



УДК 577.125

## ПРЕВРАЩЕНИЕ 3 $\beta$ -(2-ГИДРОКСИЭТОКСИ)-5 $\alpha$ -ХОЛЕСТ-8(14)-ЕН-15-ОНА В ПОЛЯРНЫЙ МЕТАБОЛИТ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ Нер G2

© 2003 г. Е. А. Пиир, Д. В. Игнатов, Н. В. Медведева, А. Ю. Мишарин<sup>#</sup>

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119992, Москва, Погодинская ул., 10

Поступила в редакцию 14.06.2002 г. Принята к печати 24.12.2002 г.

Инкубация 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она (15-кетостерина) с клетками Нер G2 приводила к накоплению в культуральной среде полярного метаболита, который был идентифицирован как 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтоксид)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овая кислота. Его структура подтверждена встречным синтезом. 15-Кетостерин быстро ( $t_{1/2}$  6 мин) и равновесно связывался с клетками Нер G2. Внутриклеточная концентрация 15-кетостерина при инкубации снижалась в основном за счет образования полярного метаболита, секретируемого в среду. Уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 при концентрации 15-кетостерина в среде, равной 30 мкМ, составлял  $22 \pm 5\%$  контрольного значения, однако после 3 ч дальнейшей инкубации в среде без ингибитора уровень биосинтеза восстанавливался ( $85 \pm 11\%$  контрольного значения). Результаты свидетельствуют, что подавление биосинтеза холестерина 15-кетостерином в клетках Нер G2 зависит от внутриклеточной концентрации ингибитора, которая в свою очередь определяется скоростью его превращения в полярный метаболит.

*Ключевые слова:* ингибирование биосинтеза холестерина; клетки гепатомы Нер G2; метаболизм; оксистерин.

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетические 15-оксигенированные стеринны, т.е. стеринны, несущие гидрокси- или кетогруппу в положении C15, обладают широким спектром биологической активности в клетках млекопитающих [1]. Известный ингибитор биосинтеза холестерина 5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-3 $\beta$ -ол-15-он (15-кетостерин), обладающий мощным гипохолестеринемическим и антиатерогенным эффектом *in vivo* [1–6], метаболизирует в печени крысы с образованием серии продуктов, главные из которых – 5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-он-3 $\beta$ ,26-диол, 5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-он-3 $\beta$ ,25-диол, 3 $\beta$ -гидрокси-15-кето-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-26-овая кислота, 3 $\beta$ -гидрокси-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овая кислота и 3,15-дикето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овая кислота [7, 8]. В ряде работ [1, 8–10] имеются ссылки на неопубликованные данные о превращении 15-кетостерина в клетках Нер G2 в те же полярные продукты.

Проводя изучение биологической активности и метаболизма 3-замещенных производных 15-кетостерина [11–17], мы ранее обнаружили, что 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-он (I) в клетках Нер G2 преимущественно образует ацильные производные [12, 14]. При этом было замечено также образование полярного метаболита, однако его структура не устанавливалась

вследствие низкого содержания. Инкубируя 3 $\beta$ -(2-гидрокси-[2-<sup>3</sup>H]этоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-он (<sup>3</sup>H-I) с клетками Нер G2 и анализируя радиоактивные продукты, мы обнаружили в культуральной среде значительное количество полярного метаболита (II). В настоящем сообщении описывается идентификация этого продукта, а также оценка скоростей его образования в клетках Нер G2 и секреции в культуральную среду.

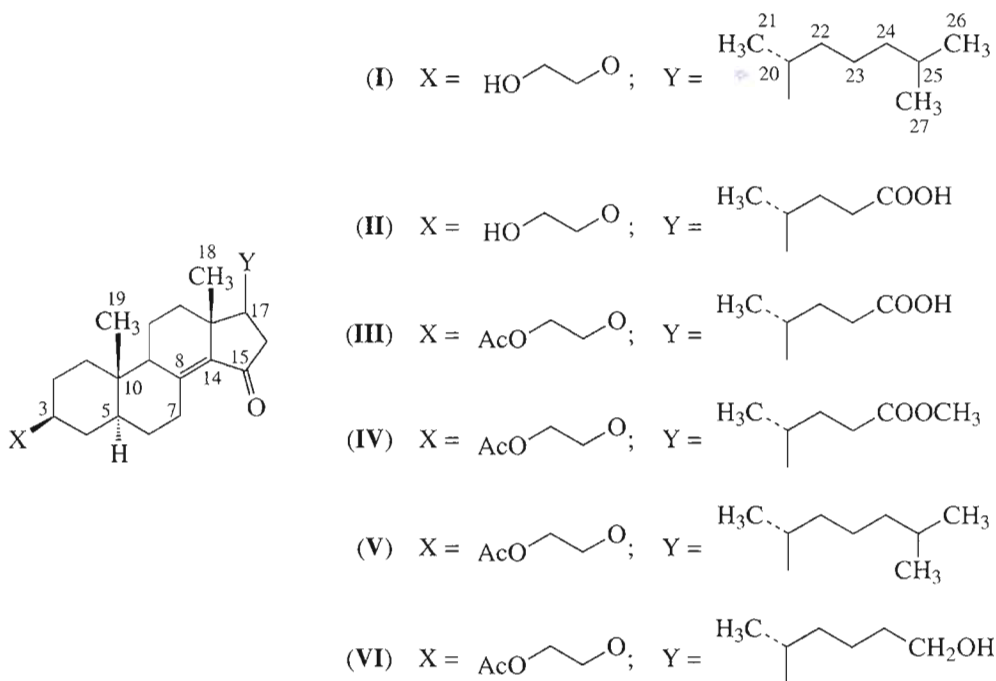
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инкубации клеток Нер G2 с 15-кетостерином (I) в присутствии следовых количеств его радиоактивного аналога (<sup>3</sup>H-I) продукты экстрагировали из культуральной среды, полярный метаболит (II) выделяли с помощью ТСХ. В ходе инкубации  $36 \pm 9\%$  кетостерина (I) превращались в полярный метаболит (II) (рис. 1). Измерив концентрации радиоактивных продуктов в клетке и в среде, мы заключили, что клетки Нер G2 (1 мг клеточного белка) за 14 ч инкубации с 10 нмоль соединения (I) продуцировали 3–4 нмоль соединения (II).

