



УДК 577.127.2

СРОДСТВО 3 β -(2-ГИДРОКСИЭТОКСИ)-5 α -ХОЛЕСТ-8(14)-ЕН-15-ОНА К ОКСИСТЕРИНСВЯЗЫВАЮЩЕМУ БЕЛКУ И ЕГО МЕТАБОЛИЗМ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ Нер G2

© 1997 г. А. Ю. Мишарин[#], А. С. Крылов, К. Алки*, Ю. Лафонт*,

А. Я. Штейншнейдер, В. А. Косых, А. Д. Морозкин

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

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

Поступила в редакцию 25.04.96 г. Принята к печати 25.11.96 г.

3 β -(2-Гидроксиэтоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-он, синтетический ингибитор биосинтеза холестерина, обладает высоким сродством к оксистеринсвязывающему белку, что показано данными ультрацентрифугирования белковой фракции из печени кролика в присутствии ³H-меченого ингибитора и вытеснением им 25-гидрокси[³H]холестерина из комплекса с оксистеринсвязывающим белком. Ингибитор снижает активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктазы в клетках гепатомы человека линии Нер G2 (ID₅₀ (2.7 ± 0.7) × 10⁻⁵ М) и превращается в тех же клетках в 3 β -[2-(9-цис-октадеценилокси)этоксиг]-5 α -холест-8(14)-ен-15-он.

Ключевые слова: оксистерины, метаболизм стероидов, клетки гепатомы Нер G2, оксистеринсвязывающий белок.

Среди полярных стероидов, подавляющих активность НМГ-СоА-редуктазы (КФ 1.1.1.34), снижающих скорость биосинтеза холестерина и регулирующих метаболизм липопротеинов в культуре клеток, лишь немногие проявляют гипохолестеринемические и антиатерогенные свойства *in vivo* [1–6]. Уникальным набором биологических свойств обладают 15-оксигенированные стероиды [7–17]. 5 α -Холест-8(14)-ен-3 β -ол-15-он (15-кетостерин), подавляющий активность НМГ-СоА-редуктазы и НМГ-СоА-синтазы (КФ 4.1.35), ингибирующий всасывание холестерина в кишечнике и снижающий уровень холестерина в плазме крови при добавлении к корму грызунов и приматов, рекомендован как перспективный гипохолестеринемический и антиатерогенный препарат. Однако побочные эффекты (потеря аппетита и снижение веса подопытных животных) препятствуют широкому практическому применению 15-кетостерина. Побочные эффекты 5-кетостерина определяются в основном токсичностью его метаболитов

(5 α -холест-8(14)-ен-3 β ,25-диол-15-она, 5 α -холест-8(14)-ен-3 β ,26-диол-15-она и некоторых других соединений) в печени [15–18]. 15-Кетостерин с фторированной боковой цепью, 5 α -25,26,27-гептафторхолест-8(14)-ен-3 β -ол-15-он [19, 20], для которого образование вышеуказанных метаболитов, естественно, невозможно, ингибировал активность НМГ-СоА-редуктазы в клетках гепатомы Нер G2, проявляя гипохолестеринемический эффект при испытаниях на крысах, не вызывая снижения веса и аппетита и превращаясь преимущественно в 25,26-27-гептафторхолестерин [20, 21].

Наличие в молекуле оксистерина свободной 3 β -гидроксильной группы, как было показано в многочисленных исследованиях, – важнейшее условие его высокого сродства к специфическому внутриклеточному рецептору (оксистеринсвязывающему белку, OSBP [1, 3, 6, 22–24]) и способности ингибировать активность НМГ-СоА-редуктазы в культуре клеток [1–3, 7, 8]. В противоположность 15-кетостерину, мощному ингибитору биосинтеза холестерина, производные 15-кетостерина, лишенные 3 β -гидроксильной группы, проявляли относительно низкую активность или были неактивны.

Однако мы ранее показали, что 3 β -(2-гидроксиэтоксиг)-производные стероидов эффективно ингибируют биосинтез холестерина в культуре клеток [25–32]. В частности, 3 β -(2-гидроксиэтоксиг)-замещенный 15-кетостерин (I) ингибировал

Сокращения: НМГ-СоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А; PBS – фосфатсодержащий физиологический раствор; ТМС – триметилсилил; ТБДМС – трет-бутилдиметилсилил; оксистерин – стерин, в молекуле которого помимо гидроксильной функции в положении 3 β присутствует дополнительная кислородсодержащая функция (гидрокси-, кето- или эпокси-); в связи с этим 5 α -холест-8(14)-ен-3 β -ол-15-он обозначен как 15-кетостерин; OSBP – оксистеринсвязывающий белок.

[#] Автор для переписки.

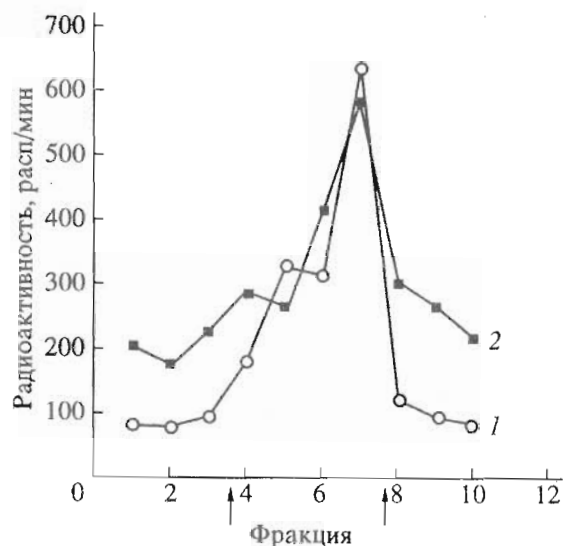
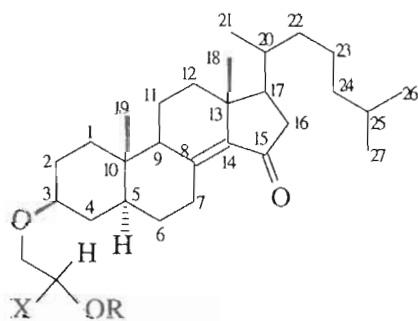


Рис. 1. Ультрацентрифугирование белковой фракции печени кролика в линейном градиенте сахарозы (5–25%) в присутствии 25-гидрокси ^3H холестерина (1) и 3β -(2-гидрокси-2- ^3H этоксид)-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (1*) (2). Стрелками показано положение маркерных белков: овальбумина (3.6 S) и γ -глобулина (7.8 S). Условия см. "Экспер. часть".

биосинтез холестерина в гепатоцитах кролика и клетках Нер G2, снижал активность рецептора липопротеинов низкой плотности в фибробластах кожи человека, проявлял гипохолестеринемический эффект и снижал уровень аполипопротеина В при введении с кормом мышам, без потери веса животных [26–28].



- (I): X = R = H
 (1*): X = ^3H ; R = H
 (II): X = H; R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}$
 (III*): X = ^3H ; R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}$
 (IV): X = H; R = CH_3CO

Цель данной работы – изучение взаимодействия 3β -(2-гидроксиэтоксид)-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (I) с OSBP (частично очищенная фракция из печени кролика), его влияния на активность HMG-CoA-редуктазы в клетках Нер G2, а также установление структуры основного метаболита соединения (I) в тех же клетках.

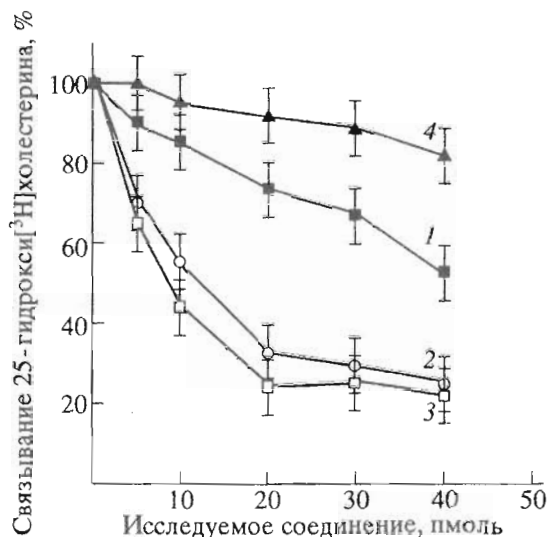


Рис. 2. Зависимость связывания 25-гидрокси ^3H холестерина OSBP (% к максимальному) в присутствии нерадиоактивных 3β -(2-гидроксиэтоксид)-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (I) (1), 25-гидроксихолестерина (2), 15-кетостерина (3), 7-кетохолестерина (4) от их концентрации. Условия см. "Экспер. часть".

Белковая фракция из печени кролика, содержащая OSBP, выделена известным методом [22, 33, 34]. Результаты ультрацентрифугирования выделенной фракции в присутствии 25-гидрокси ^3H холестерина (рис. 1, 1) указывают на образование радиоактивного комплекса с константой седиментации $\sim 7\text{ S}$, что согласуется с ранее опубликованными результатами [33, 34]. Наличие радиоактивного комплекса с близкой константой седиментации при ультрацентрифугировании той же фракции в присутствии 3β -(2-гидрокси-2- ^3H этоксид)-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (1*) (рис. 1, 2) свидетельствует о связывании соединения (1*) с OSBP.

Сродство соединения (I) к OSBP определяли по вытеснению им 25-гидрокси ^3H холестерина из комплекса с OSBP, как описано в работах [22–24, 33, 34] (рис. 2, 1), и сравнивали со сродством к OSBP известных оксистероидов (рис. 2, 2–4). Из рис. 2 видно, что сродство исследуемого соединения (I) к OSBP ниже, чем для 15-кетостерина и 25-гидроксихолестерина (обладающих, как известно, наибольшим сродством с OSBP среди 67 исследованных стероидов и оксипроизводных витамина D [6, 22, 23]), однако намного сильнее, чем у 7-кетохолестерина, для которого связывание с OSBP было также неоднократно показано ранее [22–24, 34].

Влияние соединения (I) на активность HMG-CoA-редуктазы исследовалось в клетках гепатоцитомы Нер G2 – общепринятой клеточной модели для изучения метаболизма липидов в печени человека [35]. Инкубация клеток Нер G2 с исследуемым соединением (I) в течение 4 ч приводила к

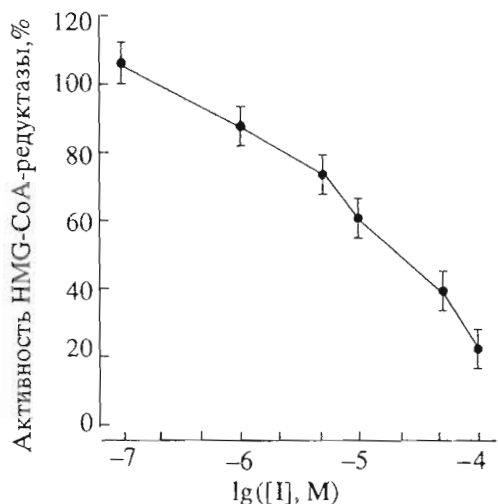


Рис. 3. Ингибирование активности НМГ-СоА-редуктазы в клетках Нер G2 под воздействием 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-5α-холест-8(14)-ен-15-она (I). Контрольное значение (в отсутствие соединения (I) принятое за 100%) составляло 18900 расп/мин и характеризовало количество [¹⁴C]мевалонолактона, образуемого за 1 ч в присутствии 1 мг клеточного белка.

снижению активности НМГ-СоА-редуктазы. Ингибирующий эффект зависел от концентрации соединения (I) в культуральной среде (рис. 3). Рассчитанное значение ID₅₀ (концентрация, вызывающая 50% ингибирование) составляло 2.7(±0.7) × 10⁻⁵ М. Как и для других оксистеринов [1, 3, 4, 6], добавление соединения (I) к лизату клеток Нер G2 не изменяло активности НМГ-СоА-редуктазы в лизате. Установленное сродство соединения (I) к OSBP и ингибирование им активности НМГ-СоА-редуктазы, наблюдаемое в клетках Нер G2, позволяет считать, что механизмы ингибирования биосинтеза холестерина 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-замещенными оксистеринами и родственными оксистеринами, содержащими природную 3β-гидроксильную группу, одни и те же.

Очевидно, однако, что метаболизм соединения (I) в клетках печени должен отличаться от метаболизма 15-кетостерина. Для изучения этого процесса клетки гепатомы Нер G2 инкубировали 2 ч с радиоактивным производным (I*) при его концентрации в среде 10⁻⁴ М, затем среду заменяли на свежую, не содержащую стерина, и продолжали

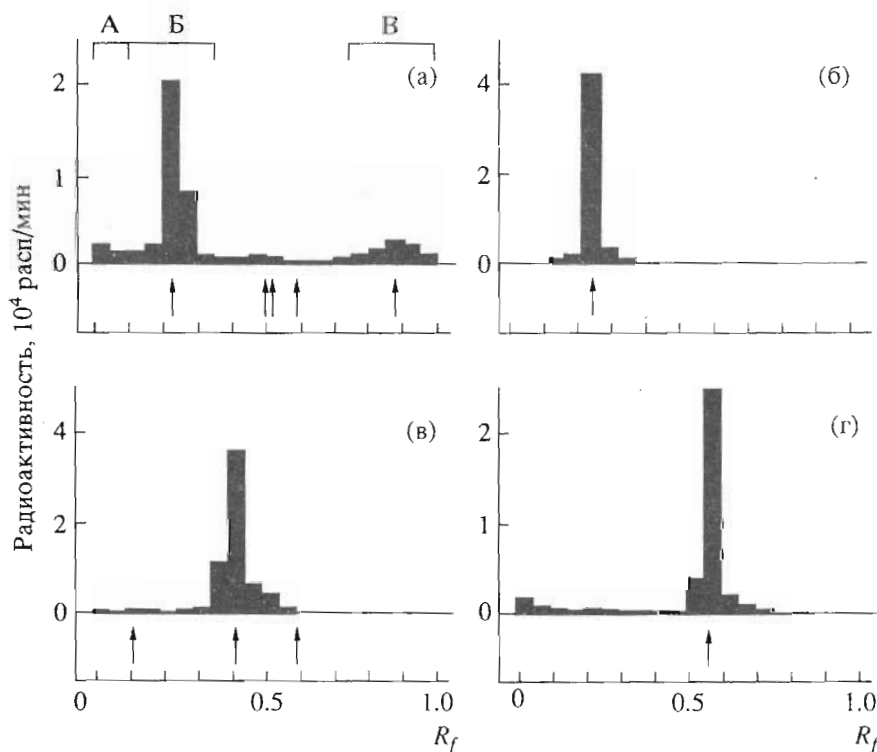


Рис. 4. Радио-ТСХ липидного экстракта клеток Нер G2, инкубированных с 3β-(2-гидрокси-2-[³H]этоксиг)-5α-холест-8(14)-ен-15-оном (I*). (а) — разделение липидного экстракта в системе 1. Стрелками показана хроматографическая подвижность стандартов (в скобках — значения R_f): 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-5α-холест-8(14)-ен-15-она (I) (0.22); 3β-(2-гидроксиэтоксиг)холеста-5,7-диена (0.50); 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-5α-холеста-7,14-диена (0.52); 3β-(2-гидроксиэтоксиг)холест-5-ена (0.58); 3β-[2-(9-цис-октадеценоилокси)этоксиг]-5α-холест-8(14)-ен-15-она (II) (0.87). (б) — рехроматография фракции Б в системе 2. Стрелкой показана хроматографическая подвижность 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-5α-холест-8(14)-ен-15-она (I) (0.24). (в) — рехроматография фракции В в системе 3. Стрелками показана хроматографическая подвижность 3β-(2-гидроксиэтоксиг)холест-5-ена (0.11), 3β-[2-(9-цис-октадеценоилокси)этоксиг]-5α-холест-8(14)-ен-15-она (II) (0.42) и 3β-[2-(9-цис-октадеценоилокси)этоксиг]холест-5-ена (0.60). (г) — хроматограмма ацетата В2 (радиоактивного продукта, полученного метанолизом фракции В с последующей обработкой уксусным ангидридом) в системе 4. Стрелкой показана хроматографическая подвижность 3β-(2-ацетоксигэтоксиг)-5α-холест-8(14)-ен-15-она (III) (0.56).

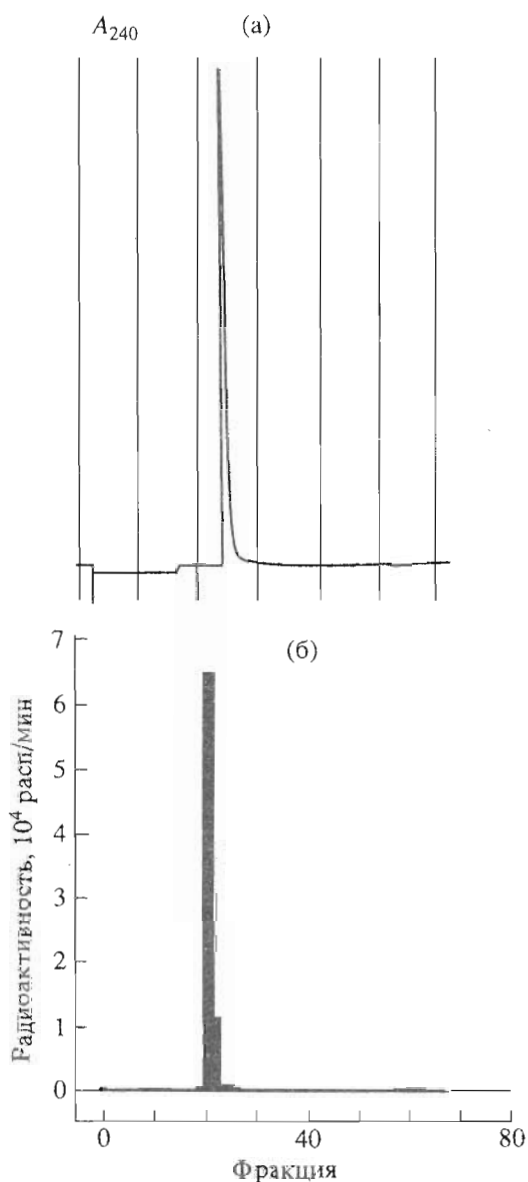


Рис. 5. ВЭЖХ-анализ радиоактивного продукта В2 в присутствии 20 мкг синтетического 3 β -(2-гидроксиэтоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-она (I) при спектрофотометрическом (а) и радиоактивном (б) детектировании фракций. Условия см. "Экспер. часть".

инкубацию еще 4 ч. Липиды из клеток и культуральной среды экстрагировали совместно по методу Блая и Даэра [36], органическую фазу (97% общей радиоактивности) использовали для анализа. Такая постановка опыта была обусловлена, во-первых, тем, что связывание радиоактивного аналога стерина (I*) с клетками в данных условиях достигало равновесия через 40–60 мин, что было выяснено в предварительных опытах, и, во-вторых, необходимо было проанализировать все образующиеся метаболиты соединения (I*), как содержащиеся в клетках, так и секретируемые в среду.

Предварительное разделение липидного экстракта (рис. 4а) показало наличие в нем трех радиоактивных фракций. Попытки рехроматографии полярной фракции А (6% общей радиоактивности) были неудачными вследствие низкого содержания радиоактивных продуктов и потерь радиоактивного материала при элюировании с силикагеля. Из фракции Б (72%) после рехроматографии (рис. 4б) и последующей ВЭЖХ выделено хроматографически гомогенное исходное соединение (I*) с выходом 67%. Основной продукт фракции В (19% общей радиоактивности) совпадал по хроматографической подвижности в трех системах с синтетическим 3 β -[2-(9-цис-октадецепоилокси)этоксиг]-5 α -холест-8(14)-ен-15-оном (II) (рис. 4в). Очищенный методом ВЭЖХ радиоактивный продукт В содержал 12% общей радиоактивности.

Большая молекулярная масса не позволила прямо проанализировать продукт В методом ГХ-МС. Продукт В подвергали метанолизу [37], затем наносили на микроколону с силикагелем, которую последовательно промывали смесями гексан-эфир (19 : 1) и гексан-этилацетат (1 : 1), что давало соответственно нерадиоактивную фракцию В1 и радиоактивный продукт В2.

ГХ-МС-анализ нерадиоактивной фракции В1 сравнением по индексу удерживания с заводским синтетическим образцом, а также по масс-спектру (m/z : 296 (9%), M^+ ; 222 (27%), $[M - (CH_2=C(OCH_3)OH)]^+$; 74 (71%), $[CH_2=C(OCH_3)OH]^+$) позволил идентифицировать в ней в качестве основного продукта метилолеат. Радиоактивный продукт В2 полностью совпадал с соединением (I) по данным ВЭЖХ (рис. 5); масс-спектры ТМС-производных продукта В2 и соединения (I) [27] были идентичны. В масс-спектре ТБДМС-производного продукта В2 помимо иона с m/z 558, являющегося молекулярным ионом соединения (I), был замечен ион с m/z 560 – молекулярный ион тритийзамещенного соединения (I*). Обработка продукта В2 уксусным ангидридом в пиридине приводила к радиоактивному ацетату, совпадающему, по данным ТСХ, с синтетическим 3 β -(2-ацетоксиэтоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-оном (III) (рис. 4г).

Таким образом, было показано, что в клетках Нер G2 соединение (I*) превращается в 3 β -[2-(9-цис-октадецепоилокси)-2-[³H]этоксиг]-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (II*). Синтетический олеат (II) не ингибировал биосинтез холестерина и активность НМГ-СоА-редуктазы в клетках Нер G2 при концентрации в культуральной среде 10⁻⁴ М и не вытеснял 25-гидрокси[³H]холестерин из комплекса с OSBP.

Хотя для 15-кетостерина ацилирование 3 β -гидроксигруппы в культуре клеток было известно ранее [13, 38, 39], в клетках печени образование ацильных производных 15-кетостерина было неизвестным. В отличие от 15-кетостерина, способного превращаться в клетках печени в 7-дегидрохолестерин, холестерин, 15-оксигенированные

стерины с гидроксированной боковой цепью, 3,15-дикетоны, а также желчные кислоты, соединения (I) не претерпевает превращения в аналогичные продукты (по крайней мере, их концентрация была слишком низка для детектирования в условиях наших опытов). Вероятно, соединение (I), превращающееся в биологически неактивный олеат (II), может быть использовано в исследованиях регуляторных эффектов биологически активных стероинов в клетках печени, поскольку сложности метаболических превращений других стероидов существенно ограничивают исследования их биологических эффектов в клетках на молекулярном уровне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3 β -(2-Гидроксиэтоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (I) и 3 β -(2-гидрокси-2-[3 H]этоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (I*) синтезированы как описано ранее [26, 27], 5 α -холест-8(14)-ен-3 β -ол-15-он (15-кетостерин) синтезирован по методу [40, 41], 3 β -(2-гидроксиэтоксиг)холест-5-ен, 3 β -(2-гидроксиэтоксиг)холеста-5,7-диен, 3 β -(2-ацетоксиэтоксиг)-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (III) и 3 β -[2-(9-цис-октадецен-10илокси)этоксиг]-5 α -холест-8(14)-ен-15-он (II) получены как описано ранее [25, 27]. 25-Гидроксихолестерин, NADPH, глюкозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, дитиотреит, неионный детергент "Brij 96", EDTA, трис(гидроксиметиламино)метан (трис), ингибитор протеиназ, фенолметилсульфонилфторид (PMSF) и PBS получены от фирмы Sigma, 25-гидрокси[2,4- 3 H]холестерин и 3-гидрокси-3-метил-[4- 14 C]глутарил-CoA – от New England Nuclear (NEN Research Products, Du Pont), хлороформ, гексан, метанол, этанол, изопропанол, муравьиная кислота квалификации "для ВЭЖХ" – от фирмы Мерск. Ацетон, этилацетат и диэтиловый эфир очищены обычными методами. Эмбриональная сыворотка теленка и культуральная среда "Opti MEM" получены от Gibco, культуральная среда F 12 – от Eurobio. Липопротеиндефицитная сыворотка выделена из плазмы крови здорового донора стандартным методом [42]. В работе использован культуральный пластик фирмы TPP (Plastic Products AG, Швейцария).

Белковая фракция из печени кролика, содержащая OSBP, получена как описано в работах [34, 43] с некоторыми модификациями. Свежую печень кролика гомогенизировали на льду с тремя объемами буфера А (10 мМ трис-HCl, 50 мМ NaF, 2 мМ EDTA, 1 мМ PMSF) и дважды центрифугировали (30 мин при 10000g, 4°C, затем 90 мин при 170000g, 4°C). К супернатанту прибавляли насыщенный раствор (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ до 30% насыщения и центрифугировали 30 мин (9000g, 4°C). Затем концентрацию (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ в супернатанте доводили до 50% насыщения и повторяли центрифугирование в тех же условиях. Полученный осадок растворяли в буфере Б (20 мМ трис-HCl, 1 мМ CaCl $_2$, pH 7.4), добавляли глицерин (10% по объему) и хранили при -70°C.

Комплекс OSBP с 25-гидрокси[3 H]холестерином получали и характеризовали по методу [24]. К 1 мл белковой фракции в буфере Б (содержание суммарного белка 0.6 мг) прибавляли 15 мкл спиртового раствора 25-гидрокси[3 H]холестерина (18 пмоль). Смесь инкубировали 90 мин при 4°C, затем прибавляли 200 мкл 5% суспензии активированного угля, предварительно обработанного декстраном [33, 44], центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин для осаждения угля, раствор насливали на сформированный линейный градиент плотности сахарозы (5–25%) в буфере Б. Общий объем раствора 11.7 мл. Ультрацентрифугирование проводили в роторе SW 41Ti на ультрацентрифуге Beckman L5 при 41000 об/мин при 4°C в течение 20 ч. В качестве стандартов использовали γ -глобулин (7.8 S) и овальбумин (3.6 S). После центрифугирования фракции объемом 1200 мкл отбирали сверху, аликвоты (200 мкл) из каждой фракции использовали для определения радиоактивности.

Комплекс OSBP с соединением (I*) получали и характеризовали в тех же условиях. Результаты представлены на рис. 1.

Сродство соединения (I) к OSBP измеряли как описано в работах [24, 33, 44]. Метод основан на вытеснении 25-гидрокси[3 H]холестерина из его комплекса с OSBP исследуемыми соединениями в различных концентрациях. Белковую фракцию, содержащую OSBP, разливали по 1 мл в пластиковые конические пробирки. Для каждого измерения использовались три пробы. Проба 1 содержала 0.5 мг белка, 6 пмоль 25-гидрокси[3 H]холестерина и 10 мкл этанола; проба 2 – 0.5 мг белка, 6 пмоль 25-гидрокси[3 H]холестерина, 300 пмоль 25-гидроксихолестерина и 10 мкл этанола; проба 3 – 0.5 мг белка, 6 пмоль 25-гидрокси[3 H]холестерина, исследуемое соединение (I) в концентрации 5–40 пмоль и 10 мкл этанола. Пробу инкубировали 90 мин при 4°C, затем в каждую вносили 200 мкл 5% суспензии активированного угля, обработанного декстраном [33, 44], выдерживали 15 мин при периодическом встряхивании и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин на микроцентрифуге Eppendorf. Радиоактивность определяли в 200-мкл аликвотах каждого супернатанта.

Разность в величинах радиоактивностей проб 1 и 2, характеризующую максимально возможное связывание 25-гидрокси[3 H]холестерина с OSBP в условиях эксперимента, принимали за 100%. Разность величин радиоактивностей проб 3 и 2 характеризует связывание 25-гидрокси[3 H]холестерина в присутствии исследуемого соединения в определенной концентрации (рис. 2).

Клетки гепатомы человека линии Hep G2, полученные из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Солсбери), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO $_2$, в среде Opti MEM (с 10% среды F 12) и 10% эмбриональной сыворотки теленка. Перед экспериментом

клетки, посаженные в чашки диаметром 80 мм, выдерживали 24 ч в той же среде в присутствии 10% липопротеиндефицитной сыворотки вместо эмбриональной. Соединения (I) и (I*) в этанольном растворе добавляли к культуральной среде перед экспериментом. Содержание этанола во всех опытах составляло 0.4%, в контрольных экспериментах (в отсутствие исследуемого соединения) содержание этанола в культуральной среде было таким же.

Влияние соединения (I) на активность НМГ-СоА-редуктазы в клетках Нер G2. Клетки инкубировали 4 ч в среде, содержащей соединение (I) в указанных концентрациях (рис. 3), затем трижды промывали охлажденным до 4°C PBS, клетки снимали механически с добавлением PBS и сразу же центрифугировали (1000g, 5 мин, 4°C). Супернатант удаляли, к клеточному остатку прибавляли 200 мкл буфера, pH 7.4 (0.1 М фосфат К, 0.2 М КСl, 0.5% Brij 96, 5 мМ EDTA), встряхивали 30 с на вортексе, инкубировали 15 мин при 37°C и центрифугировали (10000g, 15 мин, 4°C). Аликвоты супернатанта (2–40 мкг белка) использовали для измерения активности НМГ-СоА-редуктазы. Активность определяли с 3-гидрокси-3-метил[4-¹⁴C]глутарил-СоА в качестве субстрата по методу [45] с модификациями, опубликованными в работе [46]. Каждое измерение проводили трижды. Образование [¹⁴C]мевалонолактона линейно зависело от объема вносимой аликвоты в каждом из экспериментов.

Анализ метаболитов соединения (I). Клетки Нер G2 в 6 чашках инкубировали 2 ч с соединением (I*) в концентрации 10⁻⁴ М, затем среду заменяли на свежую, не содержащую соединения (I*), и продолжали инкубацию 4 ч. Клетки вместе с содержащейся в чашках культуральной средой трижды экстрагировали по методу [36]. После разделения фаз 97% общей радиоактивности содержалось в органической фазе. Растворитель упаривали, остаток растворяли в смеси хлороформ-метанол (2 : 1) и анализировали.

ТСХ проводили на пластинках DC Kieselgel (Merck) в системах: гексан-ацетон, 7 : 2 (1); гексан-этилацетат, 7 : 3 (2); гексан-этилацетат, 9 : 1 (3); гексан-этилацетат, 4 : 1 (4). Радиоактивную зону наносили на стартовую линию хроматограммы полосой в 10 см. Радиохроматограммы приведены на рис. 4.

Метанолиз радиоактивного продукта В (рис. 4а) проводили обычным методом [37]. После нейтрализации метанол упаривали в токе азота, остаток растворяли в 20 мкл эфира и наносили на колонку (0.5 × 3 см) с силикагелем G 40/70 (Merck). Колонку последовательно промывали 10 мл смеси гексан-эфир (19 : 1), собирая нерадиоактивный продукт (фракция В1), и 10 мл смеси гексан-этилацетат (1 : 1), собирая радиоактивный продукт (фракция В2).

ВЭЖХ проводили в изократическом режиме на приборе Du Pont 8800, снабженном колонкой Spherisorb ODS II, 5 мкм (Serva), при спектрофотометрическом детектировании (240 нм). Соединение

(I), радиоактивные продукты фракций В и В2 элюировали смесью метанол-вода (95 : 5), 3β-[2-(9-циксоктадеценилокси)этокси]-5α-холест-8(14)-ен-15-он, радиоактивный продукт В – смесью метанол-изопропанол (25 : 75). ВЭЖХ-анализ радиоактивного продукта В2 (рис. 5) проводили с добавлением стандарта (I) (рис. 5а), собирая фракции объемом 500 мкл, в которых определяли радиоактивность (рис. 5б).

ТМС- и ТБДМС-производные получали как описано ранее [27]. ГХ-МС-анализ проводили на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5890 с масс-спектрометрическим детектором MSD 5970 и капиллярной колонкой (0.25 мм × 50 м) с метилсиликоновой фазой SPB-1 (толщина 0.25 мкм) при скорости потока 1 см³/мин и программируемой температуре: 120°C $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{мин}}$ 280°C (30 мин). Масс-спектры регистрировались в интервале *m/z* 40–670 при энергии ионизации 70 эВ.

Авторы благодарны В.К. Шевцову и М.В. Пономареву (ВНИРО, Москва) за проведение ГХ-МС-анализа, Российскому фонду фундаментальных исследований (проект 95-04-12165а), фонду "Атеросклероз" (проект 518), Национальному институту здравоохранения и медицинских исследований Франции (INSERM, проект 94-EO-04) за оказанную финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith L.L., Johnson B. // Free Radicals Biol. Med. 1989. V. 7. P. 285–331.
2. Parish E.J., Chitracorn S., Luu B., Ourisson G. // Fed. Proc. 1986. V. 45. P. 1884 (abstr. 2335).
3. Schroepfer G.J. // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 585–621.
4. Rudney H., Panini R.S. // Curr. Opin. Lipidol. 1993. V. 4(3). P. 230–237.
5. Russel D.W. // Cardiovasc. Drugs Ther. 1992. V. 6. P. 103–110.
6. Parish E.J., Parish S.C., Li S. // Lipids. 1995. V. 30. P. 247–251.
7. Schroepfer G.J., Parish E.J., Chen H.W., Kandutsch A.A. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 8975–8980.
8. Miller L.R., Pinkerton F.D., Schroepfer G.J. // Biochem. Int. 1980. V. 1. P. 223–228.
9. Needleman D.H., Strong K., Stemke K.A., Brabson J.A., Kiscic A., Schroepfer G.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 148. P. 920–925.
10. Miller L.R., Raulston D.L., Schroepfer G.J. // Chem. Phys. Lipids. 1988. V. 47. P. 177–186.
11. Schroepfer G.J., Monger D., Taylor A.S., Chamberlain J.S., Parish E.J., Kiscic A., Kandutsch A.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977. V. 73. P. 1227–1233.
12. Schroepfer G.J., Sherril B.C., Wang K.S., Wilson W.K., Kiscic A., Clarkson T.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6861–6865.
13. Pajewsky T.N., Pinkerton F.D., Miller L.R., Schroepfer G.J. // Chem. Phys. Lipids. 1988. V. 48. P. 153–168.
14. St. Pyrek J., Vermilion J.L., Stephens T.W., Wilson W.K., Schroepfer G.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4536–4543.
15. Schroepfer G.J., Kim H.-S., Vermilion J.L., Stephens T.W., Pinkerton F.D., Needleman D.H., Wilson W.K.,

