

Методы получения меченных тритием жирных кислот и их производных, оксипиринов и стероидов

В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов

*Институт молекулярной генетики Российской академии наук
123182 Москва, пл. Курчатова, 46, факс (095) 196–0221*

Рассмотрены достижения в области получения и использования меченных тритием оксипиринов, стероидов, жирных кислот, фосфо-, сфинго- и других представителей липидов. Актуальность исследований в данной области демонстрируется на примерах использования меченых препаратов для решения ряда современных задач биохимии, биологии и фармакологии.

Библиография — 148 ссылок.

Оглавление

I. Введение	944
II. Получение меченных тритием жирных кислот и их производных	945
III. Оксипирины	954
IV. Стероиды	961
V. Заключение	964

I. Введение

Методы синтеза меченных тритием классических представителей липидов и оксипиринов (жирных кислот, стероидов, простагландинов, сфинго-, фосфолипидов и т.д.), а также их биологически активных аналогов, близких по своим физико-химическим свойствам к липидам, получили широкое распространение. Выбор липидов для исследования обусловлен тем, что кроме считавшейся многие десятилетия единственной функции липидов — запасать метаболическое топливо,¹ — в последние годы им приписываются еще две важные функции. Они являются, во-первых, основными структурными компонентами клеточных мембран, а, во-вторых, биоэффекторами, регулирующими внутриклеточные биохимические реакции, межклеточные взаимодействия и другие физиологические процессы, происходящие в организме. Очевидно, что взаимодействие биоэффекторов с их мишенями, а следовательно, и специфичность действия эффекторов определяются их строением.¹

Достоинства трития как радиоактивной метки (например, низкая радиотоксичность, период полураспада — 12.26 года, высокая молярная радиоактивность —

1.08 ПБк·г-атом⁻¹ и т.д.) общеизвестны.^{2–5} Среди методов получения меченных тритием соединений выделяют различные варианты изотопного обмена, химические и ферментативные. Механизмы включения метки с помощью изотопного обмена[†] рассмотрены в работах^{5–15}.

При включении метки жидкофазным методом протекают реакции изотопного обмена; миграции, изомеризации и гидрирования двойных связей; селективного гидрирования одной из нескольких двойных или тройных связей; дегалогенирования и восстановления соответствующих функциональных групп. Только тщательный подбор условий проведения реакций может привести к образованию искомого меченого продукта с приемлемым выходом. При этом важное значение имеет выбор катализатора, растворителя, определение оптимальных значений таких характеристик, как давление газообразного трития, продолжительность реакции, соотношение катализатор:субстрат:модифицирующие добавки.

Возможности использования классических методик ограничены, так как при синтезе меченных тритием препаратов обычно применяются миллиграммовые и субмиллиграммовые количества предшественников. Вследствие этого, например, соотношение катализатор:предшественник из чисто технологических требований должно быть намного больше, чем это предписывается при проведении селективного гидрирования по классической методике. Пропорциональное же увеличение количества добавок (хинолина, пиридина и т.д.), модифицирующих катализатор, приводит к значительному

В.П.Шевченко. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории изотопномеченных физиологически активных веществ ИМГ РАН. Телефон: (095)196–0212

И.Ю.Нагаев. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории.

Н.Ф.Мясоедов. Член-корреспондент РАН, заведующий отделом химии физиологически активных веществ ИМГ РАН.

Телефон: (095)196–0001, e-mail: img@glas.apc.org

Область научных интересов авторов: синтез изотопномеченных соединений липидной природы, исследование каталитических реакций введения тритиевой метки, химия физиологически активных веществ, использование ферментов в биотехнологии.

Дата поступления 13 мая 1999 г.

[†] Современные методы изотопного обмена условно можно разделить на три основные группы: гетерогенный каталитический изотопный обмен газообразного трития с органическим веществом, растворенным в том или ином растворителе (жидкофазные методы); гетерогенный каталитический изотопный обмен газообразного трития с твердым органическим соединением при повышенной температуре (твердофазные методы); гетерогенный каталитический изотопный обмен растворенного в апротонном растворителе органического вещества с тритиевой водой.

падению выхода искомого меченого продукта и заметному возрастанию общей радиоактивности реакционной массы за счет включения метки в побочные продукты и в модифицирующие добавки, что осложняет выделение и очистку полученного препарата.

Если необходимые для биологических исследований вещества достаточно устойчивы при повышенных температурах, то наиболее перспективен твердофазный метод, когда вещество, нанесенное на катализатор, нагревают в атмосфере газообразного трития.^{9, 12, 13}

Для введения метки в лабильные в условиях гидрирования соединения применяют метод изотопного обмена с тритиевой водой в инертных растворителях, последние помогают избежать саморадиолиза высокообогащенной тритиевой воды.² Tritиевую воду, как правило, получают восстановлением PdO газообразным тритием. Для иницирования изотопного обмена в качестве катализатора используют палладиевую чернь и палладиевые катализаторы на инертных носителях. Очевидно, чем активнее катализатор, тем выше степень изотопного обмена с тритиевой водой, но и вероятность деградации лабильного вещества также возрастает.

Обычно химическому синтезу меченных тритием липидов предшествует синтез соответствующих предшественников,^{4, 5, 16–22} содержащих тройные, дополнительные двойные связи, галогензамещенные фрагменты и т.д. Обработка этих соединений газообразным тритием в присутствии катализатора приводит к образованию меченого препарата. Иногда меченные тритием липиды получают многостадийным синтезом, используя в качестве исходного соединения меченый препарат. В этом случае необходимы подходы, позволяющие не только получать целевой продукт с высоким выходом, но и сделать сам процесс технологически безопасным.

II. Получение меченных тритием жирных кислот и их производных

1. Жирные кислоты

Жирные кислоты различаются строением углеродного скелета, числом двойных связей, наличием и числом других функциональных групп. Они присутствуют в природных объектах в основном в этерифицированной форме. Например, жирные кислоты входят в состав фосфолипидов, сфинголипидов, гликолипидов, ганглиозидов, глицеридов, эфиров стероидов и витаминов. Долгое время считали, что жирные кислоты обеспечивают лишь целостность мембран и оптимальный уровень ненасыщенности в тканевых липидах,²³ но в настоящее время доказано, что они также регулируют деятельность ферментов, модулируют связывание стероидных гормонов с рецепторами, оказывают влияние на транскрипцию генов.^{24–26} Действительно, изменение жирнокислотного состава липидов мембран влечет за собой изменение активности мембраносвязанных ферментов, экспрессию рецепторов.²⁷

Жирные кислоты, меченные изотопами, можно синтезировать, используя методы изотопного обмена, селективное гидрирование газообразным тритием соответствующих ацетиленовых предшественников, химические и микробиологические методы.⁵

Жидкофазный метод изотопного обмена — наиболее простой для получения ненасыщенных жирных кислот, так как метку можно вводить непосредственно в требуемый препарат. Кроме того, этот метод лишен многих недостатков микробиологических методов, а именно — не возникает дополнительных трудностей при выделении меченых препаратов из гомогенатов, не наблюдается изотопного разбавления искомого меченого продукта эндогенными продуктами из культуры микроорганизмов, а также нет потерь метки в

процессе биологических превращений.^{4, 5} Например, при получении меченой (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-эйкозапентаеновой (тимнодоновой) кислоты из [8-³H]стеариновой кислоты⁵ с использованием культуры *Saprolegnia parasitica* (АТС 22284) молярная радиоактивность конечного препарата уменьшилась в 250–400 раз по сравнению с молярной радиоактивностью исходной жирной кислоты.

Лабильность алкенов в условиях проведения жидкофазного изотопного обмена — главное свойство, препятствующее применению этого метода для введения метки в ненасыщенные жирные кислоты. Известно,^{3–5} что даже при использовании катализаторов Линдлара интенсивно идут процессы гидрирования, *цис*–*транс*-изомеризации и миграции двойных связей, причем процессы изомеризации практически равновероятны, а миграция двойной связи на 85–88% происходит по направлению к карбоксильной группе. Но несмотря на эти ограничения, оказалось возможным, варьируя условия проведения реакций, ввести метку не только в моноеновые, но и в полиеновые кислоты (табл. 1). Некоторые сведения о распределении метки в молекулах подобных соединений приведены ниже.

Несмотря на относительную простоту метода жидкофазного изотопного обмена, его использование ограничено, так как молярная радиоактивность получаемых препаратов редко превышает 0.1 ПБк·моль^{–1}. Молярная радиоактивность полиеновых жирных кислот значительно повышается, если использовать химические методы. При этом ацетиленовый предшественник можно получить либо из соответствующей жирной кислоты, либо полным химическим синтезом. Первым методом были получены 5-ацетиленовые аналоги метиларахидоната и метилтимнодоната, 14-ацетиленовый аналог метиларахидоната и 4-ацетиленовый аналог метилового эфира (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-докозагексаеновой кислоты (метилдокозагексаената). Синтез этих соединений на примере получения 5-ацетиленовых аналогов эйкозаполие-

Таблица 1. Значения молярных радиоактивностей (α) меченых ненасыщенных жирных кислот.^a

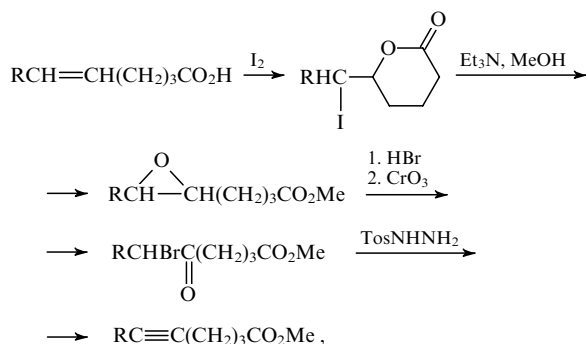
Исходное соединение	α , ПБк·моль ^{–1}	Ссылки
<i>Жидкофазный изотопный обмен</i>		
Метилолеат	0.146	28
Метиллинолеат	0.025	28
Метилдигомо- γ -линоленат	0.034	28
Метиларахидонат	0.092	28
<i>Селективное гидрирование газообразным тритием</i>		
8,11,14-Триеновый аналог метилдигомо- γ -линолената	5.6	29
5,8,11,14-Тетраеновый аналог метиларахидоната	7.4	29
5,8,11,14,17-Пентаеновый аналог метилтимнодоната	9.2	29
5-Ацетиленовый аналог метиларахидоната	1.3	16
14-Ацетиленовый аналог метиларахидоната	1.2	16
5-Ацетиленовый аналог метилтимнодоната	1.9	16
4-Ацетиленовый аналог метилдокозагексаената	1.8	17

Примечание. В случае жидкофазного изотопного обмена метка включается за счет изотопного обмена атомов водорода соединения на атомы трития; в случае гидрирования газообразным тритием метка включается при восстановлении тройных связей до двойных.

^a Свободные жирные кислоты получали щелочным гидролизом их метиловых эфиров.

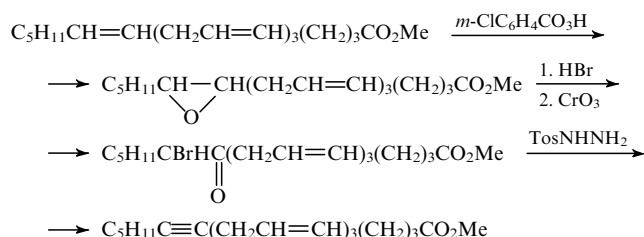
новых кислот и 14-ацетиленового аналога метиларахидоната иллюстрируют схемы 1 и 2.^{16, 17, 30}

Схема 1



$\text{R} = \text{C}_5\text{H}_{11}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_n\text{CH}_2$ ($n = 2, 3$).

Схема 2

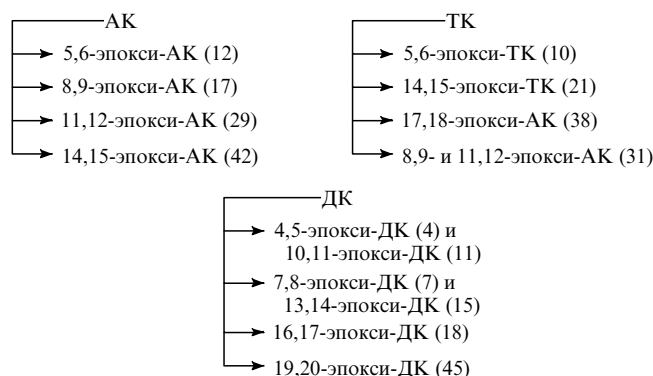


Основное различие схем 1 и 2 заключается в синтезе эпоксикислоты, которая в последнем случае образуется при обработке исходного материала *m*-хлорнадбензойной кислотой в хлористом метиле в присутствии KHCO_3 .¹⁶ Известно, что использование для эпексидирования неполярных растворителей из-за высокой реакционной активности надкислоты в этих условиях приводит к образованию значительных количеств диэпоксидов, поэтому для повышения выхода моноэпоксидов в работе³⁰ применяли этанол. По этой методике были получены моноэпоксиды из арахидоновой (АК), тимнодоновой (ТК), докозагексаеновой (ДК) кислот (схема 3).[‡]

Полностью химическими методами были синтезированы ацетиленовые аналоги эйкозаполиеновых кислот: 8,11,14-трииновый аналог метилдигомо- γ -линолената, 5,8,11,14-тетраиновый аналог метиларахидоната, 5,8,11,14,17-пентаиновый аналог метилтимнодоната (схема 4).

[‡] На схеме 3 в скобках указано процентное содержание данного моноэпоксидов от общего содержания моноэпоксидов в реакционной смеси.

Схема 3



Полностью химическими методами были синтезированы ацетиленовые аналоги эйкозаполиеновых кислот 8,11,14-трииновый аналог метилдигомо- γ -линолената, 5,8,11,14-тетраиновый аналог метиларахидоната, 5,8,11,14,17-пентаиновый аналог метилтимнодоната (схема 4).

Восстановлением тройных связей до двойных в атмосфере газообразного трития получены высокомеченные полиеновые жирные кислоты (см. табл. 1). С целью повышения селективности гидрирования соответствующих ацетиленовых аналогов палладиевые катализаторы модифицировали с помощью диацетата свинца, пиридина и хинолина. Однако даже в этом случае при гидрировании одной тройной связи по описанным в литературе методикам (см., например,⁵) выход меченных тритием алкенов не превышал 10–40%. Приемлемые выходы были получены при использовании в качестве катализатора палладия на сульфате бария, последовательно обработанного метанольными растворами диацетата свинца (отношение $\text{Pd}:\text{Pb} = 1:(0.5-1.0) \text{ мг} \cdot \text{мг}^{-1}$) и боргидрида натрия (отношение $\text{Pd}:\text{NaBH}_4 = 50:(0.4-4.0) \text{ мг} \cdot \text{мг}^{-1}$). В качестве растворителя использовали смесь гептана с диоксаном (4:1). Отношение катализатор:субстрат составило (2–6):1.²⁹ В подобных условиях уже через 25–35 мин выход искомого продукта с молярной радиоактивностью 1.2–1.8 ПБк·моль^{–1} на одну селективно восстановленную тройную связь составил 89–99% (см. табл. 1).

Необходимо подчеркнуть, что отработаны условия введения метки не только в ненасыщенные жирные кислоты, но и в разнообразные феромоны, аттрактанты, гормоны липидной природы, полный химический синтез которых на последних стадиях включает селективное гидрирование ацетиленовых предшественников.³¹ В качестве примера в табл. 2 приведены ацетиленовые предшественники, используемые в синтезе феромонов *Lepidoptera*.

Схема 4

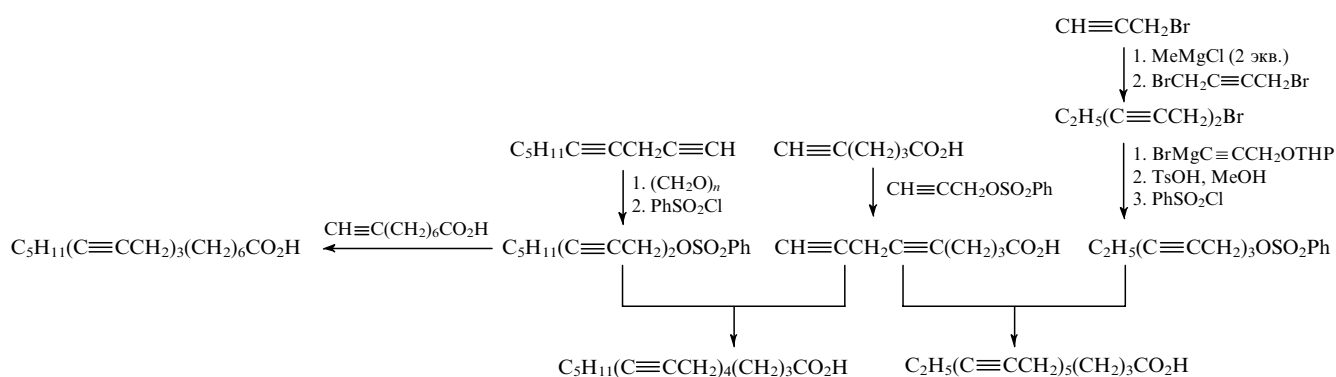


Таблица 2. Ацетиленовые предшественники, используемые в синтезе феромонов *Lepidoptera*.³¹

Ацетиленовый предшественник	Компонент феромона	Вид чешуекрылых
$\text{Me}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{OH}$	(8Z)-Додеценилацетат	<i>Grapholitha molesta</i> , <i>Cydia molesta</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_9\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CHMe}_2$	(7Z,8Z)-Эпокси-2-метилоктадекан	<i>Porthetria dispar</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_9\text{Me}$	(6Z)-Генейкозен-11-он	<i>Orgyia pseudotsugata</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_5\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{Me}$	(7Z)-Эйкозен-11-он	<i>Carposina niponensis</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHC}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OH}$	(5Z,7E)-Додекадиен-1-ол	<i>Dendrolimus spectabilis</i>
$\text{MeCH}_2\text{C}\equiv\text{CCN}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$	(7E,9Z)-Додекаденилацетат	<i>Lobesia botrana</i>
$\text{MeCH}=\text{CHCH}_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{OH}$	(9Z,12E)-Тетрадекаденилацетат	<i>Plodia interpunctella</i> , <i>Cadra cautella</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{CCCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$	(4E,7Z)-Тридекаденилацетат	<i>Phthorimaea operculella</i>
$\text{Me}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	(7Z,11E)-Гексадекаденилацетат	<i>Sitotroga cerealella</i>

Так, исходя из гексадец-(10E)-ен-12-ин-1-ола синтезирован бомбикол с молярной радиоактивностью $1.85 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.²⁹); из (2Z)-5-(4-трет-бутил-транс-1-гидроксидецил-1-ил)-3-метилпент-2-ен-4-иновой кислоты — аналог абсцисовой кислоты с молярной радиоактивностью $1.21 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.²⁹); из 11,12-дегидроретиновой кислоты — ретиновая кислота с молярной радиоактивностью $1.75 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (см.²⁰). Селективным гидрированием ацетиленовых связей получены (Z)-[11,12-³H]гексадека-1,11-диен-3-он, (Z)-[6,7-³H]эйкоз-6-ен-11-он и ряд других меченых феромонов³² с молярной радиоактивностью $\sim 1.5 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Использование метода жидкофазного изотопного обмена для введения метки в насыщенные жирные кислоты неперспективно, так как молярные радиоактивности полученных соединений измерялись несколькими сотыми $\text{ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$ (табл. 3). Однако изотопный обмен в насыщенных соединениях (в отличие от алкенов) не сопровождается побочными процессами, поэтому проведенные с использованием этого метода исследования позволили установить ряд закономерностей. Оказалось, что кинетические кривые реак-

ции изотопного обмена довольно быстро выходят на плато. Достижимая при этом степень замещения водорода на тритий значительно меньше, чем можно ожидать, исходя из равновесного распределения трития. Кроме того, форма кинетических кривых молярной радиоактивности имеет сложный характер, что в работе²⁸ объясняется разным насыщением палладия изотопами водорода (при образовании α -фазы гидрида палладия и последующем переходе ее в β -фазу).