Выделенный из культуральной среды продукт (II) связывался с анионообменником, что позволило предположить наличие в нем карбоксильной группы. Последовательная обработка соединения (II) смесью Ас<sub>2</sub>О/Ру и эфирным раствором диазометана приводила к производным (III) и (IV), что указывало на наличие в продукте (II) свободных гидроксильной и карбоксильной групп. В масс-

Сокращения: НМГ-СоА – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А; ЛПДС – липопротеиндефицитная сыворотка (плазмы крови человека); PBS – фосфатсодержащий физиологический раствор (рН 7.4).

<sup>#</sup> Автор для переписки (эл. почта: misharin@ibmh.msk.su; тел.: (095) 246-33-75).



спектре соединения (IV) были найдены интенсивные пики с *m/z* 488 и 369, отвечающие молекулярно-иону ацетоксиэфира (IV) и его фрагменту без C17-боковой цепи (см. таблицу). Известные данные о деградации боковой цепи оксистероинов в клетках печени [18–20] указывают на возможность расщепления боковой цепи при C24 под действием пероксисомальных ферментов. Исходя из этого, мы предположили, что полярный метаболит (II) является 3β-(2-гидроксиэтоксиг)-15-кето-5α-хол-8(14)-ен-24-овой кислотой. Для доказательства был предпринят встречный химический синтез соединения (II) и его производных (III) и (IV).

Окислительное расщепление боковой цепи ацетилированного стерина (V) мы проводили в условиях, разработанных ранее для избирательного расщепления боковой цепи 3β-ацетокси-5α-холест-8(14)-ен-15-она [8, 21]. 3β-(2-Ацетоксиэтоксиг)-15-кето-5α-хол-8(14)-ен-24-ол (VI), полученный с выходом 36%, окисляли хромовой кислотой в ацетоне, что приводило к ацетилированной кислоте (III) с выходом 47%. Щелочной гидролиз продукта (III) давал искомую кислоту (II), а метилирование продукта (III) диазометаном в эфирном растворе – метиловый эфир (IV). ТСХ-характеристики синтетических продуктов (II)–(IV) полностью совпадали с характеристиками соединений (II)–(IV), выделенных из культуральной среды. Отсутствие в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрах соединений (II), (III), (IV) и (VI) сигналов H26- и H27-протонов C25-метильных групп и совпадение масс-спектров меченого производного (IV) и синтетического

ацетилированного метилового эфира (IV) однозначно подтверждало структуру метаболита (II).

Следующей задачей являлась оценка скорости превращения 15-кетостерина (I) в кислоту (II) и содержания 15-кетостерина (I) и его метаболитов в клетках Нер G2 во время инкубации. Для этого мы провели два эксперимента, результаты которых представлены на рис. 2. В первом эксперименте клетки инкубировали с 15-кетостерином (I) в присутствии его радиоактивного аналога (<sup>3</sup>H-I) и анализировали содержание радиоактивных соединений в клетках через определенные промежутки времени (рис. 2, кривые 1, 3, 5). Во втором эксперименте клетки инкубировали с 15-кетостерином (I) в присутствии его радиоактивного аналога (<sup>3</sup>H-I) в течение 3 ч, после чего продолжали инкубацию в отсутствие меченого соединения (<sup>3</sup>H-I) и также анализировали содержание радиоактивных соединений в клетках (рис. 2, кривые 2, 4, 6). Из рис. 2 следует, что связывание 15-кетостерина (I) в клетках достигало насыщения за 40 мин (время полуустановления равновесия, *t*<sub>1/2</sub> составляло 6 мин). Во втором эксперименте после удаления <sup>3</sup>H-меченого соединения (I) из культуральной среды содержание радиоактивного 15-кетостерина (<sup>3</sup>H-I) в клетке в ходе дальнейшей инкубации быстро снижалось (рис. 2, кривая 2), что свидетельствовало о равновесном обмене кетостерина (I) между клетками и культуральной средой и его быстром метаболизме. В условиях эксперимента около 15% 15-кетостерина (I) превращалось в ацильные производные [12], преимущественно накапливавшиеся в клетках, а более