- St. Pyrek J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 151. P. 130–136.
16. *Kim H.-S., Wilson W.K., Needleman D.H., Pinkerton F.D., Wilson D.K., Quijcho F.A., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1989. V. 30. P. 247–261.
17. *Schroepfer G.J., Chu A.J., Needleman D.H., Izumi A., Nguen P.T., Wang K.-S., Little J.M., Sherrill B.C., Kiscic A.* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 4110–4123.
18. *Swaminathan S., Pinkerton F.D., Schroepfer G.J.* // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 793–795.
19. *Herz J.E., Swaminathan S., Pinkerton F.D., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 579–598.
20. *Gerst N., Pinkerton F.D., Kiscic A., Wilson W.K., Swaminathan S., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1994. P. 35. V. 1040–1056.
21. *Swaminathan S., Siddiqui A.U., Gerst N., Pinkerton F.D., Kiscic A., Kim L.J., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1995. V. 36. P. 767–786.
22. *Taylor F.R., Sausier S.E., Shown E.P., Parish E.J., Kandutsch A.A.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 12382–12387.
23. *Taylor F.R., Kandutsch A.A.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1985. V. 38. P. 187–194.
24. *Patel N., Thompson E.B.* // *J. Clin. Endocrin. Met.* 1990. V. 71. P. 1637–1645.
25. *Misharin A.Yu., Malugin A.V., Steinschneider A.Ya., Kosykh V.A., Novikov D.K.* // *Med. Chem. Res.* 1993. V. 3. P. 451–458.
26. *Misharin A.Yu., Malugin A.V., Steinschneider A.Ya., Abramov V.V., Kosykh V.A., Medvedeva N.V., Morozkin A.D.* // *Med. Chem. Res.* 1994. V. 4. P. 189–195.
27. *Misharin A.Yu., Alquier C., Steinschneider A.Ya., Malugin A.V., Lafont H.* // *Med. Chem. Res.* 1995. V. 5. P. 409–416.
28. *Malugin A.V., Medvedeva N.V., Abramov V.V., Misharin A.Yu.* // *Atherosclerosis.* 1994. V. 109. P. 197.
29. *Мамбетисаева Э.Т., Косых В.А., Мишарин А.Ю., Косенков Е.В., Подрез Е.А., Репин В.С.* // *Биохимия.* 1993. Т. 58. С. 1126–1132.
30. *Малюгин А.В., Новиков Д.К., Косых В.А., Косенков Е.В., Медведева Н.В., Валентинова Н.В., Штейншнейдер А.Я., Мишарин А.Ю.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 541–547.
31. *Малюгин А.В., Штейншнейдер А.Я., Косых В.А., Алки К., Лафонт Ю., Мишарин А.Ю.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 606–610.
32. *Малюгин А.В., Новиков Д.К., Алки К., Лафонт Ю., Мишарин А.Ю.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 717–720.
33. *Kandutsch A., Shown E.P.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 13068–13073.
34. *Beseme F., Astruc M.E., Defay R., Descomps B., Crastes de Paulet A.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 886. P. 96–108.
35. *Javitt N.B.* // *FASEB J.* 1990. V. 4. P. 161–168.
36. *Bligh E.G., Dyer W.J.* // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. V. 37. P. 911–923.
37. *Lipid Analysis. A Practical Approach* / Eds R.J. Hamilton, S. Hamilton. Oxford: IRL Press, 1993.
38. *Miller L.R., Pinkerton F.D., Needleman D.H., Brabson J.S., Sang K.S., Schroepfer G.J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 148. P. 934–940.
39. *Brabson J.S., Schroepfer G.J.* // *Steroids.* 1988. V. 52. P. 51–68.
40. *Wilson W.K., Wang K.S., Kiscic A., Schroepfer G.J.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1988. V. 47. P. 7–17.
41. *Беликов О.Е., Штейншнейдер А.Я., Мишарин А.Ю.* // *Биоорганическая химия.* 1992. Т. 18. С. 1127–1130.
42. *Lindgren F.T.* // *Analysis of Lipids and Lipoproteins* / Ed. E.G. Perkins. Amsterdam: Amer. Oil Chemists' Soc., 1975. P. 202–224.
43. *Dawson P.A., Van der Westhuyzen D.R., Goldstein J.L., Brown M.S.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 9046–9052.
44. *Beato M., Feigelson P.* // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. P. 7890–7896.
45. *Brown M.S., Faust R.H., Goldstein J.L., Kaneko I., Endo A.* // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. P. 1121–1132.
46. *Nagata Y., Hidaka Y., Ishida F., Kamei T.* // *Biochem. Pharmacol.* 1990. V. 40. P. 843–849.

Affinity of 3β -(2-Hydroxyethoxy)- 5α -Cholest-8(14)-en-15-one to Oxysterol Binding Protein and Its Metabolism in Hepatoma Hep G2 Cells

A. Yu. Misharin*, A. S. Krylov*, C. Alquier**, H. Lafont**, A. Ya. Shteinsneider*, V. A. Kosykh*, and A. D. Morozkin*

* *Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, 3-ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia*

** *Laboratory of Lipid Transport (INSERM-U 130), Marseilles, France*

Abstract.— 3β -(2-Hydroxyethoxy)- 5α -cholest-8(14)-en-15-one, a synthetic inhibitor of cholesterol biosynthesis, was shown to exhibit a high affinity to oxysterol binding protein. This was proved by ultracentrifugation of the protein fraction from rabbit liver in the presence of the ^3H -labeled inhibitor, 3β -(2-hydroxy-2-[^3H]ethoxy)- 5α -cholest-8(14)-en-15-one, or by the substitution of the [^3H]-25-hydroxycholesterol in its complex with the oxysterol binding protein. In human hepatoma Hep G2 cells, the inhibitor decreased activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase [ID_{50} (2.7 ± 0.7) $\times 10^{-5}$ M] and was transformed into 3β -[2-(9-Z-octadecenoyloxy)ethoxy]- 5α -cholest-8(14)-en-15-one.

Key words: oxysterols, sterol metabolism; Hep G2 cells; oxysterol binding protein.