Термическая стабильность алканов позволила использовать метод твердофазного изотопного обмена для введения метки в насыщенные соединения (см. табл. 3).

Исследования реакции твердофазного изотопного обмена (в качестве модельного соединения использовалась стеариновая кислота) в присутствии палладиевых и платиновых катализаторов на различных носителях показали, что наиболее эффективно изотопный обмен осуществляется на 5% Pt/C при температуре 210°C и отношении катализатор: субстрат, равном 10:1 (рис. 1–4).[§]

Аналогичные исследования проведены и для гомологов стеариновой кислоты. Показано, что и в этом случае оптимальными для твердофазного изотопного обмена являются катализатор 5% Pt/C, отношение катализатор: субстрат, равное 10:1, и время реакции 15 мин. Отмечен ряд дополнительных закономерностей. Во-первых, наблюдалась практически линейная зависимость изменения молярной радиоактивности гомологов жирных кислот от длины углеродной цепи, что свидетельствует о вероятностном характере процесса включения метки при использовании этой методики. Во-вторых, температура, при которой наблюдалась максимальная степень изотопного замещения (T_{max}), была для каждого гомолога разной.

Кислота	Лауриновая	Миристиновая	Пальмитиновая	Стеариновая
$T_{\text{пл}}, ^\circ\text{C}$	44.3	58	64	70
$T_{\text{max}}, ^\circ\text{C}$	190	200	205–210	210

По-видимому, для представителей одного гомологического ряда (например, жирных кислот) эта температура зависит от температуры фазового перехода.

Очевидно, что при определенной температуре диффузия молекул этих липидов настолько возрастает, что скорость диффузии спилловер-водорода перестает влиять на скорость изотопного обмена в целом. Эффективность изотопного обмена при таких температурах резко падает уже через 10–15 мин. Последнее обстоятельство, возможно, связано со следующим явлением. Изучение валентного состояния водорода в гидридах интерметаллических соединений,³⁷ позволило по-новому рассмотреть проблему валентного состояния водорода в системах типа $\text{Pd}-\text{H}_2$. Дискуссия по

Таблица 3. Значения молярных радиоактивностей насыщенных жирных кислот.

Исходное соединение	α , $\text{ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$	Ссылки
<i>Жидкофазный изотопный обмен</i>		
Метилстеарат	0.036	28
Метилпальмитат	0.021	28
Метилмиристинат	0.014	28
Метиллауринат	0.010	28
<i>Твердофазный изотопный обмен</i>		
Стеариновая кислота	13.50	33
Пальмитиновая кислота	12.90	33
Миристиновая кислота	12.10	33
Лауриновая кислота	11.50	33
3-Гидроксипальмитиновая кислота	9.00	34
6-Кетопальмитиновая кислота	27.80	29
Метилстеарат	38.00	29
11-Хлорундекановая кислота	6.30	34
Цетиловый спирт	5.50	33
Гексадекан	17.50	33
<i>Твердофазное дегазогенное</i>		
11-Хлорундекановая кислота	4.20	34
<i>Гидрирование газообразным тритием</i>		
Пальмитолеиновая кислота	1.47	35
Ундец-10-еновая кислота	2.96	14
5-(3-Октинилюкси)пентановая кислота	3.89	36
12-Метоксидодец-10-иновая кислота	5.07	36

§ При определении относительной степени включения метки ($\alpha_{\text{отн}}$) за 100% принята максимальная молярная радиоактивность препарата в данной серии экспериментов.

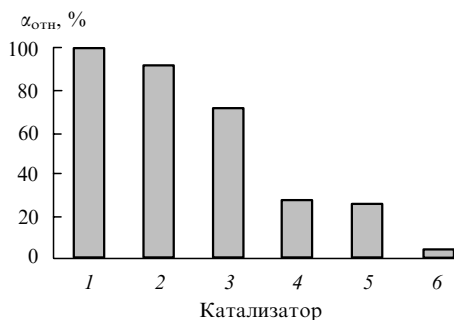


Рис. 1. Относительная степень включения метки в стеариновую кислоту в зависимости от природы катализатора.

Катализатор: 1 — 5% Pt/C, 2 — 10% Pd/C, 3 — 10% Pd/BaSO₄, 4 — 5% Pd/C, 5 — 5% Pd/BaSO₄, 6 — 5% Rh/C

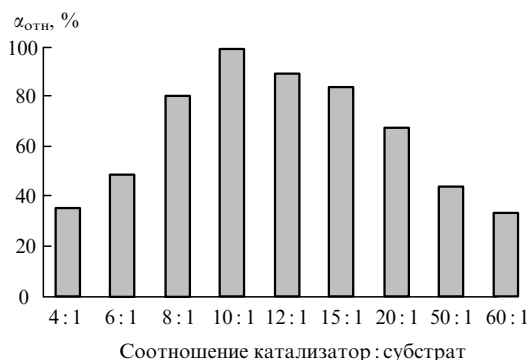


Рис. 2. Относительная степень включения метки в стеариновую кислоту в зависимости от соотношения катализатор : субстрат (5% Pt/C).

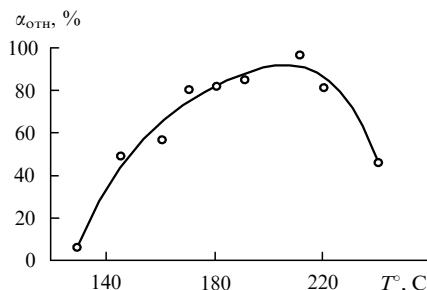


Рис. 3. Относительная степень включения метки в стеариновую кислоту в зависимости от температуры (катализатор — 5% Pt/C; отношение катализатор : субстрат — 10 : 1).

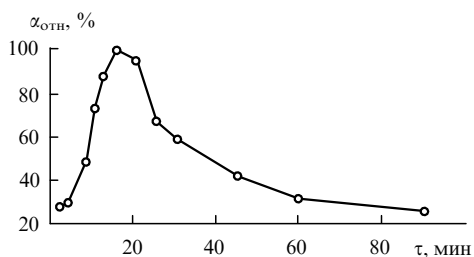
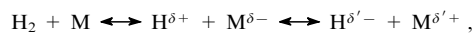


Рис. 4. Кинетика включения метки в стеариновую кислоту (катализатор — 5% Pt/C; отношение катализатор : субстрат — 10 : 1, температура — 210°C).

этому важному для химии гидридов вопросу началась с классических работ Уббелоде,³⁸ выдвинувшего концепцию положительно заряженного атома водорода на палладии, и Гибба,³⁹ предложившего модель с отрицательно заряженным гидрид-ионом водорода. Авторами статьи³⁷ был пред-

ложен и обоснован тезис, позволяющий рассматривать гидридное диспергирование как результат окислительно-восстановительного процесса, связанного с образованием гидрид-ионов $H^{\delta-}$ при концентрациях водорода (c_H) в твердом гидриде, больших величины критической концентрации ($c_{H_{кр}}$), которая определяется окислительно-восстановительным потенциалом реакции



где M — металлическая матрица катализатора. Согласно этой модели, водород, хемосорбированный на активных центрах поверхности катализатора, отдает часть своих s -электронов в зону проводимости металла. В связи с этим при малых значениях c_H поведение абсорбированного водорода удовлетворительно описывается моделью Уббелоде,³⁸ предполагающей высокую диффузионную подвижность атомов $H^{\delta+}$ и рост или, по крайней мере, отсутствие снижения электропроводности гидридной фазы по сравнению с исходным металлом. Значение $c_{H_{кр}}$ соответствует такой концентрации окислителя, т.е. частиц $H^{\delta+}$, при которой последние окисляют металлическую матрицу и становятся акцепторами электронной плотности, превращаясь в объемные и малоподвижные ионы $H^{\delta-}$. Вследствие этого зона проводимости металла обедняется электронами. Очевидно, что при более высоких степенях заполнения пустот ионами $H^{\delta-}$ (с относительно большим эффективным объемом) электронный дефицит на атомах металла, образующих металлическую подрешетку в кристаллической структуре катализатора, должен возрастать, что, по-видимому, ограничит ее возможность к обратимой абсорбции водорода. В связи с этим резко падает концентрация частиц (в случае получения меченых препаратов — это тритий), которые могут вступать в обменные реакции. Это приводит к практически полному прекращению изотопного обмена.

Подходы, разработанные для получения жирных кислот с высокой молярной радиоактивностью, успешно использовались для синтеза других высокоочищенных насыщенных липидов: производных жирных кислот, жирных спиртов и алканов (например, метилстеарата, 3-гидроксипальмитиновой, 6-кетопальмитиновой, хлорундекановой кислот, цетилового спирта и гексадекана) (табл. 4–6).³⁴ При этом оказалось, что изотопный обмен в галогенсодержащих насыщенных кислотах происходит намного легче, чем процесс дегалогенирования. Полученные молярные радиоактивности достигали десятков ПБк · моль⁻¹, что позволяет проводить любые биологические эксперименты, в том числе исследования по лигандно-рецепторному связыванию. Единственным недостатком данного метода является неопределенное распределение метки в молекулах препарата при изотопном обмене.

Таблица 4. Значения относительной степени изотопного обмена в 11-хлорундекановой кислоте при различных температурах реакции на разных катализаторах (отношение катализатор : субстрат — 5 : 1, время реакции — 20 мин).³⁴

T, °C	5% Pt/C	10% Pd/C	5% Pd/C	10% Pd/BaSO ₄	5% Rh/C
50	1	—	—	—	—
70	9	—	—	—	10
90	16	—	2	—	—
120	40	43	8	48	38
140	55	64	12	50	32
160	51	59	25	75	29
170	—	—	—	100	—
180	22	50	20	90	21
190	—	43	—	48	—
200	10	19	9	41	19
210	—	18	—	35	6
220	9	14	9	16	1

Таблица 5. Значения относительной степени изотопного обмена в цетиловом спирте при различных температурах реакции на разных катализаторах (отношение катализатор:субстрат — 6:1, время реакции — 15 мин).³⁴

T, °C	5% Pt/C	10% Pd/C	5% Pd/C	5% Rh/C
90	—	1	—	—
110	2	6	1	1
120	6	25	4	4
130	16	46	4	4
140	20	49	5	5
150	21	—	9	9
160	—	100	—	—
170	24	—	15	15
180	33	65	19	19
190	40	61	20	20
200	25	36	9	8
210	6	—	1	6
220	—	24	—	—

Таблица 6. Значения относительной степени изотопного обмена в гексадекане и насыщенных кислотах при разных температурах реакции (отношение 5% Pt/C:субстрат — (6–10):1, время реакции — 15 мин).³⁴

Соединение	Температура, °C							
	90	140	160	180	190	200	210	230
Метилстеарат	2	12	44	—	—	—	100	30
6-Кетопальмитиновая кислота	17	72	100	—	—	—	84	33
3-Гидроксипальмитиновая кислота	1	81	100	89	—	—	—	—
Пальмитиновая кислота	2	44	60	76	—	80	100	30
Миристиновая кислота	—	41	—	77	85	100	62	61
Лауриновая кислота	—	52	—	86	100	96	78	69
Гексадекан	2	100	61	—	—	—	44	43

Для синтеза насыщенных жирных кислот с определенным положением метки (предшественник — недефицитная ненасыщенная кислота) рационально использовать метод гидрирования двойных связей (см. табл. 3).^{4, 29, 35} Обнаружено, что полученная таким методом [10,11-³H]ундекановая кислота — один из компонентов феромона термитов — может поступать в феромонные железы как из пищи, так и за счет биосинтеза.

Из других методов получения меченых жирных кислот можно отметить метод термической активации трития. Например, в работе⁴ описано введение метки этим методом в метил-12-гидроксистеарат (0.56 ТБк·моль⁻¹). Суть метода заключается в нанесении вещества в виде пленки на внутреннюю поверхность цилиндрического сосуда, по оси которого размещена вольфрамовая нить. Систему вакуумируют, заполняют тритием до давления 0.67 Па, охлаждают жидким азотом и нагревают вольфрамовую нить до 2000 К в течение 30 с. Происходит диссоциация молекул трития, что значительно увеличивает степень изотопного обмена.

[8L-³H]- и [8D-³H]стеариновые кислоты⁵ получали превращением метил-8D(8L)-гидроксистеарата в соответствующий тозилат, который далее восстанавливали алюмотригидом лития (6.6 ТБк·моль⁻¹). Образовавшиеся стеариновые спирты окисляли CrO₃ до искомого продукта (3.3 ТБк·моль⁻¹).

Меченые жирные кислоты, помимо биологических исследований и синтеза на их основе различных производных и меченых оксипиринов, могут быть также использованы для

исследования биосинтеза эфиров холестерина⁴⁰ или для получения набора моноэпоксидов (см. схемы 1–3) — продуктов эпексигеназного пути каскада арахидоновой кислоты и других полиненасыщенных жирных кислот. Биологическая активность этих эпоксидов широко известна. Они стимулируют высвобождение соматостатина *in vitro* из срединного бугорка гипоталамуса и высвобождение инсулина и глюкагона из панкреатических островков; ингибируют стимулированное вазопрессинном водоотделение в опухолях мочевого пузыря, агрегацию тромбоцитов и нейтрофилов; увеличивают выброс кальция из микросом гладкой мышцы аорты собаки и содержание свободного кальция в цитозоле. Под действием различных ферментов такие эпоксиды превращаются в ряд других более окисленных продуктов, например, вицинальные диолы, 20- и 19-гидроксипроизводные.

2. Производные жирных кислот

а. Эфиры жирных кислот

Глицериды. Высокую биологическую активность глицеридов иллюстрируют свойства 2-арахиноилглицерина — промежуточного соединения в метаболизме три- и диглицеридов, а также альтернативного предшественника арахидоновой кислоты, обладающего определенной каннабимиметической активностью.⁴¹ Использование меченного тритием аналога этого глицерида помогло получить дополнительные сведения о его фармакологической активности.

Меченые глицериды обычно получают конденсацией соответствующей меченой жирной кислоты с глицерином.⁴ В работе⁴² рассмотрены различные методы получения триглицеридов (ТГ). Эти липиды образуются при нагревании смеси глицерина и жирных кислот до 160–190°C, при этом отмечается, что реакцию лучше проводить в присутствии толуолсульфокислоты, отгоняя образующуюся воду с ксилолом. Более высокий выход ТГ достигается при кипячении в ксилоле серебряных солей жирных кислот с 1,2,3-трибромпропаном и при использовании хлорангидридов или смешанных ангидридов жирных кислот в реакциях с глицерином. Синтез ТГ в очень мягких условиях можно провести в присутствии дициклогексилкарбодиимиды и 4-диметиламинопиридина. Эта методика позволяет получать и соответствующие стероидные эфиры. Используя последнюю методику (реакцию проводили в 1,2-дихлорэтано, бензольный раствор дициклогексилкарбодиимиды прибавляли в несколько приемов), удалось синтезировать меченые ТГ с выходом выше 90%. Синтез ди- и моноглицеридов удобно осуществлять из триглицеридов, используя соответствующие липазы.⁴³ Например, при интенсивном перемешивании в течение 60 мин триарахиноилглицерина, диспергированного в 0.05 М AcONa–AcOH-буфере (pH 5.6), содержащем 0.1 ммоль·л⁻¹ NaCl и 10 ммоль·л⁻¹ CaCl₂, с *Rhizopus deleamar* (производства «Seikagaku Kogyo», Япония) был получен 2-арахиноилглицерин.⁴⁴

Среди других методов синтеза глицеридов можно отметить восстановление 1,3-производных дигидроксиацетона боротритидом натрия и изотопный обмен с тритиевой водой. Молярные радиоактивности триглицеридов, полученных последним методом, были на порядок ниже, чем молярные радиоактивности используемой тритиевой воды.⁴

В работе⁴¹ с помощью 2-[³H]арахиноилглицерина удалось установить, что в клетках N18TG2 нейробластомы присутствуют неспецифические эстеразы. Гидролиз этого моноглицерида лишь частично (менее чем на 40%) ингибировался избытком немеченого субстрата, тогда как степень селективности эстеразы из линии периферических клеток базофильной лейкемии крыс (RBL-2H3) оказалась заметно выше (74%). Показано также, что 2-линолеилглицерин (в отличие от 2-пальмитилглицерина) ингибировал расщепление 2-арахиноилглицерина интактными клетками, вслед-

ствии этого значительно увеличивалось количество 2-арахидоноилглицерина, способного активировать каннабиноидный рецептор. Анализ данных работ^{41,45–49} позволяет сделать вывод, что неканнабимиметические моноглицериды могут усиливать действие 2-арахидоноилглицерина, увеличивая время его полупревращения. Они в 4–8 раз повышают связывание 2-арахидоноилглицерина с каннабиноидным рецептором.

Фосфолипиды. Ранее фосфолипиды рассматривались только как структурные компоненты биологических мембран, обеспечивающие барьерную функцию по отношению к электролитам и служащие матриksom для мембрано-связанных ферментов и рецепторов. В настоящее время доказано, что фосфолипиды и продукты их ферментативных и свободно-радикальных превращений выполняют также важнейшие регуляторные функции в клетке. Например, они необходимы для проявления каталитической активности многих ферментов. Фосфолипиды обладают гормоноподобной активностью и являются факторами активации тромбоцитов (ФАТ) (1-алкил-2-ацетил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин), заживления ран (лизофосфатидная кислота) и т.д. Реакции гидролиза фосфоинозитидов и метилирования фосфатидилэтанолamina являются одними из ключевых в процессе передачи клеточных сигналов.^{50–52}

Введение тритиевой метки в фосфолипиды осуществляют, как правило, гидрированием природных или синтезированных ненасыщенных предшественников (табл. 7). В качестве примера на схеме 5 представлен синтез меченных тритием фосфатидилинозита и дифосфоинозитида. Перспективными являются методы изотопного обмена (табл. 7, 8), конденсация меченых жирных кислот с соответствующими предшественниками, биологические, ферментативные методы и их комбинации.^{4,55}

Для получения меченых фосфатидилинозита и дифосфоинозитида были синтезированы ненасыщенные предшественники.⁵⁶ Причем схемы синтеза фосфатидилинозита и дифосфоинозитида, включая стадию дезацетилирования гидразингидратом, были одинаковы. Если ставилась задача получить фосфатидилинозит, защитные группы снимали анионным дебензилированием и обработкой катионитом в H^+ -форме. Для получения дифосфоинозитида сначала фосфорилировали инозит по положению 4 избытком хлор-

Таблица 7. Значения молярных радиоактивностей фосфолипидов.