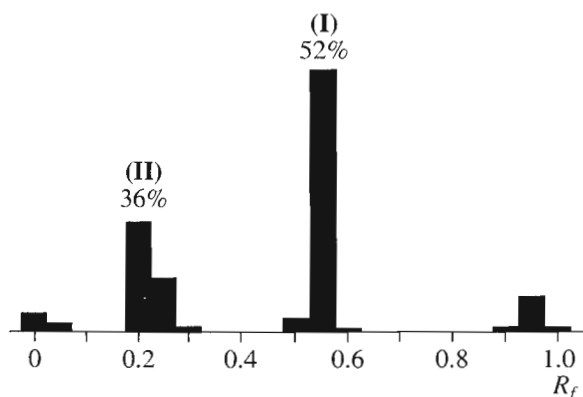
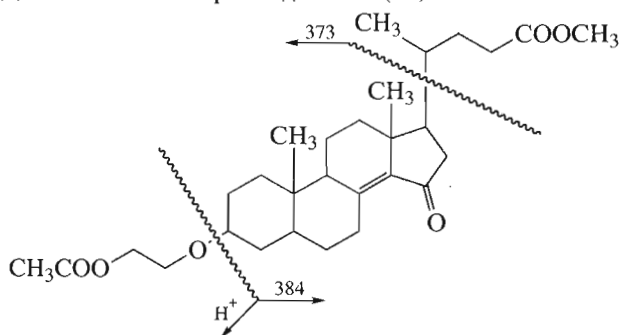


Рис. 1. Радиохроматограмма продуктов, выделенных из культуральной среды после инкубации клеток Нер G2 с 15-кетостерином ( $^3\text{H}$ -I). Соединения: (I),  $R_f$  0.56; (II),  $R_f$  0.23;  $3\beta$ -[2-(9Z-октадеценоилокси)этокси]-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-он,  $R_f$  0.95.

60% – в полярный метаболит (II), быстро секретированный в культуральную среду.

Известно, что способность 15-оксигенированных производных холестерина и ланостерина ингибировать биосинтез холестерина в клетках печени в 20–40 раз слабее, чем в других типах клеток [1, 11, 12, 17]. Мы предположили, что этот эффект связан с быстрым катаболизмом 15-оксигенированных стероидов в клетках печени. На рис. 3 представлены данные сравнения уровней биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 в отсутствие кетостерина (контроль) и в клетках, преинкубированных

Данные масс-спектра соединения (IV)



Ион	$m/z$	$I, \%$
$M^+$	488	84
$[M - \text{CH}_3]^+$	473	6
$[M - \text{CH}_3\text{COO} - \text{H}]^+$	428	6
$[M - \text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O} - \text{H}]^+$	384	21
$[M - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$	373	15
$[M - \text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O} - \text{H} - \text{CH}_3]^+$	369	81
$[M - \text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O} - \text{H} - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3]^+$	269	60
$[M - \text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{O} - \text{H} - \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$	251	100

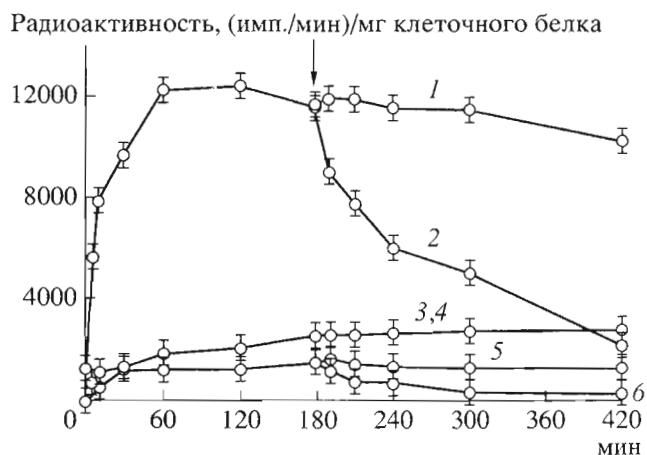
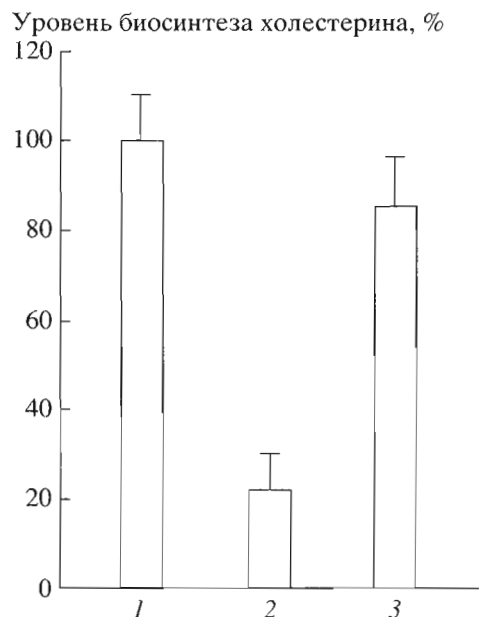


