D. H., Hazelhof E. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 326. № 3. P. 448—461.
2. Hamberg M., Fredholm B. B. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 431. № 1. P. 189—193.
3. Christ-Hazelhof E., Nugteren D. H. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 572. № 1. P. 43—51.
4. Urade Y., Fujimoto N., Hayaishi O. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 23. P. 12410—12415.
5. Hamberg M., Swenson J., Wakabayashi T., Samuelsson B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 2. P. 345—349.
6. Watanabe T., Shimizu T., Narumiya S., Hayaishi O. // Arch. Biochem. and Biophys. 1982. V. 216. № 1. P. 372—379.
7. Meth. Enzymol. 1982. V. 86. P. 376—385.
8. Басевич В. В., Мезз А. Т., Яркинг И., Варфоломеев С. Д. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 658—665.
9. Hartree E. F. // Analyt. Biochem. 1972. V. 48. № 2. P. 422—427.
10. Шевченко В. П., Нагаев И. Ю., Вржец П. В., Ершов Д. З., Зайцев С. В., Варфоломеев С. Д., Мясоедов Н. Ф. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1075—1085.

Поступила в редакцию
26.X.1988

После доработки
25.I.1989

PRODUCTION AND PROPERTIES OF TRITIUM-LABELLED
PROSTAGLANDIN D₂ WITH HIGH MOLAR RADIOACTIVITY

SHRAM S. Y., VRZHESHCH P. V.*, BOBROVICH O. A.*, TATARINTSEV A. B.*,
SHEVCHENKO V. P., MYASOEDOV N. F.

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

** A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University*

Kinetic parameters of enzymatic and non-enzymatic transformations of [³H]prostaglandin H₂ (PGH₂) were determined; the maximum yield of [³H]PGD₂ being obtained at the k_{obs}^e/k_{obs}^o ratio equal to 10. The two-stage enzymatic synthesis of [³H]PGD₂ with high molar radioactivity (3,15 TBq/mmol) from [³H]arachidonic acid carried out. Its identity in properties to the natural PGD₂ was shown in experiments on the inhibition of ADP-induced aggregation of thrombocytes and on enzymatic oxidation with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase.