



УДК 577.127.2

МЕТАБОЛИЗМ 3β-(2-ГИДРОКСИЭТОКСИ)ХОЛЕСТ-5-ЕНА ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ

© 1996 г. А. В. Малюгин, Д. К. Новиков, К. Алки*, Ю. Лафонт*, А. Ю. Мишарин[#]

Институт экспериментальной кардиологии, КНЦ РАМН, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А;

*Лаборатория транспорта липидов (INSERM-U130), Марсель, Франция

Поступила в редакцию 05.12.95 г.

При внутривенном введении 3β-(2-гидрокси-2-[³H]этокс)холест-5-ена крысам с канюлированным общим желчным протоком через 3 ч радиоактивность накапливается преимущественно в печени (24%), желчи (7%), селезенке (12%) и сыворотке крови (15%). Распределение 3β-(2-гидрокси-2-[³H]этокс)холест-5-ена по органам близко к распределению [¹⁴C]холестерина, введенного в аналогичных условиях. Анализ радиоактивных продуктов сыворотки крови показал, что в условиях эксперимента 40–60% 3β-(2-гидрокси-2-[³H]этокс)холест-5-ена превращается в ацильное производное.

Ключевые слова: синтетические стероиды, метаболизм.

Известно [1–4], что эффекты биологически активных стероидов, проявляемые *in vivo*, во многом зависят от возможности поступления соединений в клетки тех или иных органов, а также от их метаболических превращений. Кроме того, биологическая активность стероидов, наблюдаемая в культивируемых клетках, часто не проявляется на уровне организма [1, 3, 5].

В предыдущем сообщении [6] было показано, что 3β-(2-гидроксиэтокс)холест-5-ен ингибирует биосинтез холестерина в первичной культуре гепатоцитов кролика. В настоящей работе изучался метаболизм этого соединения *in vivo*. При этом преследовались две цели: сравнение распределения по органам и тканям 3β-(2-гидрокси-2-[³H]этокс)холест-5-ена (I) и [4-¹⁴C]холестерина при внутривенном введении крысам и выяснение возможности ацилирования *in vivo* первичной гидроксильной группы стерилцеллозоля (I).

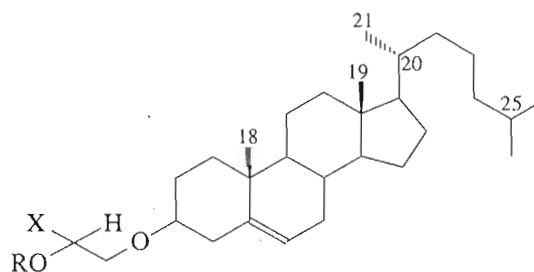
Эксперименты проведены на крысах с канюлированным общим желчным протоком. Данная модель неоднократно использовалась при исследовании метаболизма биологически активных стероидов [7–9], условия проведения экспериментов *in vivo* также обсуждались ранее [7–10].

О распределении ³H-меченого производного (I) и [¹⁴C]холестерина по органам и тканям крысы судили по содержанию изотопов спустя 3 ч после инъекции стероидов в бедренную вену. Результаты (табл. 1) указывают на качественную схожесть распределения холестерилцеллозоля (I) и холестерина, характеризуют эффективный за-

хват холестерилцеллозоля (I) клетками печени и выведение этого соединения и/или его полярных метаболитов в составе желчи. Значительные различия между содержанием соединения (I) и холестерина наблюдались только в селезенке.

Распределение трития между полярной и неполярной фазами экстрактов из сыворотки крови, желчи и печени приведено в табл. 2.

Из радио-ТСХ продуктов, содержащихся в неполярной фазе экстрактов сыворотки крови (рис. 1), видно наличие радиоактивного вещества с высокой подвижностью, что свидетельствует о превращении соединения (I) ($R_f 0.08$) в неполярные метаболиты. Данные ТСХ в различных системах указывали на совпадение подвижности полученного неполярного продукта и синтетического 3β-[2-(9-цис-октадецеиноилокси)этокс]холест-5-ена (II).



(I) R = H; X = [³H]

(II) R = CH₃-(CH₂)₇-CH=CH-(CH₂)₇-CO; X = H

[#] Автор для переписки.