Рис. 2. Содержание 15-кетостерина (I) и его метаболитов в клетках Нер G2 в процессе инкубации в течение 420 мин в присутствии радиоактивного кетостерина ( $^3\text{H}$ -I) (эксперимент 1, кривые 1, 3, 5) и при замене среды через 3 ч инкубации (указано стрелкой) на среду без радиоактивного кетостерина ( $^3\text{H}$ -I) (эксперимент 2, кривые 2, 4, 6). Кривые 1, 2 – 15-кетостерин; 3, 4 – ацильные производные, 5, 6 – полярные метаболиты.

с 15-кетостерином (I) в разных условиях (эксперименты 1 и 2). Из рис. 3 следует, что 15-кетостерин (I) эффективно подавлял биосинтез холестерина, но его ингибирующий эффект был обратимым и снижался последующей инкубацией клеток в среде без 15-кетостерина (I), когда внутриклеточная концентрация 15-кетостерина (I) быстро снижалась вследствие его равновесного выхода в среду и превращения в полярный метаболит (II).

Ранее, изучая влияние восьми  $\Delta^{8(14)}$ -15-кетостероидов на экспрессию стеролчувствительных генов в клетках Нер G2 [17], мы показали, что исследованные кетостерины не влияли на содержание мРНК рецептора липопротеинов низкой плотности и незначительно снижали содержание мРНК НМГ-СоА-редуктазы (при высоких концентрациях и после длительной (>12 ч) инкубации). Это позволило нам сделать вывод [17, 22] о том, что  $\Delta^{8(14)}$ -15-кетостерины не являются регуляторами транскрипции гена НМГ-СоА-редуктазы, а ингибирование биосинтеза холестерина этими соединениями подчиняется механизму, отличному от механизма действия 25-гидроксихолестерина и других стероидов, гидроксилированных в боковой цепи [1, 23].

Полученные в настоящей работе результаты, по-видимому, могут объяснить различную способность  $\Delta^{8(14)}$ -15-кетостероидов подавлять биосинтез холестерина в разных типах клеток. Эти соединения – мощные ингибиторы биосинтеза холестерина и активности НМГ-СоА-редуктазы в клетках, в которых боковая цепь стероидов не подвергается заметному гидроксильрованию и расщеплению, а внутриклеточный баланс холестерина преимущественно контролируется классической регуляцией



**Рис. 3.** Влияние 15-кетостерина (I) на уровень биосинтеза холестерина из [1-<sup>14</sup>C]ацетата в клетках Hep G2. 1 – контрольный эксперимент в отсутствие 15-кетостерина (I); 2 – первый эксперимент: 1 ч преинкубации с 30 мкМ раствором 15-кетостерина (I), затем 3 ч инкубации с [1-<sup>14</sup>C]ацетатом в присутствии 15-кетостерина (I); 3 – второй эксперимент: 1 ч преинкубации с 30 мкМ раствором 15-кетостерина (I), смена среды и 3 ч инкубации в отсутствие кетостерина (I), затем 3 ч инкубации с [1-<sup>14</sup>C]ацетатом в отсутствие 15-кетостерина (I). Контрольное значение, принятое за 100%, составляло 20400 (имп./мин/мг белка за 3 ч).

по типу обратной связи [23–25]. Напротив,  $\Delta^8(14)$ -15-кетостерина сравнительно слабо подавляют биосинтез холестерина и активность HMG-CoA-редуктазы в клетках печени, поскольку в них концентрация ингибитора всегда низка из-за его быстрой деградации и образования полярных продуктов, выходящих из клетки.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 3 $\beta$ -(2-гидроксиэтоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она (I) и его <sup>3</sup>H-меченого аналога 3 $\beta$ -(2-гидрокси-[2-<sup>3</sup>H]этоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она (<sup>3</sup>H-I) проведен как описано ранее [13], синтез 3 $\beta$ -(2-ацетоксиэтоксид)-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она (V) по методу [14]. ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel UV 254, HPTLC Kieselgel UV 254 и PSC Kieselgel UV 254 фирмы “Merck” в системе А (гексан–EtOAc–CH<sub>3</sub>COOH, 34 : 15 : 1), если не указано особо. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры регистрировали на приборе AMX-III-400 (Bruker) в дейтерохлороформе. Масс-спектры получали на приборе Kratos RAS MS-890 в режиме электронного удара при энергии ионизации 70 эВ. Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике фирмы “LKB”. Клетки гепатомы человека линии Hep G2 получены

из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury). Условия культивирования клеток Hep G2 и проведения экспериментов с оксистеринами были описаны нами ранее [12, 14–17, 22].

**3 $\beta$ -(2-Ацетоксиэтоксид)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-ол (VI).** К смеси 14 мл (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O и 6 мл 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, охлажденной до –6°C, при интенсивном перемешивании по каплям в течение 15 мин прибавляли 1.4 мл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, поддерживая температуру смеси в пределах от –6 до –3°C. Затем при –2°C и интенсивном перемешивании вносили 240 мг (0.5 ммоль) ацетата (V). Смесь перемешивали при 0°C 1 ч, при этом вязкая масса полностью растворялась. Ярко-желтый раствор перемешивали еще 2 ч при комнатной температуре, после чего выливали в 120 мл воды со льдом, экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (2 × 20 мл), насыщенным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 × 20 мл), 2% HCl (до pH 5 в водной фазе), водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток растворяли в 20 мл MeOH, прибавляли 0.2 мл Et<sub>3</sub>N и перемешивали 2 ч для полного гидролиза трифторацетатной группы. Раствор упаривали, остаток разделяли препаративной ТСХ в системе гексан–EtOAc (3 : 1), выделяя зону с R<sub>f</sub> 0.48. Соединение (VI) получено в виде прозрачной пленки. Выход 73 мг (0.18 ммоль, 36%). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр: 0.697 (3H, с, H18); 0.959 (3H, с, H19); 1.000 (3H, д, J 6.6 Гц, H21); 2.031 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO); 3.305 (1H, м, H3); 3.650 (2H, м, OCH<sub>2</sub>-); 4.016 (2H, м, H24); 4.120 (1H, м, H7); 4.190 (2H, м, CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>-).

**3 $\beta$ -(2-Ацетоксиэтоксид)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овая кислота (III).** К раствору соединения (VI) (60 мг, 130 мкмоль) в 5 мл ацетона прибавляли 1 мл реагента Джонса (приготовленного из 2.7 г CrO<sub>3</sub>, 2.3 мл конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 7.7 мл воды [26]), смесь перемешивали 20 ч при комнатной температуре, прибавляли 1 мл PrOH, перемешивали 20 мин, прибавляли 20 мл этилацетата, органический слой отделяли, промывали водой до обесцвечивания, концентрировали, продукты разделяли препаративной ТСХ в системе А, выделяя зону с R<sub>f</sub> 0.36. После элюирования вещества смесью EtOAc–CH<sub>3</sub>COOH (9 : 1), упаривания растворителя и высушивания в вакууме получили 28 мг (60 мкмоль, 47%) соединения (III) в виде белого аморфного порошка. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр: 0.702 (3H, с, H18); 1.013 (3H, д, J 6.6 Гц, H21); 1.036 (3H, с, H19); 2.036 (3H, с, CH<sub>3</sub>CO); 3.228 (1H, м, H3); 3.654 (2H, м, HCOCH<sub>2</sub>-); 4.123 (1H, м, H7); 4.181 (2H, м, CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>-).

**Метилловый эфир 3 $\beta$ -(2-ацетоксиэтоксид)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овой кислоты (IV).** Кислоту (III) (5 мг) растворяли в 0.5 мл MeOH, при перемешивании прибавляли избыток эфирного раствора диазометана, смесь перемешивали 1 ч и упаривали досуха. Продукт (IV) был гомогенен

по данным ТСХ и имел  $R_f$  0.52 в системе А.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр: 0.697 (3H, с, H18); 0.962 (3H, с, H19); 0.992 (3H, д,  $J$  6.6 Гц, H21); 2.072 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 3.294 (1H, м, H3); 3.616 (3H, с,  $\text{CH}_3\text{O}$ ); 3.665 (2H, м,  $\text{OCH}_2$ -); 4.123 (1H, м, H7); 4.187 (2H, м,  $\text{CH}_2\text{COOCH}_2$ -); масс-спектр см. таблицу.

**3 $\beta$ -(2-Гидроксиэтокси)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овая кислота (II).** Смесь кислоты (III) (12 мг, 26 мкмоль, 260  $\text{OE}_{254}$ ) 1 мл MeOH и 0.5 мл 4 н. водного NaOH перемешивали 2 ч, нейтрализовали 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , прибавляли 2 мл воды и экстрагировали этилацетатом, содержащим 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $3 \times 5$  мл). Экстракт упаривали, продукты разделяли препаративной ТСХ в системе А, выделяя зону с  $R_f$  0.23. Выход соединения (II) 200  $\text{OE}_{254}$  (80%),  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр: 0.706 (3H, с, H18); 0.970 (3H, с, H19); 0.998 (3H, д,  $J$  6.6 Гц, H21); 3.309 (1H, м, H3); 3.576 (2H, м,  $\text{OCH}_2$ -); 3.703 (2H, м,  $\text{OCH}_2$ -); 4.118 (1H, м, H7).