Соединение	α , ПБк·моль ⁻¹	Ссылки
<i>Гидрирование газообразным тритием</i>		
1- <i>O</i> -[³ H]Алкил-2- <i>O</i> -метил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	2.30	53
Лизо[³ H]фосфатидилхолин	0.14	28
[³ H]Фосфатидилинозит	0.50	28
1- <i>O</i> -[³ H]Пальмитоил-2-ацетил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	1.85	54
1- <i>O</i> -[³ H]Стеароил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	0.48	11
[³ H]Фосфатидилхолин	0.54	28
1-(1'-Пальмитоил-2'-[9,10- ³ H]стеароил- <i>sn</i> -глицеро-3'-фосфорил)- <i>мио</i> -инозит-4-фосфат	0.39	29
<i>Жидкофазный изотопный обмен</i>		
1,2-[³ H]Дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	0.02	29
<i>Комбинация химических и ферментативных методов</i>		
1,2-Диолеил- <i>sn</i> -[2- ³ H]глицеро-3-фосфосерин	0.93	55

Таблица 8. Кинетика жидкофазного изотопного обмена между газообразным тритием и дипальмитоилфосфатидилхолином.²⁸

Растворитель	Время, мин						
	15	30	45	60	90	150	180
<i>Катализатор — 5% Pd/BaSO₄</i>							
Хлороформ	19	41	47	54	65	80	88
Хлороформ – метанол (2:1)	33	50	56	73	78	97	100
Метанол	11	28	30	34	35	67	70
<i>Катализатор Лундлара</i>							
Хлороформ	1	2	2	2	2	3	4
Метанол	1	2	2	2	3	4	4
<i>Катализатор — (Ph₃P)₃RhCl</i>							
Хлороформ	3	4	6	6	7	11	11

оксида фосфора в пиридине, а потом снимали защитные группы. Гидрированием ненасыщенного жирнокислотного фрагмента полученных производных *мио*-инозита в присутствии катализатора в атмосфере газообразного трития удалось синтезировать высокомеченные фосфолипиды.²⁹

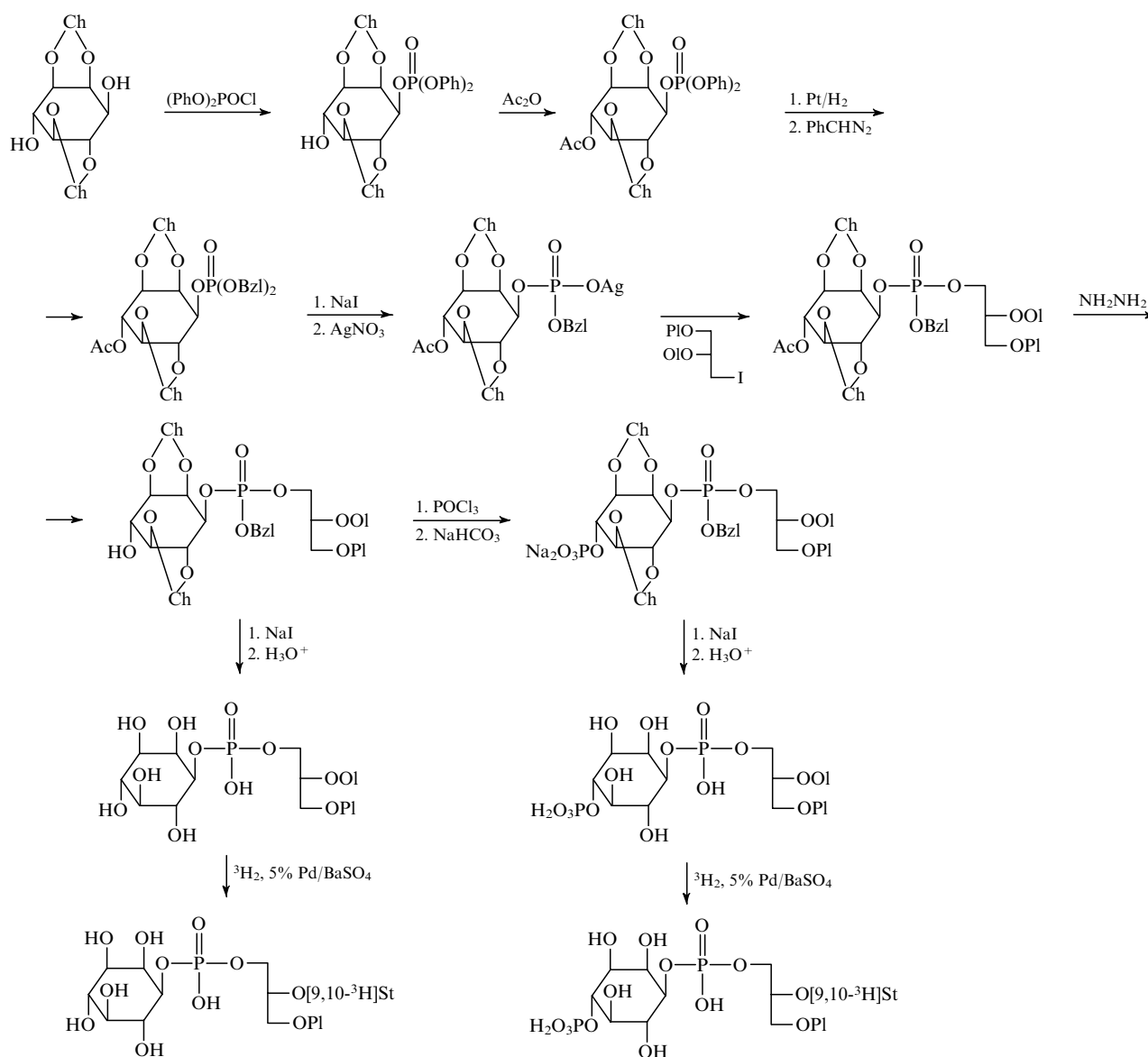
Описанные условия введения метки оказались универсальными. Они могут быть использованы для получения меченых стероидных эфиров. Например, гидрированием холестерилолеата получили холестерил[9,10-³H]стеарат²⁹ с молярной радиоактивностью 1.98 ПБк·моль⁻¹. Конденсация [9,10-³H]олеиновой кислоты (0.07 ПБк·моль⁻¹) с лизофосфатидилхолином в присутствии дициклогексилкарбодимида и диметиламинопиридина (отношение реагентов 1:1:1:100) при перемешивании их эфирных растворов в течение 20 ч при комнатной температуре сопровождается образованием лецитина с выходом 35–40%.⁴

В качестве примера использования биологических методов для получения меченных тритием производных жирных кислот можно привести синтез фосфатидил[³H]инозита.⁴ Исходный [2-³H]инозит синтезировали восстановлением коммерческого препарата — *сцилло*-инозозы (2,4,6,3,5-пентагидроксициклогексанона) твердофазным методом.³⁵ Для подбора оптимальных условий восстановления *сцилло*-инозозы использовали следующие катализаторы: 5% Pd/CaCO₃, 5% Rh/Al₂O₃, 5% Pd/BaSO₄, 5% Pt/C, 5% Pd/C. Лучшие результаты получены на родиевом катализаторе (отношение катализатор: субстрат составляло 10:1) при нагревании до 150°C в течение 15 мин (молярная радиоактивность меченого препарата — 0.56 ПБк·моль⁻¹, выход — 25%). Кроме того, из реакционной смеси с выходом ~10% была выделена *сцилло*-инозоза с молярной радиоактивностью 0.11 ПБк·моль⁻¹.

Биосинтез меченого фосфолипида осуществляли инкубацией [2-³H]инозита с культурой *Kloeckera brevis* (ATCC 9774) в течение 7 сут при 25°C. После экстракции, очистки хроматографическими методами и обессоливания выделен фосфатидил[³H]инозит, содержащий 54% исходной метки, с молярной радиоактивностью примерно в 2 раза ниже, чем у исходного [2-³H]инозита.

Сочетание химических и ферментативных подходов использовали при синтезе 1,2-диолеил-*sn*-[2-³H]глицеро-3-фосфосерина.⁵⁵ На первой стадии химическим путем синтезировали [2-³H]глицерин; в результате его ферментативной инкубации с глицеринкиназой в присутствии АТФ был получен *sn*-[2-³H]глицерин-3-фосфат (выход 98–99%). При кипячении (80°C) раствора монотетраэтиламмониевой соли *sn*-[2-³H]глицерин-3-фосфата в течение 3 ч в абсолютном четыреххлористом углеороде в присутствии тетраэтиламмониевой соли олеиновой кислоты и ангидрида олеиновой

Схема 5



Ch — циклогексилиден, PI — $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$, OI — $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{CO}$, St — $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{CO}$, Bzl — бензил.

кислоты (отношение реагентов 1:10:10) был получен 1,2-диолеил-*sn*-[2- ^3H]глицерин-3-фосфат с выходом $\sim 56\%$. Последний в виде пиридиниевой соли ввели в реакцию конденсации с бензгидриловым эфиром *N*-ВОС-серина в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида (отношение реагентов — 1:3.2:6.4). Конденсацию проводили при 30°C в течение 24 ч в абсолютном пиридине. После снятия защитных групп в кислых условиях и хроматографической очистки был выделен 1,2-диолеил-*sn*-[2- ^3H]глицерин-3-фосфосерин с общим выходом 12% и молярной радиоактивностью $0.93 \text{ ПБк} \cdot \text{моль}^{-1}$.

В современных биологических исследованиях меченые фосфолипиды играют важную роль. Например, при изучении роли ФАТ в регуляции клеточной активности и межклеточных взаимодействий его меченый аналог использовали для определения влияния на процессы активации клеток различных антагонистов, блокирующих действие ФАТ на уровне ФАТ-рецепторов.⁵¹ Так, синтетический антагонист липидной природы CV-3988 в интервале концентраций $0.1\text{--}0.15 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ингибировал связывание этого меченого фосфолипида с тромбоцитами, а также секрецию и агрегацию тромбоцитов.⁵⁷ Известно,⁵¹ что связывание дан-

ного фосфолипида с ФАТ-рецепторами вызывает каскад биологических реакций, приводящих к передаче сигнала внутрь клетки и ее последующей активации. Показано,⁵⁸ что уже через 5 с после действия ФАТ на тромбоциты фосфатидилинозит-4,5-дифосфат гидролизуетс с образованием инозит-1,4,5-трифосфата. Гидролиз происходит под влиянием мембраносвязанной фосфолипазы C. К тому же оказалось, что антагонисты ингибируют не только ФАТ-связывание меченого ФАТ с тромбоцитами, но и образование инозиттрифосфата в тромбоцитах.⁵⁹ Роль инозиттрифосфатов в регуляции уровня Ca^{2+} в цитоплазме клеток огромна, этим и объясняется заметное влияние фосфолипидов на жизнедеятельность клеток в целом.⁵⁰

6. Амиды жирных кислот

Этаноламиды — производные жирных кислот, являющиеся высокоактивными эндогенными биорегуляторами. В начале 1990-х годов из свиного мозга был выделен этаноламид арахидоновой кислоты,⁶⁰ названный впоследствии анандамидом. Анандамид оказался эндогенным лигандом к каннабиноидным рецепторам. Он конкурентно ингибировал

специфическое связывание каннабиноидов с рецепторами, а кроме того, повторял различные биологические эффекты каннабиноидов.^{60–67} Позже из головного мозга млекопитающих были выделены этаноламиды других полиеновых жирных кислот.^{68,69} Эти соединения также могут специфически связываться с каннабиноидными рецепторами. В настоящее время установлено, что ткани млекопитающих проявляют синтетазную и амидазную активность. Эти виды активности ответственны за синтез и инактивирование анандамида.^{70–77} Меченные тритием этаноламиды жирных кислот использовали для исследования их метаболизма, активности ферментов каскада арахидоновой кислоты при окислении этих производных жирных кислот, а также для изучения влияния этих меченых препаратов на функционирование каскада арахидоновой кислоты в различных растительных и животных клетках.

В [³H]этаноламиды метку можно ввести как по ацильному, так и по этаноламидному фрагментам. Если высоко-меченные жирные кислоты получают, используя селективное гидрирование в атмосфере газообразного трития, то ввести метку в этаноламин можно лишь с применением твердофазных методов.^{78,79} Перспективным в качестве исходного вещества оказался нитрил гликолевой кислоты; катализаторами могут быть 5% Pt/C, 5% Rh/C, 5% Pd/C, 5% Rh/Al₂O₃, 5% Rh/CaCO₃. Наиболее высокий выход наблюдается на палладиевых катализаторах, а молярная радиоактивность выше на родиевых катализаторах. Используя последние, удалось получить меченый этаноламин с молярной радиоактивностью 1.04–1.48 ПБк·моль⁻¹, но выходы были столь незначительны, что препаративные синтезы меченого соединения осуществляли только в присутствии 5% Pd/C. На платиновом катализаторе в основном идут реакции дегидратации.

Из данных, приведенных в табл. 9, видно, что оптимальной является температура 100–120°C. В этих условиях удавалось получить меченый препарат с выходом 10–20% и молярной радиоактивностью 0.15–0.22 ПБк·моль⁻¹.⁷⁸ Для конденсации жирных кислот с этаноламином применяли изобутилхлорформиат⁷⁸ или *N,N'*-диизопропилкарбодимид⁷⁹ (табл. 10).

В качестве примера использования меченых анандамида и этаноламида тимнодоновой кислоты для биологических исследований можно привести изучение кинетики окисления этих соединений 15-липоксигеназой соевых бобов, а также возможности их окисления в спленоцитах мышей.⁸⁰ Оказалось, что для этих соединений значения константы Михаэлиса (*K_m*) и *V_{max}* равны соответственно 3.2 мкмоль·л⁻¹, 0.11 мкмоль·л⁻¹·с⁻¹ и 4.9 мкмоль·л⁻¹, 0.15 мкмоль·л⁻¹·с⁻¹. Приведенные значения имеют тот же порядок, что и значения для арахидоновой кислоты.^{79,81} Экспериментально показано, что в спленоцитах мышей существует система

Таблица 9. Значения относительной степени включения метки и выхода этаноламина при гидрировании нитрила гликолевой кислоты при различных временах и температурах реакции (отношение 5% Pd/C: субстрат составляет 5:1)

<i>T</i> , °C (20 мин)	Степень включения метки ($\alpha_{отн}$), %	Время реакции, мин (100°C)	Выход, %
20	10	5	6
50	31	10	7
70	55	15	11
90	66	20	15
100	100	30	15
120	100	40	13
140	65	50	12
160	32	60	8
180	12	75	6
190	6	90	3

Таблица 10. Значения молярных радиоактивностей этаноламидов.

Соединение	α , ПБк·моль ⁻¹	Ссылки
<i>N</i> -Арахидоноил[³ H]этанолламин	0.012	79
<i>N</i> -Дигомо- γ -линоленоил[³ H]этанолламин	0.019	79
<i>N</i> -Эйкоза-11,14-диеноил[³ H]этанолламин	0.019	79
<i>N</i> -Эйкоза-11-еноил[³ H]этанолламин	0.023	79
<i>N</i> -Пальмитоил[³ H]этанолламин	0.012	79
<i>N</i> - γ -Линоленоил[³ H]этанолламин	0.026	79
<i>N</i> -[³ H]Арахидоноилэтанолламин	4.4	78
<i>N</i> -Арахидоноил[³ H]этанолламин	0.18	78
<i>N</i> -Тимнодоноил[³ H]этанолламин	0.182	78
<i>N</i> -Докозагексаеноил[³ H]этанолламин	0.182	78

метаболизма анандамида. Спленоциты относятся к клеткам, постоянно секретирующим в среду 12-НЕТЕ и другие эйкозаноиды. Изменение количества этих продуктов под действием анандамида, по-видимому, модулирует функции лимфоцитов и других клеток иммунной системы, находящихся под контролем эйкозаноидов.

Сфинголипиды — класс липидных молекул с разнообразным химическим строением и различной функциональной активностью. В сфинголипидах клеток животных и человека наиболее распространенным сфингозиновым основанием является сфингенин (сфингозин). Молекула сфингенина имеет два асимметрических атома углерода, поэтому может иметь четыре стереоизомерных формы. Природный сфингенин является *D-эритро*-изомером. *N*-Ацилирование аминогруппы в сфингенине жирными кислотами приводит к образованию церамидов — предшественников более сложных сфинголипидов (сфингомиелина и глико-сфинголипидов).

До 1980-х годов влияние на биологические эффекты структуры ацильного остатка в этих липидах практически не учитывалось.⁸² Однако уже в конце 1980-х годов появились данные, согласно которым сфингенин ингибирует клеточную дифференцировку,⁸³ а церамиды ее активируют.^{84–87} В настоящее время установлено, что биологические свойства жирнокислотного остатка в церамидах зависят от его длины. Так, было установлено, что C₁₈-церамид не ингибирует пролиферацию лимфоцитов в отличие от церамидов с короткой ацильной цепью (C₂, C₆),⁸⁸ а присутствие гидроксикислот в природных церамидах значительно уменьшает индукцию апоптоза.⁸⁹ Активация протеинфосфатазы церамидами также зависит от длины ацильной цепи.⁹⁰ По-видимому, это связано с гидрофобными взаимодействиями между углеводородными цепями сфингозина и жирной кислоты, на которые влияют структуры как сфингозиновой цепи (длина, наличие (сфингенин) или отсутствие (сфинганин) двойной связи), так и жирнокислотного остатка (длина, присутствие или отсутствие двойных связей, их количество, местоположение, наличие гидроксильных групп). Очевидно, в результате таких взаимодействий уменьшаются различия в эффекторной активности церамидов и дигидроцерамидов. Так, при исследовании механизма действия церамидов на клеточные мишени обнаружено, что дигидроцерамиды (в отличие от соответствующих церамидов) ингибировали, а не стимулировали активность протеинфосфатаз,^{90,91} не изменяли активности изоформы протеинкиназы C⁹² и фосфолипазы D,⁹³ которые ингибируются церамидами. В то же время *N*-ацетилсфингенин и *N*-ацетилсфинганин в ряде тестов проявляют одинаковую активность.