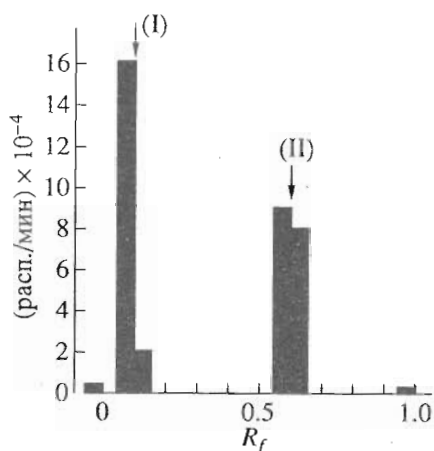


Рис. 1. ТСХ радиоактивных экстрактов (неполярная фаза) из сыворотки крови в системе 1. Стрелками показаны положения на хроматограммах стандартов соединений (I) и (II). Условия – см. “Экспер. часть”. Приведена типичная радиохроматограмма: ТСХ экстрактов сыворотки всех животных содержали только указанные радиоактивные зоны.

Радиоактивные продукты со значениями R_f 0.08 и 0.60 (рис. 1) анализировались отдельно методом ВЭЖХ с добавлением нерадиоактивных стандартов (I) и (II) (рис. 2). Обработка радиоактивного продукта с R_f 0.60 щелочью приводила к его ис-

Таблица 1. Распределение изотопов в органах крысы через 3 ч после внутривенного введения $[4-^{14}\text{C}]$ холестерина и 3β -(2-гидрокси-2- $[^3\text{H}]$ этоксид)холест-5-ена (I)*

Образец	^{14}C	^3H
Сердце	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.05
Легкие	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.5
Печень	33.5 ± 2.9	23.9 ± 3.7
Селезенка	2.3 ± 0.7	11.6 ± 1.3
Почки	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1
Желчь	18.1 ± 1.6	6.8 ± 0.7
Сыворотка крови	19.0 ± 1.2	14.6 ± 1.7

* Приведено количество изотопа в процентах от введенного; $M \pm S.E.$ для 5 животных в каждом эксперименте.

Таблица 2. Распределение трития между полярной и неполярной фазами в экстрактах сыворотки крови, желчи и печени*

Образец	Полярная фаза	Неполярная фаза
Печень	12.3 ± 2.6	87.0 ± 2.6
Желчь	39.6 ± 9.6	58.8 ± 2.8
Сыворотка крови	5.6 ± 1.1	92.4 ± 9.5

* Приведено количество изотопа в процентах от радиоактивности выделенного образца; $M \pm S.E.$ для 5 животных в каждом эксперименте.

чезновению и образованию радиоактивного продукта, по данным ВЭЖХ совпадающего с исходным веществом (I) (рис. 2г).

Таким образом, показано, что холестерилцеллозоль (I) распределяется по органам и тканям и выводится в составе желчи аналогично холестерину, а также ацилируется *in vivo*. Полученные данные не позволяют ответить на вопрос, проходит ли ацилирование непосредственно в плазме крови или клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ проводили на пластинках Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck), препаративную ТСХ – на пластинках PSC Kieselgel 60 (Merck) в системах бензол–этилацетат, 19 : 1 (1), гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота, 70 : 29 : 1 (2), гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота, 89 : 10 : 1 (3). Для обнаружения продуктов пластинки опрыскивали 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты в абсолютном этаноле, затем нагревали при 100°C. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле L 40/100 (Chemapol). Синтез 3β -(2-гидроксиэтоксид)холест-5-ена и 3β -(2-гидрокси-2- $[^3\text{H}]$ этоксид)холест-5-ена (I) описан в работе [6].

3β -[2-(9-цис-Октадеценилокси)этоксид]холест-5-ен (II) получен по методу [11]. Смесь 3β -(2-гидроксиэтоксид)холест-5-ена (I) (1 ммоль) и олеиновой кислоты (1.5 ммоль) высушивали упариванием с добавлением абсолютного толуола, прибавляли N-метилимидазол (4 ммоль), смесь охлаждали до 0°C, вносили 2.5 ммоль триизопропилбензолсульфохлорида, перемешивали 5 мин при комнатной температуре, разбавляли 15 мл толуола, прибавляли 20 мл насыщенного раствора NaHCO_3 , толуольный раствор промывали насыщенным Na_2SO_4 (2 × 5 мл), сушили Na_2SO_4 , упаривали и остаток хроматографировали на колонке (1.4 × 10 см) с силикагелем в смеси бензол–этилацетат (19 : 1). Продукт (II), содержащий примесь олеиновой кислоты, очищали препаративной ТСХ в системе 3 и сушили в вакууме. Индивидуальный, по данным ТСХ в системах 1–3 и ВЭЖХ (условия см. ниже), продукт (II) выделен с выходом 80% в виде бесцветной пленки. ^1H -ЯМР (в дейтерохлороформе на приборе Bruker WM 500; приведены значения δ , м. д., и J , Гц): 0.666 (с, 3H, CH_3 -18), 0.850 (д, 3H, J 6.6, CH_3 -25), 0.855 (д, 3H, J 6.6, CH_3 -25), 0.867 (м, 3H, CH_3 в олеате), 0.904 (д, 3H, J 6.6, CH_3 -21), 0.991 (с, 3H, CH_3 -19), 1.620 (м, 2H, β - CH_2 в олеате), 2.310 (т, J 6.6, α - CH_2 в олеате), 3.174 (м, 1H, H-3), 3.663 (м, 2H, CH_2OC), 4.198 (м, 2H, COOCH_2), 5.320–5.360 (м, 3H, H-6 и $\text{CH}=\text{}$ в олеате).

Самцы крыс линии “Вистар” весом 210 ± 8 г (10 животных) при анестезии нембуталом (40 мг/кг

живого веса) были прооперированы с целью канюлирования общего желчного протока. Группе из 5 животных вводили ³H-меченый стерин (I) (по 320 ± 50 мкг, 55.5 ± 0.75 мКи в 0.25 мл автологичной сыворотки) в бедренную вену; группе из 5 животных вводили [4-¹⁴C]холестерин (Amersham) (по 300 ± 50 мкг, 60.0 ± 1.0 мКи) в аналогичных условиях. Желчь собирали в течение 3 ч. Затем каждому животному вводили нембутал (по 60 мг) и сразу же проводили перфузию раствором 0.9% хлористого натрия через аорту. Сыворотку крови отделяли от форменных элементов и анализировали. Внутренние органы удаляли, взвешивали и гомогенизировали. Экстракцию липидов из тканей проводили по методу Блая и Даэра [12]: образец ткани гомогенизировали с добавлением смеси хлороформ-метанол (1 : 2) из расчета 15 мл смеси на 1 г ткани. К полученному экстракту добавляли 15 мл хлороформа и 15 мл H₂O, после разделения фаз определяли радиоактивность в аликвотах из верхней и нижней фаз.

Липиды сыворотки крови и желчь экстрагировали по методу Фолча и соавт. [13].

Радио-ТСХ неполярных фаз экстрактов из печени, желчи и сыворотки крови проводили отдельно для каждого животного. Для получения радиохроматограмм слой адсорбента шириной 0.5 см (перпендикулярно прохождению фронта растворителя) удаляли с непроявленной части пластинки и переносили в стеклянные вials для счета радиоактивности.

Радиоактивные продукты из сыворотки крови выделяли после ТСХ объединенных экстрактов в системе 1. Зоны с непроявленной части пластинки удаляли, продукты элюировали смесью хлороформ-метанол (2 : 1), элюаты упаривали досуха в атмосфере азота, полученные остатки растворяли в 300 мкл изопропанола, количество радиоактивного продукта оценивали, измеряя радиоактивность в аликвоте объемом 1 мкл.

Для гидролиза радиоактивного продукта (*R_f* 0.60 в системе 1) к 150 мкл раствора вещества в изопропаноле добавляли 15 мкл 6 н. водного раствора NaOH, выдерживали смесь 2 ч при 40°C, нейтрализовали добавлением 45 мкл 2 н. H₂SO₄, добавляли 1 мл хлороформа, 0.5 мл насыщенного раствора Na₂SO₄, хлороформный слой отделяли, водный слой промывали хлороформом, упаривали в токе азота, остаток использовали для анализа продуктов гидролиза методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ проводили на приборе Du Pont 8800 на колонке (4.8 мм × 25 см) ODS II, 5 мкм, фирмы Serva со спектрофотометрическим детектированием элюата при 209 нм (программируемый градиент-метанол (буфер А)/метанол-изопропанол, 1 : 4 (буфер Б), см. рис. 2а). Стандарты (20 мкг стерина (I) и 20 мкг олеата (II)) вводили в 20 мкл