**Выделение соединения (II) из культуральной среды и его характеристика.** Клетки Нер G2, выращенные в трех чашках диаметром 35 мм (с содержанием клеточного белка 0.7 мг/чашку) перед экспериментом инкубировали 24 ч в среде, содержащей 10% ЛПДС. В каждую чашку вносили по 2 мл 10 мкМ раствора 15-кетостерина (I) в культуральной среде с 10% ЛПДС, содержащего  $6 \times 10^5$  (имп/мин)/мл радиоактивного 15-кетостерина ( $^3\text{H}$ -I). Инкубацию проводили при 37°C в течение 14 ч. Объединенную культуральную среду (6 мл) упаривали досуха с добавлением этанола, экстрагировали смесью EtOH–EtOAc– $\text{CH}_3\text{COOH}$  (2 : 2 : 1) ( $3 \times 3$  мл). Экстракт, содержащий 97% от общей радиоактивности, упаривали, суспендировали в 3 мл смеси EtOH–EtOAc– $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5 : 5 : 1) и наносили на микроколону с NuFlo Supercel (Johns-Manville Corp., США), которую промывали той же смесью до отсутствия радиоактивности в элюируемых фракциях. Элюат упаривали, остаток растворяли в минимальном объеме смеси EtOH–EtOAc– $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5 : 5 : 1) и алиquotу анализировали методом ТСХ в системах А и гексан–EtOAc (7 : 3). После проведения хроматографии высушенную пластинку разделяли на 20 зон, в каждой из которых определяли радиоактивность.

Для препаративного выделения фракции полярных метаболитов объединенный экстракт из культуральной среды хроматографировали на двух аналитических пластинках ( $20 \times 20$  см) в системе гексан–EtOAc (7 : 3), двойное проявление. Зону радиоактивных полярных продуктов ( $R_f$  0–0.15) экстрагировали смесью EtOH–EtOAc– $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5 : 5 : 1), экстракт упаривали досуха, остаток растворяли в 10 мл 70% водного EtOH, доводили pH до 8.0 добавлением 0.1 н.  $\text{NH}_4\text{OH}$ , и полученный раствор нанесли на колону с 3.5 мл анионообменной смолы BioRad AG1 ( $\text{OH}^-$ ), смолу промывали 10 мл 50% водного EtOH, радиоактивную фрак-

цию (89% от нанесенной радиоактивности) элюировали смесь EtOH– $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5 : 4 : 1), упаривали и остаток хроматографировали на аналитической пластинке ( $20 \times 20$  см) в системе А. Не менее 85% от нанесенной радиоактивности содержалось в зоне с  $R_f$  0.23, совпадающей по хроматографическим характеристикам с синтетическим стандартом (II). Радиоактивный продукт элюировали смесью EtOH– $\text{H}_2\text{O}$ – $\text{CH}_3\text{COOH}$  (5 : 4 : 1), упаривали, и остаток растворяли в 60 мкл этанола.

Алиquotу радиоактивного продукта (II) (15 мкл,  $3 \times 10^5$  имп/мин) высушивали упариванием с безводным пиридином, растворяли в 300 мкл пиридина, добавляли 100 мкл  $\text{As}_2\text{O}_3$ , выдерживали смесь 14 ч при комнатной температуре, добавляли 1 мл пиридина, 300 мкл этанола, выдерживали еще 1 ч, растворитель упаривали, и остаток переупаривали с добавлением воды и этанола. Полученный продукт растворяли в 15 мкл этилацетата. Алиquotу (5 мкл,  $10^5$  имп/мин) анализировали методом ТСХ в системе А в присутствии синтетических стандартов (II) ( $R_f$  0.23) и (III) ( $R_f$  0.36). Хроматографическая подвижность полученного радиоактивного продукта полностью совпадала с подвижностью синтетической 3 $\beta$ -(2-ацетоксиэтокси)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овой кислоты (III).

Алиquotу полученного радиоактивного ацетата (III) (10 мкл,  $2 \times 10^5$  имп/мин) упаривали досуха, растворяли в 500 мкл метанола, прибавляли избыток эфирного раствора диазометана, выдерживали смесь 3 ч, растворитель упаривали, остаток растворяли в 15 мкл этилацетата. Алиquotу (5 мкл,  $10^5$  имп/мин) анализировали методом ТСХ в системе А в присутствии синтетических стандартов (III) ( $R_f$  0.36) и (IV) ( $R_f$  0.52). Алиquotу (10 мкл) использовали для проведения масс-спектрометрического анализа. Хроматографическая подвижность полученного радиоактивного продукта полностью совпадала с подвижностью синтетического метилового эфира 3 $\beta$ -(2-ацетоксиэтокси)-15-кето-5 $\alpha$ -хол-8(14)-ен-24-овой кислоты (IV), его масс-спектр был идентичен масс-спектру синтетического соединения (IV).