Метки в сфинголипидах можно вводить различными методами: конденсацией соответствующего аминокислоты с мечеными жирными кислотами; ферментативным или химическим окислением гидроксигрупп сфинголипида с последующим восстановлением боротритидами натрия или калия; биосинтезом меченых ганглиозидов с использова-

Таблица 11. Значения молярных радиоактивностей сфинголипидов.

Соединение	α , ПБк · моль ⁻¹	Ссылки
<i>Химические методы введения метки</i>		
<i>N</i> -Олеилсфинганин ^a	7.78	94
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Амино[3- ³ H]додец-4-ен-1,3-диол ^b	0.019	95
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>E</i>)-2-Амино[3- ³ H]додец-4-ен-1,3-диол ^b	0.034	95
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Амино[3- ³ H]октадец-4-ен-1,3-диол ^b	0.020	95
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>E</i>)-2-Амино[3- ³ H]октадец-4-ен-1,3-диол ^b	0.036	95
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Амино[1- ³ H]октадец-4-ен-1,3-диол ^b	0.004	96
<i>Гидрирование газообразным тритием</i>		
Сфингомиелин	0.218	28
Ганглиозид		
G _{D1α}	0.115	28
G _{D2β}	0.137	28
G _{M1}	0.196	28
G _{M2}	0.496	28
G _{M3}	0.014	28
G ₁	0.159	28
G ₂	0.107	28
Галактозилцерамид ^c	1.94	4
Галактозилцерамид ^d	0.895	4

Примечание. Ганглиозиды мозга и печени обозначены по Свеннерхолму (G_{D1α}, G_{D2β}, G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}); ганглиозиды морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*: G₁ — *N*-гликолилнейраминозил-(α ,2 → 6)-глюкозил-(1 → 8)-*N*-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 1)-церамид, G₂ — 8-сульфо-*N*-гликолилнейраминозил-(α ,2 → 6)-глюкозил-(1 → 8)-*N*-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-глюкозил-(1 → 1)-церамид.

^a Для введения метки в сфинганин использован твердофазный метод с последующей конденсацией с олеиновой кислотой. ^b Применяли боротритид натрия. ^c В качестве катализатора использовали 5% Pd/BaSO₄. ^d В качестве катализатора использовали катализатор Линдлара.

нием меченого *N*-ацетил-*D*-маннозамина; гидрированием газообразным тритием соответствующих ненасыщенных предшественников (табл. 11).

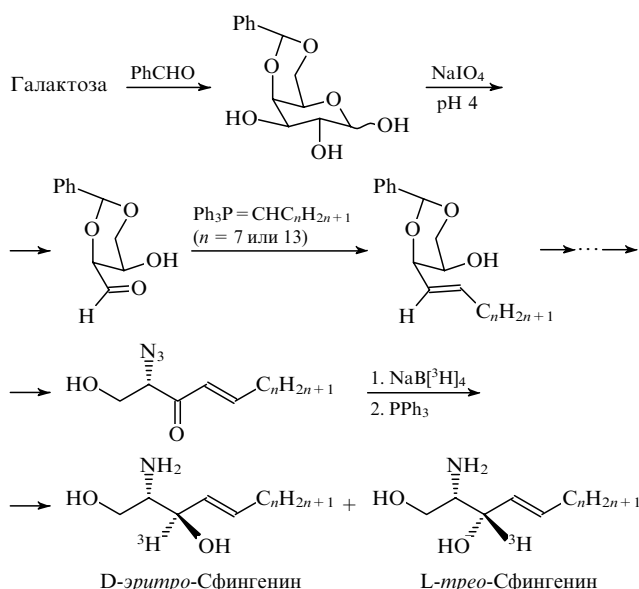
С использованием последнего метода получены различные меченые ганглиозиды, сфингомиелин и церамиды. Установлено,^{4,5} что при гидрировании ³H-метка в основном

присоединяется к атомам углерода ненасыщенных связей. При использовании метода жидкофазного изотопного обмена для введения метки в ненасыщенные жирные кислоты, последняя в основном включается в аллильные положения и двойные связи. Основная часть метки в фосфолипиде содержится в жирнокислотном остатке этих соединений, а в сфинголипиде — как в жирнокислотном, так и в сфингозиновом фрагментах (табл. 12).

В процессе получения меченых цереброзидов в присутствии катализатора Линдлара метка включается в основном в жирнокислотный фрагмент, а при использовании 5% Pd/BaSO₄ — преимущественно в сфингозиновый. Это объясняется тем, что в молекулах этих соединений имеется несколько полярных групп (карбоксы, гидроксы, amino и т.д.), которые конкурируют друг с другом за активные центры на поверхности катализатора.²⁸ По-видимому, адсорбция жирнокислотного остатка на катализаторе Линдлара становится предпочтительней, чем адсорбция сфингозиновых оснований. Это и обуславливает распределение тритиевой метки.

Следует отметить, что с помощью химических методов можно синтезировать соединения с заданным распределением метки.^{95,96} Полным химическим синтезом получены меченые *D*-эритро- и *L*-трео-сфингенины (схема 6).

Схема 6

Таблица 12. Распределение трития в основных фрагментах меченых глико-сфинголипидов после каталитической реакции с газообразным тритием в растворе.²⁸

Соединение	Катализатор	Активность трития во фрагментах, ПБк · моль ⁻¹			
		жирные кислоты	жирные гидроксикислоты	сфингозиновые основания	полярные фрагменты
Галактозилцерамид	5% Pd/BaSO ₄	0.368 (19)	0.291 (15)	1.163 (60)	0.116 (6)
Галактозилцерамид	Катализатор Линдлара	0.260 (29)	0.340 (38)	0.296 (33)	—
Ганглиозид					
G _{D1α}	5% Pd/BaSO ₄	0.009 (8)	—	0.094 (82)	0.012 (10)
G ₂	(Ph ₃ P) ₃ RhCl	0.086 (80)	—	0.020 (19)	0.001 (1)
G ₁	5% Pd/BaSO ₄	0.065 (33)	—	0.116 (59)	0.016 (8)
G _{M2}	5% Pd/BaSO ₄	0.298 (60)	—	0.169 (34)	0.030 (6)
Сфингомиелин	Катализатор Линдлара	0.140 (64)	—	0.076 (35)	0.002 (1)

Примечание. В скобках указана доля активности данного фрагмента относительно активности исходной молекулы.

Для этого из галактозы получали ряд азидосфингозинов, аллильный гидроксил которых окисляли 2,3-дихлоро-5,6-дицианобензохиноном с последующим восстановлением образующегося кетона боротритидом натрия.⁹⁵

Интересный подход предложен в работе⁹⁶. В качестве исходного соединения был взят природный сфингенин, первичный гидроксил которого (после защиты аминогруппы и аллильного гидроксила) окисляли CrO_3 (реактив Коллинса). После восстановления образовавшегося альдегида боротритидом натрия и снятия защитных групп был выделен $[1\text{-}^3\text{H}]$ сфингенин природной конфигурации.

Меченые сфинголипиды использовали при изучении взаимодействия ганглиозидов с липопротеинами низкой плотности (применяли меченный тритием ганглиозид $\text{G}_{\text{M}3}$)⁹⁷ и роли ганглиозидов в рецепции и проникновении в клетку вируса гриппа.⁹⁸ В последнем случае исследовались клетки асцитной карциномы Эрлиха, являющиеся эффективными реципиентами вируса гриппа. Адсорбция вируса резко снижалась после обработки клеток нейраминидазой из *Vibrio cholerae*, поэтому можно было предположить, что рецепторами вируса на поверхности клеток являются сигнало-содержащие соединения — ганглиозиды. Действительно, ганглиозиды $\text{G}_{\text{M}1}$, $\text{G}_{\text{D}1\alpha}$ и $\text{G}_{\text{T}1\beta}$ восстанавливали адсорбцию вирусов клетками. На основании приведенных данных сделаны следующие выводы: 1) «минимальным» структурным элементом, обеспечивающим адсорбцию вируса этими ганглиозидами, является олигосахаридная цепь ганглиозида — $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 (\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3) \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}$; 2) ганглиозиды, по-видимому, участвуют как в связывании вируса, так и в его проникновении внутрь клетки, причем на один рецепторный сайт приходится ~ 100 молекул ганглиозидов, способных участвовать в рецепции.

III. Оксипирины

К оксипиринам относятся эйкозаноиды, а также эйкозаноид-подобные соединения с укороченной или удлиненной углеродной цепью, которые синтезируются главным образом с участием циклооксигеназы, липоксигеназы и цитохрома P450.^{5,99} Схема 7 иллюстрирует основные пути метаболизма арахидоновой кислоты, продуктами которого являются оксипирины: простагландины (PG), тромбоксаны (TX), лейкотриены (LT), гидроксикоизотетраеновые кислоты (HETE), гидропероксикоизотетраеновые кислоты (HPETE), липоксины (LX), гепоксисины (HX), эпоситриеновые кислоты (EET) и др. Отметим, что на схеме представлены только превращения арахидоновой кислоты и ее производных, однако в этих реакциях субстратом могут быть и другие эйкозаполиеновые кислоты.

Схема 7



Под воздействием ферментов из арахидоновой кислоты образуются, во-первых, PG, TX, простаглицлины (PGI); во-вторых, гидроксикислоты (LT, HX, LX); в-третьих, различные эпоси- и ω-гидроксипроизводные жирных кислот. Получение PG и TX показано на примере превращений простаглицлина G_2 (схема 8); получение гидроксикислот и

LT — на примере превращения 5-HPETE (схемы 9, 10); получение гидроксикислот, LX и HX — на примере превращений 12- и 15-HPETE (схемы 11, 12); получение ω-гидроксикислот и эпосидов — на примере окисления арахидоновой кислоты в присутствии цитохромов P450 (схема 13).

Биологические и фармакологические действия этих соединений многообразны. Так, липоксисины регулируют активность клеток-киллеров и обладают спазмогенной активностью,¹⁰⁰ гепоксисины являются рилизинг-факторами секреции инсулина в клетках поджелудочной железы и регулируют трансмембранный перенос кальция,¹⁰¹ лейкотриены являются медиаторами гиперчувствительности организма (аллергия, анафилаксия).¹⁰² Простаглицлины уже нашли применение как лекарственные средства.¹⁰³ Несмотря на многообразие оксипиринов и широкий спектр их биологического действия, надо иметь в виду, что только постоянное взаимодействие этих соединений друг с другом обуславливает протекание процессов, необходимых для жизнедеятельности организма. Справедливость этой концепции подтверждена при изучении роли метаболитов арахидоновой кислоты в обеспечении нормального функционирования системы гемостаза у млекопитающих.¹⁰⁴ Оказалось, что в этой системе существуют, по крайней мере, два пути поддержания необходимого уровня арахидоновой кислоты (из фосфолипидов клеток и из плазменных липопротеинов низкой плотности). Метаболиты полиненасыщенных жирных кислот (например, простаглицлин, 13-гидроксикоизотетрадекадиеновая кислота, 6-кето-PGE₁, PGE₁, различные HETE и HPETE, TXA₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGD_{2β}, LTA₄, LTB₄) принимают участие в регуляции практически всех звеньев свертывающей системы крови, в процессах плазменного звена гемостаза, изменяют фибринолитический потенциал крови и влияют на гемодинамические условия. Таким образом, актуальность изучения именно этих объектов обусловлена тем, что центральным звеном механизма действия большинства биоэффекторных липидов является их влияние на процессы ферментативного окисления полиеновых жирных кислот.

Основные исследования в области оксипиринов после установления их строения были направлены на изучение биосинтеза и метаболизма этих соединений. Здесь меченые оксипирины сыграли решающую роль. Поэтому часть данного обзора, посвященную получению меченых оксипиринов с использованием ферментативных методов, можно считать иллюстрацией применения этих меченых препаратов для биологических исследований. Кроме того, при изучении метаболических превращений оксипиринов рассматриваются их разнообразные свойства, например, растворимость, способность проникать через биологические мембраны и т.д. Фармакокинетика первых лекарственных препаратов (как правило, это были природные простаглицлины и их синтетические аналоги) успешно изучалась с помощью меченых аналогов. Меченые аналоги незаменимы при разработке высокочувствительных методов определения оксипиринов в биологических образцах и изучении процессов их рецепции, т.е. их взаимодействия с белковыми молекулами.

Введение метки в эйкозаноиды может быть осуществлено различными методами. Изотопный обмен или химические методы применяются для введения метки в синтетические производные оксипиринов, когда в качестве предшественников используются немеченые простаглицлины и когда выходы искоемых продуктов при применении биологических методов ничтожны (например, получение эпосисоединений, простаглицлина и т.д.), а также для превращения одних меченых соединений в другие.

Методы изотопного обмена и химические методы незаменимы при получении меченых эйкозаноидов не природной структуры, например (17S)-17-метил-20-[11-³H]гомоизокарбаглицлина,¹⁰⁵ фторпроизводных простаглицлинов¹⁰⁶ и т.д. С помощью этих методов удалось получить фторпроизвод-

Схема 8

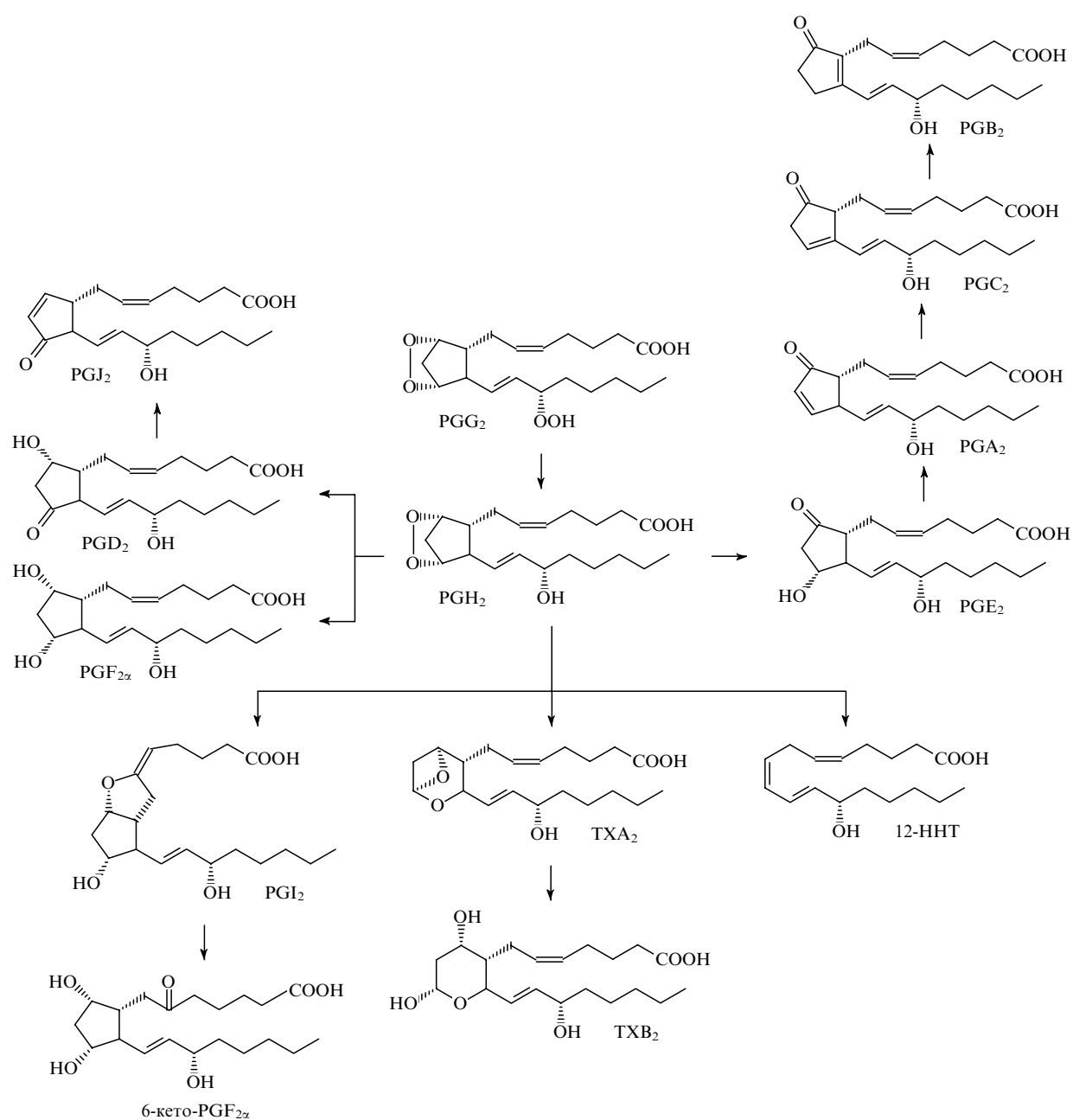


Схема 9

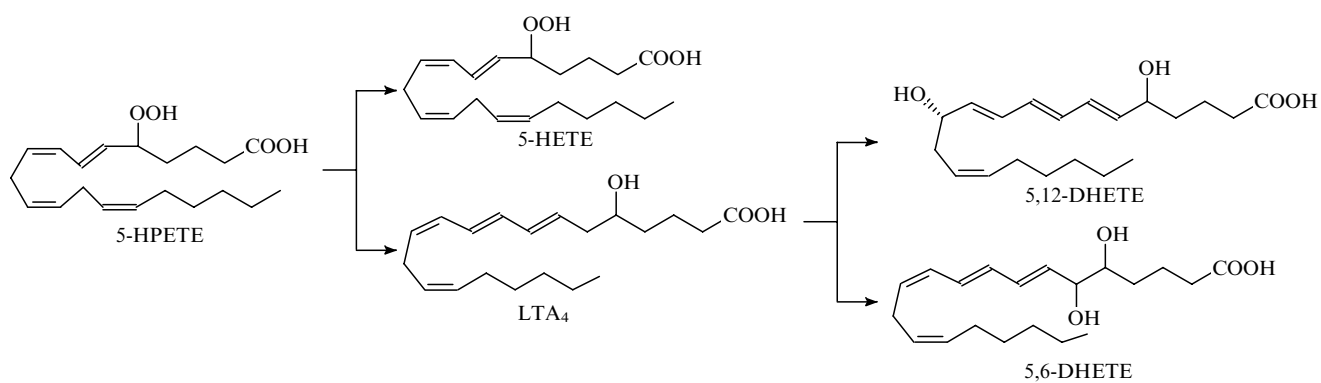


Схема 10

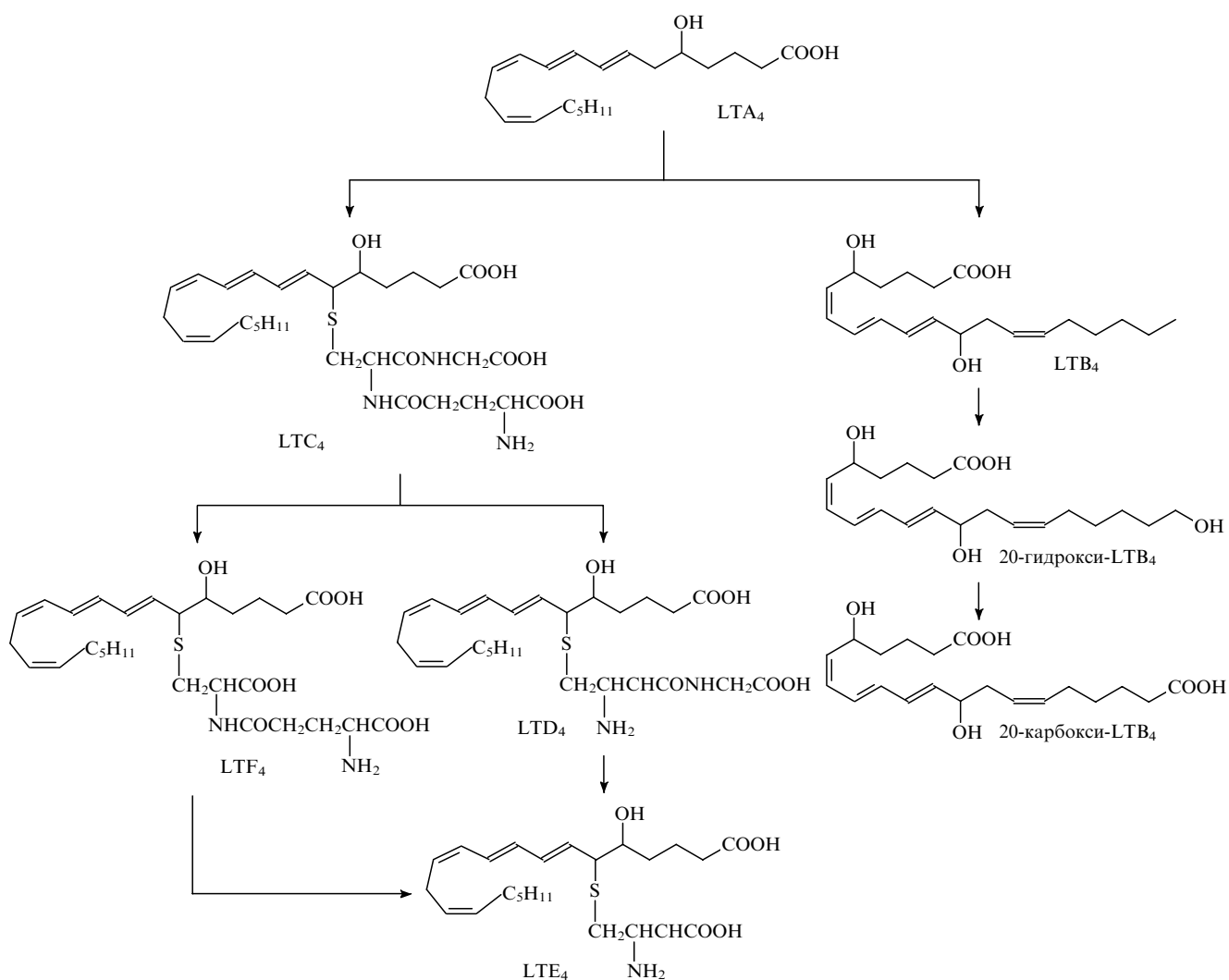


Схема 11

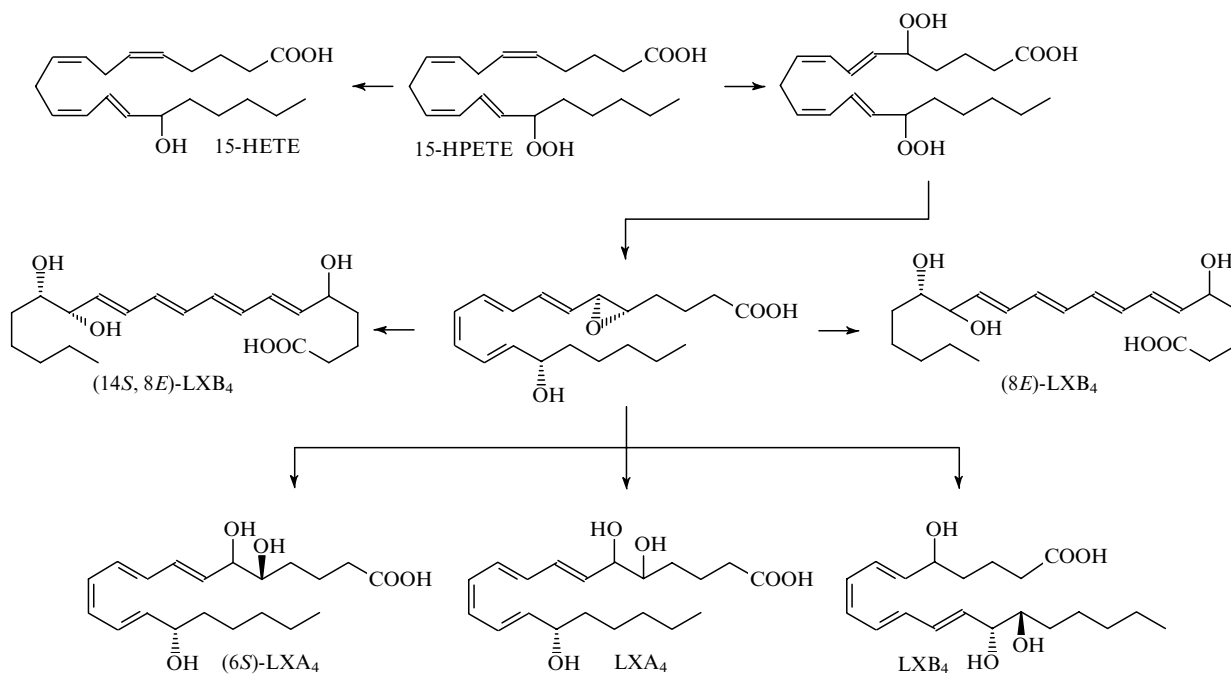


Схема 12

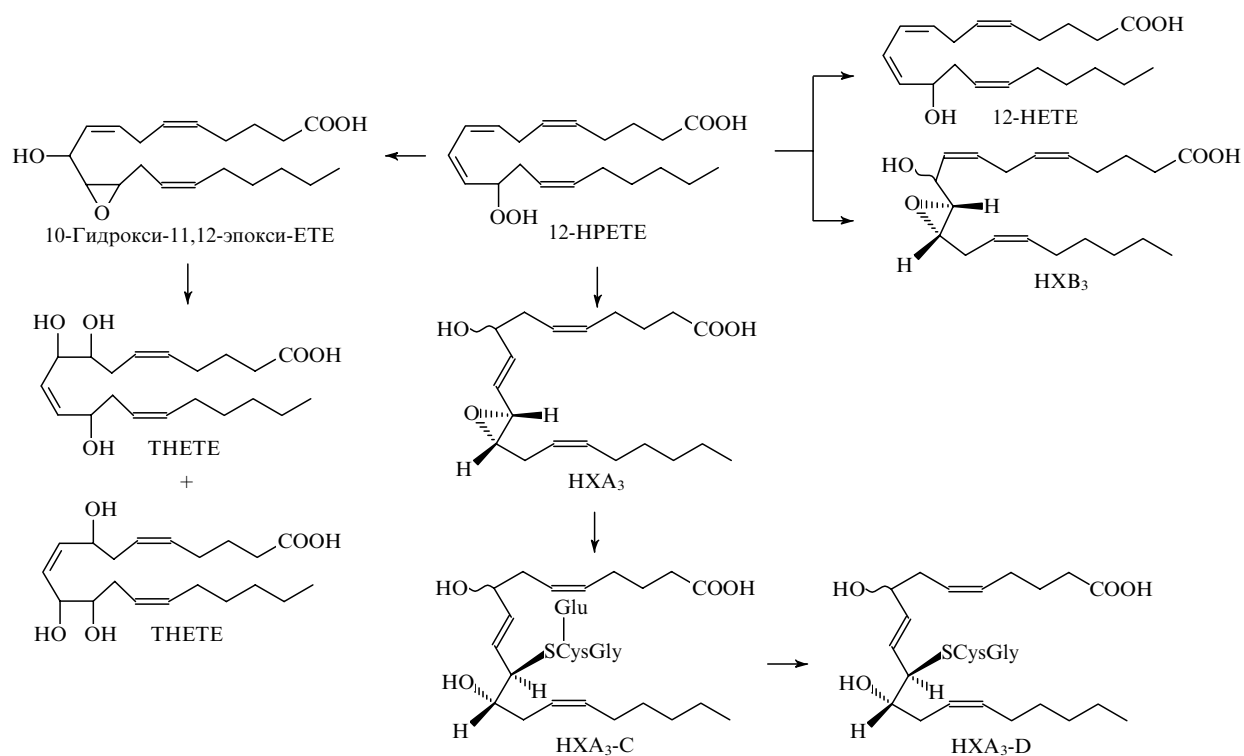


Схема 13

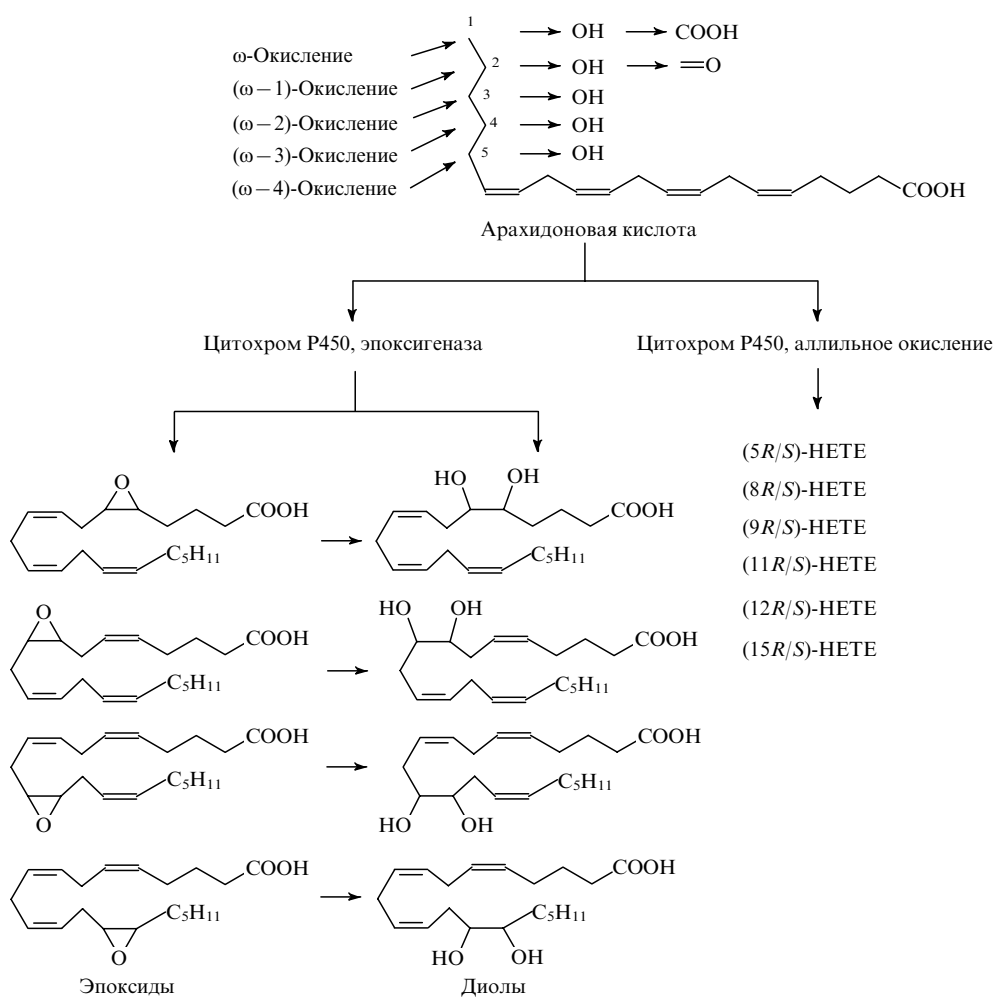


Таблица 13. Значения молярных радиоактивностей оксилипинов, полученных гидрированием газообразным тритием, методом изотопного обмена и химическими методами.

Соединение	α , ПБк·моль ⁻¹	Ссылки
<i>Гидрирование газообразным тритием</i>		
[13,14- ³ H]Лейкотриен A ₄ ME	1.48–1.67	108
(15S)-8-эпи-[5,6- ³ H]PGF _{2α}	1.85–1.93	108
(15R)-8-эпи-[5,6- ³ H]PGF _{2α}	1.85–1.93	108
[5,6,8,9,14,15- ³ H]HXB ₃ ME	2–4	19
[17,18- ³ H]PGE ₂	1.5–1.6	29
[5,6,17,18- ³ H]PGE ₁	2.8–2.9	29
[5,6- ³ H]PGE ₁	1.8–2.0	29
15-Фтор-15-дезоксид-[5,6- ³ H]PGE ₁	0.9–1.1	29
11-Дезокси-[5,6,10,11- ³ H]PGE ₁	2.6–3.0	29
<i>Жидкофазный изотопный обмен</i>		
15-Фтор-11,15-дидезоксид-[G- ³ H]PGE ₁ ME	0.13	29
15-Фтор-15-дезоксид-[G- ³ H]PGF _{2α} ME	0.09	29
5-Иод-15-фтор-15-дезоксид-[G- ³ H]PGI ₁ ME	0.05	29
<i>Химические методы</i>		
(17S)-17-метил-20-[11- ³ H]гомоизо-карбацклин ^a	0.68	105
[8,11,12,14,15- ³ H]PGA ₁ ^b	4.1	29
[5,6,8,11,12,14,15- ³ H]PGA ₂ ^b	5.2	29
[5,6,8,11,12,14,15,17,18- ³ H]PGA ₃ ^b	7.3	29
[11,14,15- ³ H]PGB ₁ ^b	2.9	29
[5,6,11,14,15- ³ H]PGB ₂ ^b	3.7	29
[5,6,11,14,15,17,18- ³ H]PGB ₃ ^b	5.7	29
[8,11,12,14,15- ³ H]PGF _{1α} ^b	4.6	29
[5,6,8,11,12,14,15- ³ H]PGF _{2α} ^b	5.8	29
[5,6,8,11,12,14,15,17,18- ³ H]PGF _{3α} ^b	7.3	29
[8,11,12,14,15- ³ H]PGF _{1β} ^b	4.6	29
[5,6,8,11,12,14,15- ³ H]PGF _{2β} ^b	5.8	29
[5,6,8,11,12,14,15,17,18- ³ H]PGF _{3β} ^b	7.3	29
[5,8,11,12,14,15- ³ H]PGI ₂ ME ^c	5.0	29
6-Кето-[5,8,11,12,14,15- ³ H]PGF _{1α} ME ^d	4.9	29

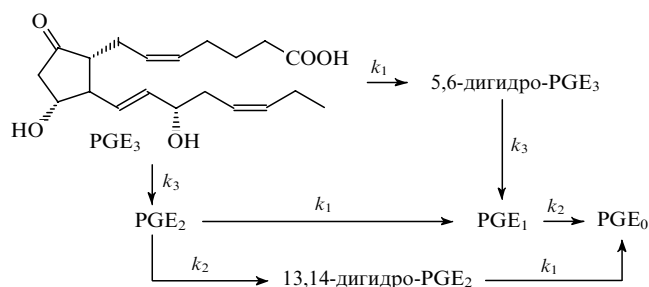
Примечание. ME — метиловый эфир.

^a Использовался боротритид натрия с молярной радиоактивностью 3.04 ПБк·моль⁻¹. ^b Получен из [³H]PGE. ^c Получен из [³H]PGF_{2α} ME. ^d Получен из [³H]PGI₂ ME.

ные препараты с молярной радиоактивностью от 0.09 до 1.1 ПБк·моль⁻¹ (табл. 13).

При селективном гидрировании простагландинов серий 2 и 3 (например, PGE₃ до PGE₂ и PGE₁, схема 14) газообразным тритием получены¹⁰⁷ меченые препараты с молярными радиоактивностями 1.5–2.9 ПБк·моль⁻¹ (см. табл. 13).

Схема 14

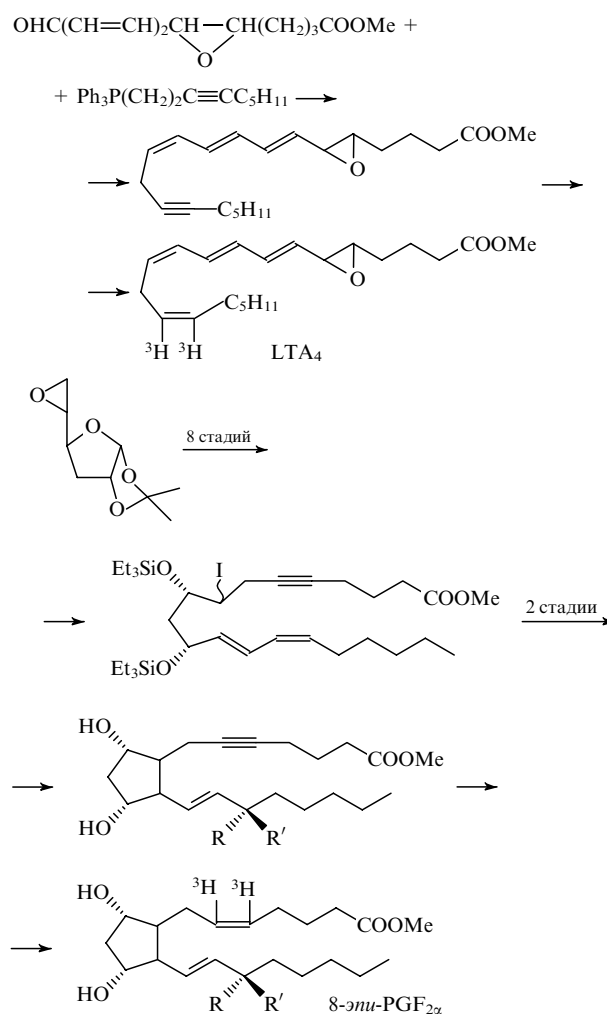


При использовании последнего метода результаты расчетов в предположении, что скорости всех реакций описываются уравнением первого порядка, показали хорошее совпадение с экспериментальными данными. При этом отно-

шение констант скоростей гидрирования k_1 , k_2 , k_3 при проведении реакции в ацетоне было 2:1:4, а в смеси бензола с ацетоном — 2:1:8. Очевидно, что для получения меченого PGE₂ из PGE₃ последняя смесь предпочтительнее (в этих условиях выход [³H]PGE₂ составил 40–45%, а [³H]PGE₁ — 10–15%).

При использовании химических методов для получения меченых соединений необходимо детально изучить их химические свойства. Например, известно,⁵ что простагландины типа E в кислой среде превращаются в PGA, в щелочной — в PGB, а при обработке борогидридами — в PGF. Последний, в свою очередь, может служить предшественником для синтеза простагличина или 6-кето-PGF_{1α} (см. табл. 13). Химическим путем можно получить также меченые метиловые эфиры LTA₄ и 8-эпи-PGF_{2α} (схема 15).^{108, 109, 110}

Схема 15

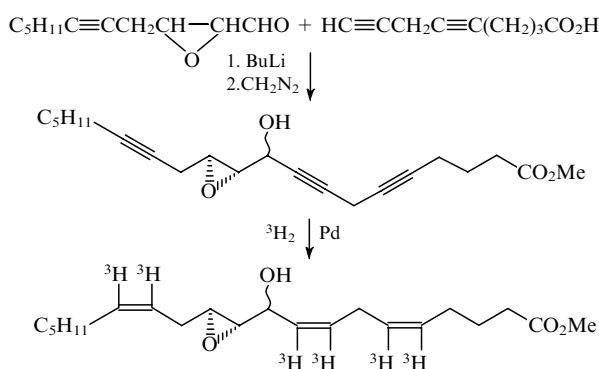


R = OH, R' = H; R = H, R' = OH.

Подбор катализаторов для селективного гидрирования газообразным тритием проводили методами, описанными в разделе П.1. Лучшие результаты получены при использовании палладиевых катализаторов, импрегнированных диэтаном свинца. В случае более лабильных соединений в качестве компонента растворителя использовали триэтиламин, чтобы свести к минимуму образование побочных продуктов.

Селективным гидрированием газообразным тритием можно синтезировать и другие оксилипины, например [5,6,8,9,14,15-³H]гепоксислины B₃ (схема 16).¹⁹

Схема 16



Наиболее же распространенными методами получения меченых эйкозаноидов являются ферментативные методы с использованием в качестве исходного субстрата меченых эйкозаполиеновых кислот (см. схему 7). В обзоре невозможно привести все известные на сегодняшний день данные по этой проблеме. Поэтому ограничимся рассмотрением лишь небольшого числа примеров, иллюстрирующих универсальный характер этого подхода.¹¹¹ Так, при использовании одного фермента — PG-синтазы, который катализирует реакцию превращения эйкозаполиеновых кислот в PGH (соединение со временем полураспада в водной среде ~ 5 мин), можно синтезировать меченые PGD, PGE, PGF_{2α}, 12-гидроксигептадекатриеновую кислоту (ННТ) (см. схему 8). Выход меченого PGH, а следовательно, и продуктов его деструкции, зависит от концентраций эйкозаполиеновой кислоты и PG-синтазы. В оптимальных условиях выход [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]PGH₂ составил 70%, [5,6,8,9,11,12,14,15,17,18-³H]PGH₃ — 45%, [5,6,8,9,11,12-³H]ННТ — 35%, [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]-PGF_{2α} — 63%, [5,6,8,9,11,12,14,15,17,18-³H]PGF_{3α} — 27%, [5,6,8,9,12,14,15,17,18-³H]PGD₃ — 25%. Соотношение продуктов неферментативной деструкции PGH₂ при проведении реакции в различных буферных системах различно (табл. 14).

При использовании биферментных систем удалось подобрать условия, при которых образуется преимущественно один продукт, а также получить соединения, не образующиеся при самопроизвольной деструкции PGH. В этом случае помимо PG-синтазы, использовали ферменты, специфически превращающие лабильный [³H]PGH в [³H]PGE, [³H]PGD, меченый тромбоксан и [³H]ННТ: PGE-синтазу для синтеза [³H]PGE, PGD-синтазу для синтеза [³H]PGD и [³H]TX-синтазу для синтеза [³H]TXB и [³H]ННТ. В работе¹¹² применяли индивидуальные ферменты; условия биосинтеза эйкозаноидов оптимизировали варьированием концентрации каждого из ферментов и их соотношения.¹¹² Все препараты, использовавшиеся в этом исследовании, сохраняли

Таблица 14. Состав продуктов неферментативной деструкции PGH₂ при проведении PG-синтазной реакции в различных буферных системах.¹¹¹

Буфер	Концентрация буфера, ммоль · л ⁻¹	Содержание простагландина, %		
		PGD ₂	PGE ₂	PGF _{2α}
Трис-буфер, рН 9.5	10	12	23	65
Калий-фосфатный буфер, рН 7.4	50	19	39	42
Калий-фосфатный буфер, рН 7.4 ^a	50	29	26	45

^a Через 30 с инкубации в реакционную смесь добавляли соляную кислоту до рН 3 и продолжали инкубацию еще 1 ч при 25°C.

активность в процессе хранения (6 мес при -60°C). Даже высоколабильная PGE-синтаза сохраняла свою активность в пределах 80% в течение 12 дней при -60°C. Инактивацию ферментов (PG-синтазы, 12-липоксигеназы и TX-синтазы) в процессе биосинтеза учитывали, используя кинетическое уравнение

$$\frac{de}{ds} = \frac{1}{V},$$

где e — концентрация активных форм фермента, s — концентрация субстрата, V — безразмерный параметр, отражающий число оборотов фермента до его полной инактивации. Величина V определяется химической природой субстрата. Значения V , приведенные в работе¹¹⁰ для реакций превращения арахидоновой и тимнодоновой кислот под действием PG-синтазы, показали, что для рассматриваемых реакций они различаются более чем в 10 раз.

Количественные расчеты, проведенные с применением математической модели, и результаты экспериментальных исследований биферментных систем показали,¹¹² что максимального выхода целевых продуктов можно достичь только при постепенном вводе субстрата в реакционную смесь, содержащую оба фермента. В этих условиях выход меченых эйкозаноидов лимитируется только инактивацией ферментов в процессе реакции. Кроме того, отмечено, что эффективность работы биферментной системы может быть значительно увеличена, если использовать определенные начальные концентрации ферментов и субстрата.

Таким образом, стратегию ферментативного синтеза меченых эйкозаноидов, основанную на применении искусственных биферментных систем, можно сформулировать следующим образом.¹¹² Во-первых, необходимо использовать возможно более чистые ферментные препараты, так как на балластных белках происходит значительная сорбция исходных меченых эйкозаполиеновых кислот, которые вследствие этого становятся недоступны для PG-синтазы, а кроме того, эти белки могут «спровоцировать» превращения PGH в нежелательных направлениях (табл. 15).

Во-вторых, отношение фермент: субстрат должно быть оптимальным, например, на единицу активности PG-синтазы должно приходиться 747 и 63 нмоль арахидоновой и тимнодоновой кислот соответственно.

Таблица 15. Влияние степени очистки ферментных препаратов на содержание эйкозаноида в реакционной смеси.¹¹¹

Ферментный препарат	Выход, %
<i>Синтез PGE₂</i>	
Микросомы везикулярных желез барана	50
Частично очищенные препараты PG-синтазы и PGE-синтазы	80
<i>Синтез PGE₃</i>	
Микросомы везикулярных желез барана	30
Частично очищенные препараты PG-синтазы и PGE-синтазы	45
<i>Синтез TXB₂</i>	
Микросомы везикулярных желез барана и тромбоцитов человека	15
Частично очищенные препараты PG-синтазы и тромбоксан-синтазы	80
<i>Синтез 12-НТЕ</i>	
Микросомы тромбоцитов человека	35
Частично очищенный препарат 12-липоксигеназы	50

В-третьих, для достижения высокого выхода целевого продукта требуется использование высоких концентраций ферментов, которые превращают PGH в искомый продукт (при получении PGE₂ увеличение количества PGE-синтазы в 4 раза повышало выход искомого эйкозаноида в 1.9 раза, при получении PGD₂ увеличение количества PGD-синтазы в 3 раза повышало выход искомого эйкозаноида в 2 раза, при получении TXB₂ увеличение количества TX-синтазы в 5 раз повышало выход искомого эйкозаноида в 2.4 раза). Это, очевидно, связано с тем, что необходимо создать условия, при которых скорость ферментативного превращения PGH значительно превышает скорость его самопроизвольной деструкции.

В-четвертых, очень важна технология проведения биосинтеза. Так, выход искомого продукта можно увеличить в 1.5–2 раза при раздельном добавлении в реакционную смесь используемых ферментов (табл. 16). Оптимальное время инкубации эйкозаполиеновой кислоты с PG-синтазой до внесения второго фермента составляет 1.5–2 мин. Это время соответствует периоду, в течение которого достигается максимальное накопление PGH, т.е. в момент, когда скорость его образования в ходе PG-синтазной реакции совпадает со скоростью его неферментативной деструкции.

Таблица 16. Выходы эйкозаноидов, полученных в биферментном синтезе при одновременном (I) и раздельном (II) добавлении PG-синтазы и PGH-превращающего фермента в реакционную смесь.¹¹¹

Эйкозаноид	Выход, %	
	I	II
PGD ₂	23	33
PGD ₃	17	25
TXB ₂	13	24
TXB ₃	10	18

В-пятых, оказалось, что температурная зависимость выхода этих эйкозаноидов при биферментном синтезе имеет широкий оптимум от 20 до 25°C. Это означает, что для получения оптимального выхода меченых эйкозаноидов, ферментативные реакции можно осуществлять при комнатной температуре.

Используя изложенную стратегию ферментативного синтеза, удалось получить целый ряд высокомеченных оксипинов (табл. 17).

Таблица 17. Значения молярных радиоактивностей оксипинов, полученных ферментативными методами.

Соединение	α , ПБк · моль ⁻¹	Ссылки
[8,11,12,14,15- ³ H]PGE ₁	4.65	29
[5,6,8,11,12,14,15- ³ H]PGE ₂	5.90	29
[5,6,8,9,11,12,14,15- ³ H]PGF _{2α}	6.10	29
[5,6,8,9,12,14,15- ³ H]PGD ₂	5.98	29
[5,6,8,9,11,12,14,15- ³ H]TXB ₂	5.27	29
[5,6,8,11,12,14,15,17,18- ³ H]PGE ₃	7.35	29
[5,6,8,9,12,14,15- ³ H]PGD ₂	4.44	113
13,14-Дигидро-15-кето-[³ H]PGD ₂ ^a	—	113
[9α,11β- ³ H]PGF ₂ ^a	—	113
[15- ³ H]HETE	6.20	114
[5,15- ³ H]DHETE	5.10	114
[8,15- ³ H]DHETE	6.00	114
12-[³ H]HPETE	5.26	115
[12- ³ H]HETE	5.26	115
[15- ³ H]HPETE	5.37	115
[15- ³ H]HETE	5.37	115

^a Получен из [5,6,8,9,12,14,15-³H]PGD₂.

В последнее время большой интерес вызывают работы, в которых исследуется функционирование различных ферментных подсистем в гетерофазных системах.¹¹² Это связано с тем, что каталитическая активность и стабильность многих ферментов в условиях проведения биосинтеза могут быть значительно повышены. Так, поиск способов увеличения «производительности» ферментов синтеза простагландинов, подверженных необратимой инактивации в ходе реакции, показал необходимость использования макрогетерогенных систем (вода в октане и октан в воде). При этом оказалось, что во всех исследуемых гетерофазных системах активность ферментов синтеза эйкозаноидов (PG-синтазы, PGE-синтазы, TX-синтазы и 12-липоксигеназы) сохранялась. Наибольшие значения активности *V* для PG-синтазной реакции наблюдались при использовании эмульсий октана в воде, стабилизированных нативными микросомальными мембранами. Также было обнаружено, что при соотношениях вода : октан : лиофилизированные мембраны, близких к тем, при которых происходит расслаивание системы, каталитическая активность PG-синтазы возрастает почти в 10 раз по сравнению с ее значением в системах, не содержащих органический растворитель. Но главное преимущество этого подхода к получению меченых препаратов заключалось в том, что в системе стабилизированных эмульсий меченая эйкозаполиеновая кислота концентрируется преимущественно в органическом растворителе, а продукты окисления (например, PGE₂) обнаруживаются только в водной фазе. В результате этого, во-первых, снижается негативное влияние радиолита на образование искомым меченых эйкозаноидов, во-вторых, продукты реакции, фермент и непрореагировавший субстрат легко разделяются центрифугированием.

В дополнение к перечисленным выше методам получения меченых оксипинов необходимо упомянуть также возможность синтеза ряда меченых простагландинов модификациями других меченых простагландинов с использованием ферментативных методов. Проведение этих реакций химическим путем сопряжено с образованием стереоизомеров и с необходимостью проведения дополнительных стадий, связанных с защитой близких по реакционной способности функциональных групп. Очевидно, что ферментативный синтез простагландинов с использованием в качестве субстрата других простагландинов лишен этих недостатков. Так, из [³H]PGF_{2α} и [³H]PGD₂ с использованием 9- и 15-гидроксипростагландиндегидрогеназ, PGF-синтазы и т.д. из различных источников синтезированы 15-кето-PGF_{2α}, 13,14-дигидро-15-кето-PGF_{2α}, PGE₂, 15-кето-PGE₂, 13,14-дигидро-15-кето-PGE₂, 9α,11β-PGF₂ (см. табл. 17).^{111–113}

Используя ферменты липоксигеназного пути метаболизма эйкозаполиеновых кислот, например, 15- и 12-липоксигеназы (см. схемы 11, 12), удалось получить меченые 15-HETE, 5,15-DHETE, 8,15-DHETE, 12-HETE с выходами до 60–65, 20–25, 10–15 и 21–51% соответственно.

Оптимальные условия этих реакций удалось найти при изучении зависимости выхода искомым продуктов от присутствия в реакционной смеси соответствующих добавок, от отношения субстрат : фермент, от концентраций субстрата и фермента, от степени очистки фермента и т.д.^{111, 114, 115}

Анализ данных табл. 18 показывает, что проведение 12-липоксигеназной реакции в присутствии ряда восстановителей приводит к заметному увеличению выхода 12-HETE. Однако не всегда применение ферментов приводит к успеху. Так, используя ферменты, осуществляющие липоксигеназный путь превращения эйкозаполиеновых кислот, синтезировали меченый лейкотриен В₄ с выходом лишь 0.1%,²⁹ а выходы липоксинов¹¹⁶ вообще пренебрежимо малы. Эти примеры показывают, что для использования ферментативных методов требуется четкий выбор условий проведения реакций, а также исследование факторов, снижающих выход целевых продуктов.

Таблица 18. Выходы в синтезе 12-НЕТЕ из [³H]арахидоновой кислоты в зависимости от природы восстанавливающих агентов.¹¹¹

Восстанавливающий агент	Выход, %
—	34
Дитиотреит	51
Глутатион	49
L-Цистеин	44
L-Триптофан	36
Анилин	34
L-Адреналин	32
L-Метинин	32
NADH	31
Фенол	29

IV. Стероиды

Фундаментальная проблема установления связи между строением биологически активного соединения и его действием актуальна и в настоящее время. Решение этой задачи позволило бы использовать в качестве лекарственных препаратов как природные, так и модифицированные стероиды. Известно, что стероидные гормоны выполняют в организме ряд функций, при этом каждая из них осуществляется с участием определенного рецептора. Таким образом, изучая механизм стероид-рецепторного взаимодействия, можно выяснить, какие фрагменты стероидных молекул отвечают за ту или иную биологическую функцию. С одной стороны, это позволит использовать природные стероиды таким образом, чтобы свести к минимуму возможные побочные действия при их применении в качестве лекарственных препаратов. С другой стороны, модернизируя соответствующим образом молекулы природного стероида, можно сохранить одни его биологические функции и убрать другие.²²

Меченные тритием стероиды эстрогенного, андрогенного и анаболического действия необходимы для оценки биологических характеристик соответствующих фармакологических препаратов, использующихся при изучении процессов воспроизводства и повышения продуктивности животных. С помощью меченых аналогов стероидных гормонов исследуют различные метаболические процессы в норме и патологии, осуществляют диагностику различных заболеваний, а также определяют количественное содержание стероидов в различных биологических жидкостях.¹¹⁷ Актуальность синтеза меченых стероидов связана с использованием их природных предшественников для лечения таких заболеваний, как атеросклероз, астма, ревматизм, экзема, аллергия, полиартрит, подагра, лучевая болезнь, сахарный диабет и т.д.

Для введения метки в стероиды используются самые разнообразные методы. Рассмотрим в качестве примера методы получения меченого холестерина.

Из данных, приведенных в табл. 19–21, видно, что наиболее перспективными методами введения метки в холестерин являются дегалогенирование, твердофазный изотопный обмен, изотопный обмен с тритиевой водой.^{118–122} Успешно ввести метку в андростаны, прегнаны и ряд других стероидов можно, используя модифицированный метод Вильцбаха (см. работу¹²³). Для получения меченых стероидов можно также использовать биологические методы,¹²⁰ гидрирование и селективное гидрирование соответствующих предшественников^{124–127} в сочетании с другими химическими методами (табл. 22).^{129–133}

Дегалогенирование дает возможность получать стереоспецифично меченые стероиды. Молярные радиоактивности синтезированных этим способом [³H]холестерина, [³H]прегненолона и [³H]дегидроэпиандростерона достигают 0.37 ПБк·моль⁻¹, а ароматических 2,4-дибромстероидов — 1.1 ПБк·моль⁻¹.^{118, 120}

Таблица 19. Значения молярных радиоактивностей холестерина, полученного изотопным замещением и химическими методами.

Метод введения метки	α , ТБк·моль ⁻¹	Ссылки
С использованием атомов отдачи ⁶ Li(n, α) ³ H	0.0022	3, 4, 8, 118
Изотопное замещение:		
выдерживание вещества в атмосфере газообразного трития (метод Вильцбаха)	74.1	3, 4, 8, 118
активация процесса электроразрядом	185.2	3, 4, 8, 118
добавление носителя	0.0445	3, 4, 8, 118
микроволновое облучение	0.9207	3, 4, 8, 118
жидкофазный изотопный обмен	1.7	4
твердофазный изотопный обмен	997.3	119
изотопный обмен с тритиевой водой	218.0	121
Химические методы:		
восстановление с использованием тритидов металлов	785.2	118
дегалогенирование 7-галогенпроизводного	370.0	120
дегалогенирование 2,2-дигалогенпроизводного	1129.6	118
гидролиз 7,7-дисеро-содержащего производного	300.1	122

Таблица 20. Относительная степень изотопного обмена (a) и выходы стероидов в зависимости от продолжительности реакции.¹²¹

t , ч	Прогестерон		Эстриол		Холестерин	
	a	выход, %	a	выход, %	a	выход, %
2	48	95	22	95	27	95
4	75	90	48	85	69	85
6	97	85	81	75	84	80
10	100	70	100	60	100	65
24	98	20	95	18	95	15
50	100	10	96	10	94	10

Таблица 21. Значения молярных радиоактивностей стероидов при использовании изотопного обмена с тритиевой водой.¹²¹

Соединение	α , ПБк·моль ⁻¹
Прогестерон	0.248
Эстрадиол	0.400
Кортизол	0.218
Метиландроста-1,4-диен-17 α -ол	0.200
Метиландрост-5-ен-3 β ,17 α -диол	0.226

При использовании биологических методов, как правило, одни меченые стероиды превращаются в другие. Так, с применением ферментов коры надпочечника быка из [¹⁶-³H]прогестерона с молярной радиоактивностью 0.5 ПБк·моль⁻¹ получен [¹⁶-³H]альдостерон с молярной радиоактивностью 0.08 ПБк·моль⁻¹, а из [¹⁶-³H]кортикостерона с молярной радиоактивностью 0.14 ПБк·моль⁻¹ — [¹⁶-³H]кортизол с молярной радиоактивностью 0.07 ПБк·моль⁻¹.¹²⁰

Известно, что реакционная способность двойных связей ненасыщенных стероидных гормонов убывает в ряду 1,2 > 6,7 > 16,17 > 4,5. Изменяя условия (варьируя растворители, катализаторы и т.д.), можно провести гидрирование одной из связей и получить искомым стероид с высокой молярной радиоактивностью.^{118, 120} По-видимому, этот метод наиболее универсален для введения метки в стероиды. Так, гидрированием^{130, 133} удается синтезировать стероиды с высокой молярной радиоактивностью. В качестве примера на схемах 17 и 18 представлен синтез

Таблица 22. Значения молярных радиоактивностей меченых стероидов.

Соединение	α , ПБк · моль ⁻¹	Ссылки
<i>Жидкофазный изотопный обмен</i>		
[G- ³ H]Холестан-3 β -ол	0.0008	4
β -[G- ³ H]Ситостерин	0.0021	4
<i>Твердофазный изотопный обмен</i>		
5 α -[G- ³ H]Дигидротестостерон	0.56	120
5 α -[G- ³ H]Дигидротестостерона энантат	1.50	120
<i>Гидрирование газообразным тритием</i>		
17 α -Этинил-17 β -ацетокси-19-нор- [6,7- ³ H]андрост-4-ен-3-она оксим	1.6	128
16 α ,17 α -[1,2- ³ H]Циклопропанопрегн- 4-ен-3,20-дион	1.5	22
6 α -Метил-16 α ,17-циклогексано- [1,2- ³ H]прегна-1,4-диен-3,20-дион	1.6	22
16 α ,17 α -[3',4'- ³ H]Циклогексано-прегн- 4-ен-3,20-дион	2.0	22
16 α ,17 α -[3',4'- ³ H]Циклогексано-прегна- 1,4-диен-3,20-дион	1.5	129
16 α ,17 α -Циклогекс-3'-ено[1,2- ³ H]прегн- 4-ен-3,20-дион	1.6	129
16 α ,17 α -[1,2,3',4'- ³ H]Циклогексано-прегн- 4-ен-3,20-дион	3.2	129
5 α ,16 α ,17 α -[1,2,3',4'- ³ H]Циклогексано- прегнан-3,20-дион	3.2	129
5 β ,16 α ,17 α -[1,2,3',4'- ³ H]Циклогексано- прегнан-3,20-дион	3.2	129
3-Метилловый эфир [9,11- ³ H]эстрадиола	2.1	130
5 α -[16,17- ³ H]Андростан-3-он	1.5–1.7	14
[4,5 β - ³ H]Холестан-3-он	1.8–1.9	131
17 α -Гидроксид-[1,2- ³ H]андрост-4-ен-3-он	1.5	132
17 α -Гидроксид-5 α -[1,2,4,5- ³ H]андростан-3-он	1.9	132
18-Метил-3-метокси-[14 α ,15 α - ³ H]- эстра-1,3,5(10),8-тетраен-17 β -ола ацетат	2.1	133

17 α -этинил-19-нор[9,11-³H]тестостерона и 18-метил-17 α -этинил-17 β -гидроксид[14 α ,15 α -³H]эстр-4-ен-3-она.

Приведенные схемы хорошо иллюстрируют возможности химических подходов для получения меченых сложных соединений, которые крайне лабильны при обработке газообразным тритием в присутствии катализатора. Если для биологических исследований необходимы меченые насыщенные стероиды, то для введения метки лучше всего использовать метод твердофазного гидрирования. При этом за счет изотопного обмена возрастает молекулярная активность стероидов (табл. 23).¹²⁰

Таблица 23. Значения молярных радиоактивностей и выходы меченых стероидов при использовании твердофазного метода введения метки.¹²⁰

T, °C	τ , ч	Конечный продукт	α , ПБк · моль ⁻¹
<i>Исходное соединение — 17-гидроксиандроста-1,4,6-триен-3-он</i>			
120	5.0	Андростандиол	6.65
120	50	Андростанол	5.10
150	1.5	Андростандиол	5.55
150	1.5	Андростанол	4.5
<i>Исходное соединение — андроста-1,4,6-триен-3,17-дион</i>			
20	1.5	Андростендиол	3.10
20	1.5	Тестостерон	3.14
50	26	Андростандион	4.85
50	26	Андростандиол	6.5
50	26	Андростанолон	6.5

Для получения меченых производных природных стероидов незаменим метод селективного гидрирования.^{22, 129, 134} На схеме 19 на примере синтеза меченных тритием аналогов прогестерона показано, как с помощью этого метода, исходя из одного предшественника, можно получить несколько меченых биологически активных препаратов (см. табл. 22).¹²⁹

Селективность процесса достигается при использовании гомогенных катализаторов. Исследование кинетики показало, что гидрирование связи C(1)=C(2) происходит в 1.5–2 раза легче, чем связи C(3')=C(4'), но так как восстановление C(3')=C(4') все равно идет достаточно быстро, то уже через 1–1.5 ч реакционная смесь практически не содержала даже более устойчивого 16 α ,17 α -[1,2-³H]циклогекс-3'-енопрегн-4-ен-3,20-диона. В оптимальных условиях (время реакции 40 мин) в реакционной смеси содержалось 10–15% 16 α ,17 α -[3',4'-³H]циклогексано-прегна-1,4-диен-3,20-диона, 20–25% 16 α ,17 α -[1,2-³H]циклогекс-3'-енопрегн-4-ен-3,20-диона ([³H]ЦГЕ), 60–70% 16 α ,17 α -[1,2,3',4'-³H]циклогексано-прегн-4-ен-3,20-диона. При гидрировании 16 α ,17 α -[1,2,3',4'-³H]циклогексано-прегн-4-ен-3,20-диона в присутствии гетерогенных катализаторов были получены еще два меченых стероида — 5 α ,16 α ,17 α -[1,2,3,4'-³H]циклогексано-прегнан-3,20-дион и 5 β ,16 α ,17 α -[1,2,3',4'-³H]циклогексано-прегнан-3,20-дион.

Об использовании меченых реагентов, например боротритидов металлов, уже упоминалось выше (см. табл. 19). Реакциями с этими реагентами, а также с меченым тритием иодистым метилом и его производными, получены такие меченые стероиды как [4-³H]- и [16-³H]холестерины, 1 α ,3 β -дигидроксид-(20S)-[4-³H]-(3-гидроксид-3-метилбутилокси)-прегна-5,7-диен, 1 α ,25-дигидроксид-22-оксавитамин D₃ и ряд других соединений.^{3, 4, 118, 120, 135} Недостатком этого метода является то, что молярные радиоактивности полученных

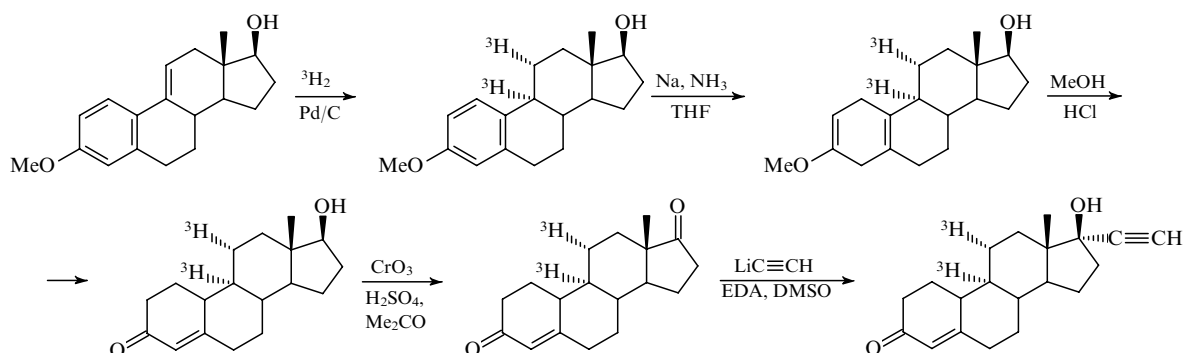
Схема 17

Схема 18

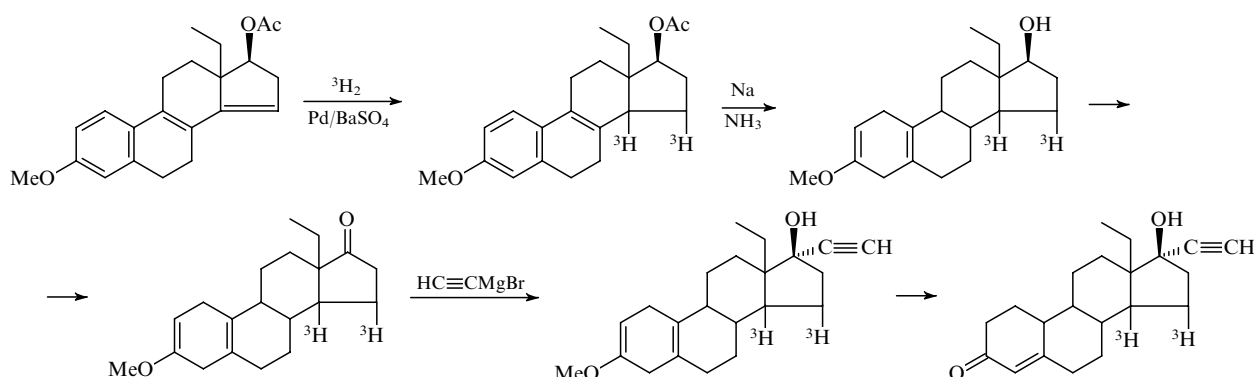
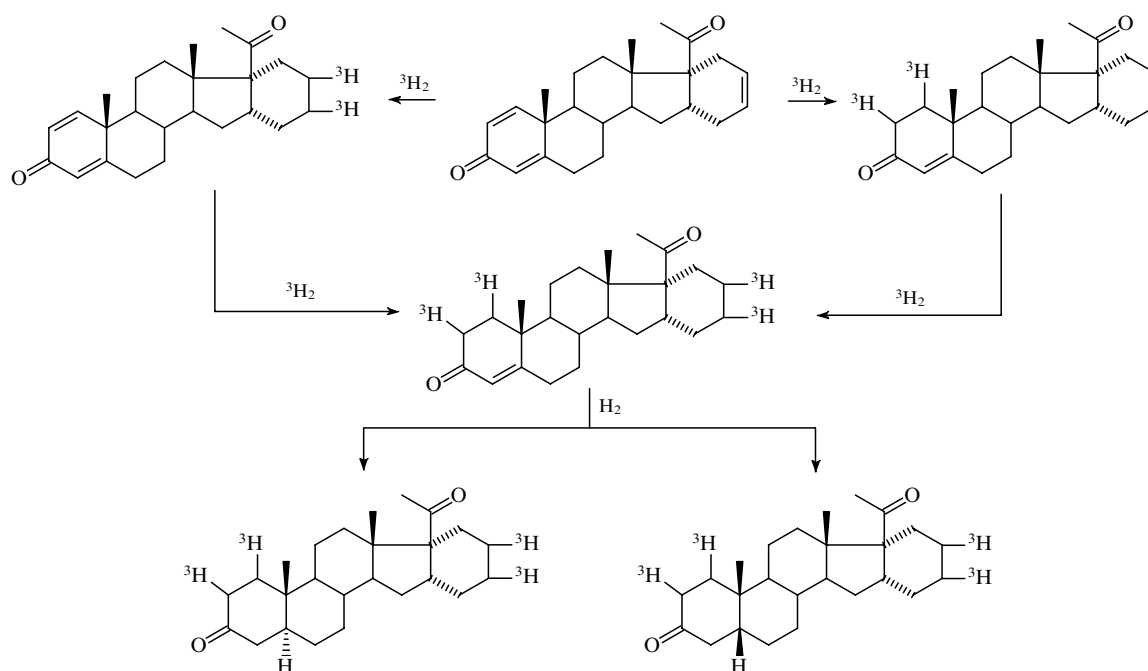


Схема 19



препаратов определяются молярными радиоактивностями меченых реагентов, которые не всегда достаточны для проведения биологических исследований. Очевидно, что для получения необходимых меченых препаратов можно использовать немеченые реагенты и меченый стероид-предшественник, проводя реакции конденсации, окисления, гидролиза, ацетилирования или восстановления.^{3, 136}

Авторы работ^{22, 129}, осуществив синтез набора меченых 16 α ,17 α -циклоалкано- и 16 α ,17 α -циклоалкенозамещенных прогестеронов с разным размером дополнительного цикла D', впервые провели прямые исследования их взаимодействия с рецептором прогестерона. Стероид-рецепторное связывание изучали с использованием меченых 16 α ,17 α -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона ($[^3\text{H}]$ ЦГА), 16 α ,17 α -циклопропанопрегн-4-ен-3,20-диона ($[^3\text{H}]$ ЦПА) и белков растворимой части гомогената матки крысы, которые ответственны за рецепцию прогестерона. Для оценки взаимодействия ЦПА и ЦГА с рецептором прогестерона и другими белками матки крысы применяли метод перекрестного ингибиторного анализа по вытеснению меченого лиганда из белковых комплексов немечеными стероидами. Значения относительной конкурентной активности (ОКА), рассчитывали по соотношению концентраций немеченых соединений, вызывающих 50%-ное ингибирование специфического связывания меченого лиганда (табл. 24).

Показано, что в растворимой части гомогената матки крысы рецептором прогестерона является белок, специфически связывающий ЦГА и ЦПА с достаточно близко совпадающими параметрами конкурентного связывания. Та же закономерность наблюдалась и при использовании $[^3\text{H}]$ ЦГЕ. Оказалось, что ЦГЕ связывается белком, идентичным рецептору прогестерона, и что других специфических участков его связывания в растворимой фракции матки крысы нет. Данный вывод подтвержден анализом ингибирования ЦГЕ-связывания $[^3\text{H}]$ прогестерона. Отмечено отсутствие метаболических превращений меченых стероидов во время биоло-

Таблица 24. Значения ОКА производных прогестерона, рассчитанные по вытеснению меченых лигандов из комплексов с рецептором прогестерона из растворимой фракции матки беременных крыс.

Меченый лиганд	Немеченый конкурент	ОКА ^a
$[^3\text{H}]$ Прогестерон	ЦПА	1.02
	ЦГА	0.79
$[^3\text{H}]$ ЦПА	ЦПА	0.99
	ЦГА	0.57
$[^3\text{H}]$ ЦГА	ЦПА	1.57
	ЦГА	1.00

^a За единицу принята активность прогестерона.

гических экспериментов. Не обнаружено также существенных различий в характере взаимодействия $[^3\text{H}]\text{ЦГЕ}$ и $[^3\text{H}]\text{прогестерона}$ с рецептором, выделенным из клеток разных животных. Интересно, что ЦГЕ (один из представителей этого класса стероидов) при системном введении проявлял более высокую по отношению к действию прогестерона активность в тесте сохранения беременности и сравнительно низкую — в тесте пролиферации эндометрия.¹³⁷ Приведенные примеры иллюстрируют возможности получения с помощью меченых препаратов стероидных гормонов с разделенными биологическими функциями относительно прогестеронной активности.

В. Заключение

В настоящем обзоре описаны методы введения тритиевой метки в разнообразные биологически активные соединения. Достижения в области радиохимических исследований позволили решить многочисленные задачи при изучении процессов, определяющих жизнедеятельность клеток и организма в целом. Но дальнейший прогресс в медицине и биологии несомненно потребует разработки новых и совершенствования известных методов получения меченых соединений. Так, в настоящее время проводятся исследования влияния микромодификаций молекул различных стероидов. Это необходимо для создания нового поколения лекарственных препаратов со строго специфическими свойствами, не оказывающих нежелательных побочных действий.¹³⁸ Разрабатываются новые подходы к модифицированию оксипиринов и полиеновых жирных кислот для выяснения связи между структурой и функцией этих соединений, так как использование природных оксипиринов в качестве лекарств сильно ограничивается широтой их фармакологического действия и быстрым метаболизмом.¹⁰⁶ Осуществлен синтез производных полиненасыщенных кислот (например, дикарбоновых кислот), необходимых для изучения фермент-субстратного связывания 15-липоксигеназ млекопитающих. Это необходимо для продолжения исследования в таких областях, как гастроэнтерология, кардиология, ангиология, онкология.^{139, 140} Синтезируются целые серии фунгицидов, иммунодепрессантов, соединений, оказывающих сильное воздействие на центральную нервную систему, феромонов и т.д., имеющих иногда экзотическое строение.^{141–143}

Наряду с этим предпринимаются усилия для поиска новых подходов к получению тритийсодержащих препаратов. Например, разрабатываются методы получения новых катализаторов, новых меченых реагентов, являющихся фрагментами биологически активных соединений или источниками радиоактивной метки, отрабатываются методики ферментативного синтеза меченых оксипиринов с использованием органических растворителей.^{144–147} Уже получены данные о большей стабильности ферментов, функционирующих в составе мицелл, что повышает эффективность синтеза этих меченых препаратов.¹⁴⁸