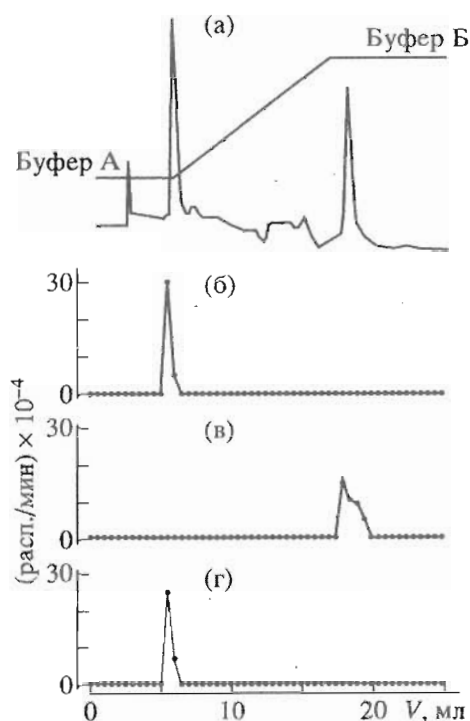


Рис. 2. Анализ методом ВЭЖХ смеси синтетических стандартов (I) и (II) при спектрофотометрическом (а) и радиоактивном детектировании той же смеси в присутствии радиоактивных продуктов с *R_f* 0.08 и 0.60 (рис. 1) ((б), (в) соответственно), а также в присутствии продуктов щелочного гидролиза радиоактивного соединения с *R_f* 0.60 (г). Хроматограммы (б)–(г) при спектрофотометрическом детектировании полностью совпадали с хроматограммой (а).

изопропанола. Радиоактивные соединения с *R_f* 0.08 и 0.60, а также продукты щелочного гидролиза растворяли в 40 мкл изопропанола, содержащего по 40 мкг стандартов (I) и (II), и анализировали со спектрофотометрическим детектором, собирая фракции по 0.5 мл, в которых определяли радиоактивность.

Авторы благодарны А.Я. Штейншнейдеру и В.А. Косых за оказанную помощь и участие в обсуждении результатов; Российскому фонду фундаментальных исследований (грант № 95-04-12165), Национальной программе "Атеросклероз" (проект № 221) и Национальному институту здравоохранения и медицинских исследований Франции (INSERM) (проект 94-EO-04) за финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gibbons G.F., Mitropoulos K.A., Myant N.B. *Biochemistry of Cholesterol*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982.
- Smith L.L. *Cholesterol Autoxidation*. N.Y.: Plenum Press, 1981.

3. Smith L.L., Johnson B. // Free Radicals Biol. Med. 1989. V. 7. P. 285-332.
4. Kandutsch A.A., Chen H.W., Heiniger H.-J. // Science. 1978. P. 498-501.
5. Schroepfer G.J. // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 585-621.
6. Малюгин А.В., Новиков Д.К., Косых В.А., Косенков Е.И., Медведева Н.В., Валентинова Н.В., Штейншнейдер А.Я., Мишарин А.Ю. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 541-547.
7. Bollman J.L., Chain J.C., Grindlay J.H. // J. Lab. Clin. Med. 1948. V. 33. P. 1349-1352.
8. Kuipers F., Havinga R., Bosscheiter H., Toorop G.P., Hindriks F.R., Vonk R.J. // Gastroenterology. 1985. V. 88. P. 403-411.
9. Schroepfer G.J., Chu A.J., Needleman D.H., Izumi A., Nguen P.T., Wang K.-S., Little J.M., Sherill B.C., Kissic A. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 4110-4132.
10. Bakkeren H.F., Kuipers F., Vonk R.J., Van Berkel T.J.C. // Biochem. J. 1990. V. 268. P. 685-691.
11. Мишарин А.Ю., Бушмакина Н.Г., Чернов Б.К. Способ получения спин-меченых лецитинов и эфиров холестерина: А. с. 1126574 СССР // Б. И. 1984. С. 44.
12. Bligh E.G., Dyer W.J. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 934-940.
13. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.

Metabolism of 3 β -(2-Hydroxyethoxy)cholest-5-ene at the Intravenous Administration to Rats

A. V. Malyugin*, D. K. Novikov*, Ch. Alquier**, H. Lafont**, and A. Yu. Misharin*

*Cardiological Scientific Center, Institute of Experimental Cardiology, Russian Academy of Medical Sciences,
Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

**Laboratory of Lipid Transport (INSERM-U130), Marseilles, France

Abstract—The intravenous injection of 3 β -(2-hydroxy-2-[³H]ethoxy)cholest-5-ene into rats with the cannulated common bile duct resulted in the primary accumulation of radioactivity in liver (24%) and spleen (12%) tissues, bile (7%), and blood serum (15%) after 3 hours. The distribution of 3 β -(2-hydroxy-2-[³H]ethoxy)cholest-5-ene throughout various tissues was close to that of [¹⁴C]cholesterol being administered under the same conditions. The analysis of radioactive products from blood serum showed that 40-60% of 3 β -(2-hydroxy-2-[³H]ethoxy)cholest-5-ene was converted to the acyl derivative under experimental conditions.

Key words: synthetic sterols, metabolism.

Сдано в набор 03.06.96 г.

Подписано к печати 06.08.96 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 4.1 тыс.

Уч.-изд. л. 10.7

Бум. л. 5.0

Тираж 391 экз.

Зак. 175