**Содержание 15-кетостерина (I) и его метаболитов в клетках Нер G2 в процессе инкубации.** Клетки Нер G2, выращенные в 24-ячеечном планшете (содержание клеточного белка 0.2 мг/ячейку), перед экспериментами инкубировали 24 ч в среде с 10% ЛПДС.

**В первом эксперименте** проводили оценку накопления 15-кетостерина (I) и его метаболитов в клетках, инкубируемых при постоянной концентрации меченого аналога кетостерина ( $^3\text{H}$ -I) в культуральной среде. Для этого в каждую ячейку вносили по 300 мкл 10 мкМ раствора 15-кетостерина (I) в культуральной среде с 10% ЛПДС, содержащего  $6 \times 10^5$  (имп./мин)/мл  $^3\text{H}$ -меченого 15-кетостерина. Инкубацию проводили при 37°C в течение 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 и

420 мин. После инкубации клетки промывали PBS при 4°C и экстрагировали смесью EtOH–EtOAc–CH<sub>3</sub>COOH (4 : 5 : 1) (3 × 1 мл).

**Во втором эксперименте** проводили оценку содержания 15-кетостерина (I) и его метаболитов в клетках, преинкубированных с 15-кетостерином (I) в присутствии его <sup>3</sup>H-меченого аналога (<sup>3</sup>H-I), а затем инкубируемых в отсутствие радиоактивного кетостерина (<sup>3</sup>H-I). Для этого в каждую ячейку вносили по 300 мкл 10 мкМ раствора 15-кетостерина (I), содержащего  $6 \times 10^5$  (имп/мин)/мл радиоактивного 15-кетостерина (<sup>3</sup>H-I) в культуральной среде с 10% ЛПДС. Инкубацию проводили при 37°C в течение 3 ч, а затем в каждой ячейке среду заменяли на новую, количество и состав которой описан выше, но без радиоактивного кетостерина (<sup>3</sup>H-I). Инкубацию проводили в свежей среде в течение 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 мин. После инкубации клетки промывали PBS при 4°C и экстрагировали смесью EtOH–EtOAc–CH<sub>3</sub>COOH (4 : 5 : 1) (3 × 1 мл).

Экстракты, полученные в обоих экспериментах, высушивали в токе азота, продукты разделяли ТСХ в системе А в присутствии синтетических стандартов (I) ( $R_f$  0.56), (II) ( $R_f$  0.23) и  $\beta$ -[2-(9Z-октадеценоилокси)этокси]-5 $\alpha$ -холест-8(14)-ен-15-она ( $R_f$  0.95). Зоны, соответствующие указанным синтетическим стандартам, соскабливали с пластинок и переносили во флаконы для счета радиоактивности. Клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Все эксперименты проводились в четырех повторях. Результаты опытов приведены на рис. 2.

**Уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2** оценивали по включению [<sup>1-14</sup>C]ацетата во фракцию холестерина [27]. Клетки Нер G2, выращенные в 24-ячеечной планшете (содержание клеточного белка 0.2 мг/ячейку), перед экспериментами инкубировали 24 ч в среде, содержащей 10% ЛПДС.

В контрольном эксперименте в каждую ячейку вносили по 300 мкл культуральной среды, содержащей 10% ЛПДС и [<sup>1-14</sup>C]ацетат (1 мкКи/мл среды), и проводили инкубацию при 37°C в течение 3 ч.

В первом эксперименте в каждую ячейку вносили по 300 мкл 30 мкМ раствора 15-кетостерина (I) в культуральной среде с 10% ЛПДС и проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч, после чего вносили [<sup>1-14</sup>C]ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 3 ч.

Во втором эксперименте в каждую ячейку вносили по 300 мкл 30 мкМ раствора 15-кетостерина (I) в культуральной среде с 10% ЛПДС и проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч, затем среду удаляли, в каждую ячейку вносили по 300 мкл культуральной среды с 10% ЛПДС без 15-кетостерина (I) и инкубировали при 37°C 3 ч, после чего вносили [<sup>1-14</sup>C]ацетат (1 мкКи/мл среды) и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 3 ч.

Клетки промывали PBS при 4°C, липиды экстрагировали смесью гексан–Pr<sup>4</sup>OH (3 : 2), клеточный остаток использовали для определения содержания белка. Экстракты концентрировали в токе азота, липиды анализировали ТСХ в системе гексан–EtOAc–CH<sub>3</sub>COOH (70 : 29 : 1). После окрашивания парами йода зону, соответствующую холестерину, соскабливали с пластинки и переносили во флакон для счета радиоактивности.