Литература

- Э.В.Дятловицкая, В.В.Безуглов. *Биохимия*, **63**, 3 (1998)
- Г.В.Сидоров, Н.Ф.Мясоедов. *Успехи химии*, **68**, 254 (1999)
- E.A.Evans. *Tritium and its Compounds*. Butterworth Publishers, London, 1974
- V.P.Shevchenko, N.F.Myasoedov. In *Isotopes in the Physical and Biochemical Sciences. Vol. 1. (Labelled Compounds, Pt. A)*. (Eds E.Buncel, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1987. P. 237
- V.P.Shevchenko, N.F.Myasoedov. In *Isotopes in the Physical and Biochemical Sciences. Vol. 1. (Labelled Compounds, Pt. B)*. (Eds E.Buncel, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1991. P. 179
- V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **27**, 1195 (1989)
- A.V.Filikov, N.F.Myasoedov. *J. Catal.*, **130**, 569 (1991)
- N.F.Myasoedov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **33**, 391 (1993)
- Е. В. Ласкателев. Дис. канд. хим. наук. ИНЭОС РАН, Москва, 1997
- В.П.Шевченко. В кн. *II Всесоюз. совещ. по проблеме "Физиологически активные соединения, меченные радиоактивными изотопами"*. (Тез. докл.). Звенигород, 1988. С. 35
- V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov, A.Susan. In *The Sixth International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds (ISSAILC6)*. (Abstracts of Reports). Philadelphia, PA, 1997. P. 73
- Ю.А.Борисов, Ю.А.Золотарев, Е.В.Ласкателев, Н.Ф.Мясоедов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1852 (1996)
- Ю.А.Борисов, Ю.А.Золотарев, Е.В.Ласкателев, Н.Ф.Мясоедов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 428 (1997)
- В.П.Шевченко, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **31** (5), 75 (1989)
- В.П.Шевченко, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **31** (3), 95 (1989)
- В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, Д.В.Куклев, А.Б.Имбс, Н.А.Латышев, В.В.Безуглов. *Радиохимия*, **31** (6), 119 (1989)
- Д.В.Куклев, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.А.Латышев, В.В.Безуглов. *Биоорг. химия*, **17**, 1574 (1991)
- V.P.Shevchenko, G.I.Myagkova, T.Yu.Lazurkina, P.M.Dyomin, S.I.Shram, D.A.Zabolotsky, I.Yu.Nagaev, Yu.Yu.Belosludtsev, R.P.Evstigneeva, N.F.Myasoedov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **27**, 1177 (1989)
- И.Ю.Нагаев, В.П.Шевченко, И.В.Ивлева, Г.И.Мягкова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 263 (1995)
- J.W.Coe, C.R.Hawes, P.Towers. In *The 5th International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labeled Compounds. (Abstracts of Reports)*. Strasbourg, 1994. P. 127
- U.Pleiss, U.Rosentreter, J.Stoltefuss, O.Behner. In *The Sixth International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds (ISSAILC6)*. (Abstracts of Reports). Philadelphia, PA, 1997. P. 71
- А.В.Камерницкий, И.С.Левина, Л.Е.Куликова, Т.Н.Галахова, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, А.Н.Смирнов, Е.В.Покровская, Т.А.Щелкунова. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1532 (1997)
- Г.С.Когтева, В.В.Безуглов. *Биохимия*, **63**, 6 (1998)
- R.Grabe, C.Sumida, E.A.Nunez. *J. Lipid Med. Cell Sign.*, **9**, 91 (1994)
- S.D.Clark, D.B.Jump. *Prog. Lipid Res.*, **32**, 139 (1993)
- M.Haurigui, G.Vallett, M.E.Martin, C.Sumida, C.Benassayag, E.A.Nunez. *Steroids*, **59**, 46 (1994)
- J.F.Mead. *J. Lipid Res.*, **25**, 1517 (1984)
- В. П. Шевченко. Дис. канд. хим. наук. ИМГ АН СССР, Москва, 1981
- В. П. Шевченко. Дис. д-ра хим. наук. ИМГ РАН, Москва, 1992
- Д.В.Куклев, В.Г.Рыбин, А.Б.Имбс, В.В.Безуглов. *Биоорг. химия*, **19**, 1122 (1993)
- Е.Д.Матвеева, А.Л.Курц, Ю.Г.Бундель. *Успехи химии*, **55**, 1198 (1986)
- G.D.Prestwich. In *Isotopes in the Physical and Biochemical Sciences. Vol. 1. (Labelled Compounds, Pt. B)*. (Eds E.Buncel, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1991. P. 137
- В.П.Шевченко, С.В.Фараджеева, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **40**, 84 (1998)
- С.В.Фараджеева. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 1990
- В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. В кн. *Всерос. конф. "50 лет производства и применения изотопов в России"*. (Тез. докл.). Обнинск, 1998. С. 33
- B.Devadas, S.P.Adams, J.I.Gordon. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **29**, 157 (1991)
- К.Н.Семенов, В.В.Бурнашева, Н.А.Яковлева, Е.А.Ганич. *Изв. АН. Сер. хим.*, 214 (1998)
- A.R.Ubbelode. *J. Chem. Soc.*, 1143 (1950)
- T.R.Gibb. In *Progress in Inorganic Chemistry*. Interscience, London; New York, 1962. P. 315
- S.Tanaka, A.Yashiro, H.Tasaki, Y.Nakashima. *Lipids*, **33**, 385 (1998)
- В.Ди Марцо. *Биохимия*, **63**, 16 (1998)
- T.Elbert. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **27**, 107 (1989)

43. R.D.Schmid, R.Verger. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **37**, 1608 (1998)
44. T.Sugiura, S.Kondo, A.Sukagawa, S.Nakane, A.Shinoda, K.Iton, A.Yamashita, K.Waku. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89 (1995)
45. S.Munro, K.L.Thomas, M.Abu-Shaar. *Nature (London)*, **365**, 61 (1993)
46. R.Mechoulam, S.Ben-Shabat, L.Hanus, M.Ligumsky, N.E.Kaminski, A.R.Schatz, A.Gopher, S.Almog, B.R.Martin, D.R.Compton, R.G.Pertwee, G.Griffin, M.Bayewitch, J.Barg, Z.Vogel. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83 (1995)
47. S.Maurelli, T.Bisogno, L.De Petrocellis, A.Di Luccia, G.Marino, V.Di Marzo. *FEBS Lett.*, **377**, 82 (1995)
48. E.Fride, T.Bisogno, V.Di Marzo, M.Bayewitch, Z.Vogel, R.Mechoulam. In *Abstract Book of the Society for Neuroscience Annual Meeting*. New Orleans, 1997. P. 25
49. E.Di Tomaso, M.Beltramo, D.Piomelli. *Nature (London)*, **382**, 677 (1996)
50. В.А.Ткачук. *Биохимия*, **63**, 47 (1998)
51. В.И.Куликов, Г.И.Музя. *Биохимия*, **63**, 57 (1998)
52. Н.В.Проказова, Н.Д.Звездина, А.А.Коротаева. *Биохимия*, **63**, 38 (1998)
53. A.Tokumura, T.Tsutsumi, Y.Nishioka, H.Tsukatani. *Chem. Phys. Lipids*, **86**, 75 (1997)
54. U.H.Do, Y.Hong, P.Tam, P.Srinivasan. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **38**, 117 (1996)
55. L.Binaglia, G.Alunni-Bistocchi, M.Oriando, P.Orlando, G.Rosa, R.Trenta. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **29**, 95 (1991)
56. V.P.Shevchenko, M.L.Tsirenina, J.G.Molotkovsky, L.D.Bergelson. *Chem. Phys. Lipids*, **15**, 95 (1975)
57. Z.I.Terashita, S.Tsushima, Y.Yoshioka, H.Nomura, Y. Inada, K.Nishikawa. *Life Sci.*, **32**, 1975 (1983)
58. S.D.Shukla, D.J.Hanahan. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 626 (1983)
59. S.D.Shukla. *Lipids*, **26**, 1028 (1991)
60. W.A.Devane, L.Hanus, A.Breuer, R.G.Pertwee, L.A.Stevenson, G.Griffin, D.Gibson, A.Mandelbaum, A.Etinger, R.Mechoulam. *Science*, **258**, 1946 (1992)
61. E.Fride, R.Mechoulam. *Eur. J. Pharmacol.*, **231**, 313 (1993)
62. J.N.Crawley, R.L.Corwin, J.K.Robinson, C.C.Felder, W.A.Devane. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **46**, 967 (1993)
63. P.B.Smith, D.R.Compton, S.P.Welch, R.K.Razdan, R.Mechoulam, B.R.Martin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 219 (1994)
64. Z.Vogel, J.Barg, R.Levy, D.Saya, E.Heldman, R.Mechoulam. *J. Neurochem.*, **61**, 352 (1993)
65. C.C.Felder, E.M.Briley, J.Axelrod, J.T.Simpson, K.Mackie, W.A.Devane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7656 (1993)
66. S.R.Childers, T.Sexton, M.B.Roy. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 711 (1994)
67. K.Makie, W.A.Devane, B.Hille. *Mol. Pharmacol.*, **44**, 498 (1993)
68. L.Hanus, A.Gopher, S.Almog, R.Mechoulam. *J. Med. Chem.*, **36**, 3032 (1993)
69. J.Priller, E.M.Briley, J.Mansouri, W.A.Devane, K.Mackie, C.C.Felder. *Mol. Pharmacol.*, **48**, 288 (1995)
70. D.G.Deutsch, S.A.Chin. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 791 (1993)
71. K.K.Kruszhka, R.W.Gross. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14345 (1994)
72. W.A.Devane, J.Axelrod. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6698 (1994)
73. V.Di Marzo, A.Fontana, H.Cadas, S.Schinelli, G.Cimino, J.-C.Schwartz, D.Piomelli. *Nature (London)*, **372**, 686 (1994)
74. N.Ueda, K.Yamamoto, S.Yamamoto, T.Tokunaga, E.Shirakawa, H.Shinkai, M.Ogawa, T.Sato, I.Kudo, K. Inoue, H.Takizawa, T.Nagano, M.Hirobe, N.Matsuki, H.Saito. *Biochim. Biophys. Acta*, **1254**, 127 (1995)
75. М.Ю.Бобров, Г.С.Когтева, Е.В.Фомина-Агеева, Г.Н.Зинченко, Н.М.Грецкая, Д.В.Куклев, В.В.Безуглов. В кн. *Модифицированные жирные кислоты N-6- и N-3-семеиств. Медикобиологические, биохимические и биотехнологические аспекты. (Тез. докл.)*. Владивосток, 1995. С. 19
76. A.J.Hampson, W.A.Hill, M.Zan-Phillips, A.Makriyannis, E.Leung, R.M.Eglen, L.M.Bornheim. *Biochim. Biophys. Acta*, **1259**, 173 (1995)
77. F.Desarnaud, H.Cadas, D.Piomelli. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6030 (1995)
78. С.И.Рогов, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов, В.В.Безуглов, М.Ю.Бобров, В.М.Федосеев. *Радиохимия*, **39**, 458 (1997)
79. H.W.Cook, W.E.M.Lands. *Can. J. Biochem.*, **53**, 1220 (1975)
80. C.P.A.Van Os, G.P.M.Rijke-Schilder, H.van Halbeek, J.Verhagen, J.F.G.Vliegthart. *Biochim. Biophys. Acta*, **663**, 177 (1981)
81. R.T.Holman, P.O.Egwim, W.W.Christie. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1149 (1969)
82. Э.В.Дятловицкая. *Биохимия*, **63**, 67 (1998)
83. A.H.Merrill, S.Nimkar Jr, D.Menaldino, Y.A.Hannun, C.Loomis, R.M.Bell, S.R.Tyagi, J.D.Lambeth, V.L.Stevens, R.Hunter, D.C.Liotta. *Biochemistry*, **28**, 3138 (1989)
84. R.T.Dobrowsky, M.H.Werner, A.M.Castellino, M.V.Chao, Y.A.Hannun. *Science*, **265**, 1596 (1994)
85. T.Okazaki, A.Bielawska, R.M.Bell, Y.A.Hannun. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15823 (1990)
86. A.Bielawska, C.M.Linardic, Y.A.Hannun. *FEBS Lett.*, **307**, 211 (1992)
87. L.Riboni, A.Prinetti, R.Bassi, A.Caminiti, G.Tettamanti. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26868 (1995)
88. R.Olshefski, B.Taylor, A.Heitger, A.Hasegawa, S.Ladisch. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 47 (1996)
89. L.Ji, G.Zhang, S.Uematsu, Y.Akahori, Y.Hirabayashi. *FEBS Lett.*, **358**, 211 (1995)
90. R.T.Dobrowsky, C.Kamibayashi, M.C.Mumby, Y.A.Hannun. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15523 (1993)
91. R.A.Wolff, R.T.Dobrowsky, A.Bielawska, L.M.Obeid, Y.A.Hannun. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19605 (1994)
92. J.Y.Lee, Y.A.Hannun, L.M.Obeid. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13169 (1996)
93. M.E.Venable, A.Bielawska, L.M.Obeid. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24800 (1996)
94. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, А.В.Потапова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 265 (1995)
95. R.Birk, G.Brenner-Weib, A.Giannis, K.Sandhoff, R.R.Schmidt. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **29**, 289 (1991)
96. T.Toyokuni, M.Nisar, B.Dean, S.Hakomori. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **29**, 567 (1991)
97. И.А.Михайленко, О.В.Корепапова, Н.В.Проказова. *Биол. мембраны*, **12**, 82 (1995)
98. L.D.Bergelson, A.G.Bukrinskaya, N.V.Prokazova, G.I.Shaposhnikova, S.L.Kocharov, V.P.Shevchenko, G.V.Kornilaeva, E.V.Fomina-Ageeva. *Eur. J. Biochem.*, **128**, 467 (1982)
99. И.В.Иванов, Н.В.Гроза, Д.М.Кочев, Г.И.Мягкова. *Биоорг. химия*, **24**, 83 (1998)
100. C.N.Serhan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**, 1 (1994)
101. C.R.Pace-Asciak. *Gen. Pharmacol.*, **24**, 805 (1993)
102. П.М.Демин, Г.И.Мягкова, Р.П.Евстигнеева. *Биоорг. химия*, **17**, 900 (1991)
103. С.Д.Варфоломеев, А.Т.Мевх. *Простагландины — низкомолекулярные биорегуляторы*. Изд-во МГУ, Москва, 1985
104. Г.Н.Петрухина, В.А.Макаров. *Биохимия*, **63**, 111 (1998)
105. S.Sugiura, S.Kurozumi. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **38**, 129 (1996)
106. В.В.Безуглов. Дис. д-ра хим. наук. ИБХ им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, 1997
107. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **33**, 172 (1992)
108. V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov, A.Guy, T.Durand, A.Vidal, J.-P.Vidal, J.-C.Rossi, V.V.Bezuglov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, (1999) (in the press)
109. M.Garcia, T.Durand, J.-C.Rossi, S.Zarini, M.Bolla, G.Folco, P.Wheelan, A.Sala. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, **7**, 105 (1997)
110. A.Guy, T.Durand, J.-P.Vidal, J.-C.Rossi. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 1543 (1997)
111. S.I.Shram, T.Yu.Lazurkina, V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **41**, 741 (1998)
112. С.И.Шрам. Дис. канд. биол. наук. ИМГ РАН, Москва, 1995
113. S.I.Shram, T.Yu.Lazurkina, V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **34**, 359 (1994)
114. И.В.Ивлева, В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **35**, 99 (1993)

115. И.В.Ивлева, В.П.Шевченко, С.И.Шрам, И.Ю.Нагаев, Т.Ю.Лазуркина, Г.И.Мягкова, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **37**, 258 (1995)
116. Г.Ф.Судьина, О.К.Мирзоева, И.А.Щукин, В.Е.Шевченко, Р.С.Ворисова, Г.И.Мягкова, С.Д.Варфоломеев. *Биохимия*, **56**, 1113 (1991)
117. А.Г.Резников. *Методы определения гормонов*. Наукова думка, Киев, 1982
118. M.Cambell. In *Isotopes in the Physical and Biochemical Sciences. Vol. 1. (Labelled Compounds. Pt. B)*. (Eds E.Buncel, J.R.Jones). Elsevier, New York, 1991. P. 71
119. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **35**, 106 (1993)
120. В.Н.Крамеров. Дис. канд. хим. наук. НПО ГИПХ, Ленинград, 1987
121. N.F.Myasoedov, G.V.Sidorov, V.N.Kramerov, V.I.Mishin. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, (1999) (in the press)
122. U.Pleiss. In *Proceedings of the Third International Symposium "Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds". (Abstracts of Reports)*. (Eds T.A.Baillie, J.R.Jones). Innsbruck, 1988. P. 521
123. G.Z.Tang, C.T.Peng. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **25**, 585 (1988)
124. C.S.Markos, C.R.Dorn, D.J.Zitzewitz. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **25**, 515 (1988)
125. M.D.Meyer, G.L.Carson, D.O.Toft. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **24**, 171 (1987)
126. P.A.McCarthy. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **28**, 1149 (1990)
127. C.K.Acosta, J.W.Cessac, P.N.Rao, H.K.Kim. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **28**, 1201 (1990)
128. X.Zhao, M.Zhou, G.Wang, Q.Peng. In *Proceedings of the Third International Symposium "Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds". (Abstracts of Reports)*. (Eds T.A.Baillie, J.R.Jones). Innsbruck, 1988. P. 553
129. V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, A.V.Potapova, N.F.Myasoedov, A.V.Kamernitsky, I.S.Levina, L.E.Kulikova, A.N.Smirnov. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **41**, 919 (1998)
130. H.Parnes, E.J.Shelton. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **29**, 1157 (1991)
131. J.P.DiBattista, F.X.Webster. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **38**, 1083 (1996)
132. A.Kasal, K.Fuksova, V.Pouzar. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **57**, 2166 (1992)
133. H.Wagner, J.Romer. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **25**, 645 (1988)
134. E.J.Corey, H.Niwa, J.Knolle. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 1942 (1978)
135. H.Watanabe, M.Akiyama, T.Kawanishi, N.Kubodera. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **36**, 645 (1995)
136. Л.Н.Каклюшкина. В кн. *Химия и технология изотопов и меченых соединений*. ГИПХ, Ленинград, 1984. С. 3
137. А.В.Камерницкий, И.С.Левина. *Хим.-фармацевт. журн.*, **25** (10), 4 (1991)
138. V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov, A.V.Kamernitsky, I.S.Levina, L.E.Kulikova, E.V.Pokrovskaya, T.A.Shchelkunova, A.N.Smirnov. *Bioorg. Chem.*, **27**, 207 (1999)
139. И.В.Иванов, Н.В.Гроза, Х.Кюн, Г.И.Мягкова. *Биоорг. химия*, **24**, 454 (1998)
140. Н.В.Гроза, И.В.Иванов, Г.И.Мягкова. *Биоорг. химия*, **24**, 458 (1998)
141. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **41**, 80 (1999)
142. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, **41**, 82 (1999)
143. В.П.Шевченко, И.Ю.Нагаев, Н.Ф.Мясоедов. *Радиохимия*, (1999) (в печати)
144. J.R.Jones, S.-Y.Lu. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **41**, 1024 (1998)
145. J.-C.Cintrat, B.Rousseau. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **41**, 1029 (1998)
146. A.Y.L.Shu, W.Chen, J.R.Heys. *J. Organomet. Chem.*, **524**, 87 (1996)
147. W.Chen, K.T.Garnes, S.H.Levinson, D.Saunders, S.G.Senderoff, A.Y.L.Shu, A.J.Villani, J.R.Heys. *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **39**, 291 (1998)
148. С.И.Шрам, Т.Ю.Лазуркина, Н.Ф.Мясоедов. *Докл. АН*, **359**, 758 (1998)

METHODS FOR THE SYNTHESIS OF TRITIUM LABELLED FATTY ACIDS AND THEIR DERIVATIVES, OXYLIPINS AND STEROIDS

V.P.Shevchenko, I.Yu.Nagaev, N.F.Myasoedov

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences

46, Pl. Kurchatova, 123182 Moscow, Russian Federation, Fax + 7(095)196-0221

Advances in the synthesis of tritium labelled oxylipins, steroids, fatty acids, phospho- and sphingo-lipids, and other classes of lipids are discussed. The topicality of these studies is demonstrated by examples of using labelled preparations for the solution of several modern problems of biochemistry, biology and pharmacology.

Bibliography — 148 references.

Received 13th May 1999