Уровень биосинтеза выражали как количество [<sup>14</sup>C]холестерина, образующееся за 3 ч инкубации с [<sup>1-14</sup>C]ацетатом, нормированное на 1 мг клеточного белка (имп./мин/1 мг белка). Контрольное значение (уровень биосинтеза холестерина в отсутствие кетостерина (I)) составляло 20400 (имп./мин/мг) и было принято за 100%. Все эксперименты проведены в четырех повторях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 00-04-48643 и 01-04-48504).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schroepfer G.J.* // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 361–554.
2. *Raulston D.L., Mishaw C.O., Parish E.J., Schroepfer G.J.* // *Fed. Proc.* 1976. V. 71. Abstract 98409.
3. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Kandutsch A.A.* // *US Patent* 4.202.891(1980).
4. *Schroepfer G.J., Monger D., Taylor F.S., Chamberlain J.S., Parish E.J., Kiscic A., Kandutsch A.A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 78. P. 1227–1233.
5. *Schroepfer G.J., Parish E.J., Kiscic A., Jackson E.M., Farley C.M., Mott G.E.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 3042–3046.
6. *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.
7. *St. Pyrek J., Vermilion J.L., Stephens T.W., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 4536–4543.
8. *Herz J.E., Swaminathan S., Pinkerton F.D., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 579–598.
9. *Swaminathan S., Pinkerton F.D., Numazawa S., Wilson W.K., Schroepfer G.J.* // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 1503–1515.
10. *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.
11. *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.
12. *Misharin A.Yu., Alquier C., Steinschneider A.Ya., Malugin A.V., Lafont H.* // *Med. Chem. Res.* 1995. V. 5. P. 409–416.
13. *Мишарин А.Ю., Штейншнейдер А.Я.* // *Биоорганическая химия.* 1996. Т. 22. С. 611–617.
14. *Мишарин А.Ю., Крылов А.С., Алки К., Лафонт Ю., Штейншнейдер А.Я., Косых В.А., Морозкин А.Д.* // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 297–303.

15. Misharin A.Yu., Shatalov N.A. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 867–872.
16. Misharin A.Yu., Kisseleva A.F., Alquier C., Shatalov N.A. // *Med. Chem. Res.* 1999. V. 9. P. 61–68.
17. Киселева А.Ф., Горюнова Л.Е., Медведева Н.В., Алки К., Мишарин А.Ю. // *Биохимия*. 1999. Т. 64. С. 456–463.
18. Bjorkhem I. // *J. Lipid Res.* 1992. V. 33. P. 455–471.
19. Chiang J.Y.L. // *Frontiers in Bioscience*. 1998. V. 3. P. 176–193.
20. Russell D.W. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1529. P. 126–135.
21. Herz J.E., Swaminathan S., Wilson W.K., Schroepfer G.J. // *Tetrahedron Lett.* 1991. V. 32. P. 3923–3926.
22. Kisseleva A.F., Goryunova L.E., Medvedeva N.V., Morozkin A.D., Alquier C., Misharin A.Yu. // *FEBS Lett.* 1999. V. 446. P. 163–168.
23. Edwards P.A., Ericsson J. // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. V. 68. P. 157–185.
24. Goldstein J.L., Brown M.S. // *Nature*. 1990. V. 343. P. 425–430.
25. Brown M.S., Goldstein J.L. // *Cell*. 1997. V. 89. P. 331–340.
26. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1971. Т. 4. С. 176.
27. Goldstein J.L., Basu S.K., Brown M.S. // *Methods Enzymol.* 1983. V. 98. P. 241–260.

## Transformation of 3 $\beta$ -(2-Hydroxyethoxy)-5 $\alpha$ -cholest-8(14)-en-15-one to a Polar Metabolite in Hepatoma Hep G2 Cells

E. A. Piy, D. V. Ignatov, N. V. Medvedeva, and A. Yu. Misharin<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 246-3375; e-mail: misharin@ibmh.msk.su

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119992 Russia*

Incubation of 3 $\beta$ -(2-hydroxy-2[<sup>3</sup>H]-ethoxy)-5 $\alpha$ -cholest-8(14)-en-15-one with Hep G2 cells led to the accumulation of a radioactive polar product in the culture medium, which was identified as 3 $\beta$ -(2-hydroxyethoxy)-15-keto-5 $\alpha$ -cholest-8(14)-ene-24-oic acid. Its structure was confirmed by a chemical counter synthesis. The labeled ketosterol was rapidly ( $\tau_{1/2} = 6$  min) and reversibly bound by Hep G2 cells. The intracellular concentration of 15-ketosterol decreased during incubation mainly due to the formation of a polar metabolite, secreted to the medium. The level of cholesterol biosynthesis was  $22 \pm 5\%$  of the control value in Hep G2 cells at a 15-ketocholesterol concentration in the medium of 30  $\mu$ M. However, further incubation for 3 h in the medium without the ketosterol led to restoration of the level of biosynthesis to  $85 \pm 11\%$  of the control value. These results suggest that inhibition of the cholesterol biosynthesis by 15-ketocholesterol in Hep G2 cells depends on the intracellular concentration of the inhibitor, which, in turn, is determined by the rate of its conversion into the polar metabolite. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* hepatoma cells Hep G2, inhibition of cholesterol biosynthesis, metabolism, oxysterols