



УДК 577.175.859.01:546.11*3

СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ПРОСТАГЛАНДИНА E₁
И ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ С ТРОМБОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

Шевченко В. П., Нагаев И. Ю., Вржещ П. В. *,
Ершов Д. Э. *, Зайцев С. В. *, Варфоломеев С. Д. *,
Мясоедов Н. Ф.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва;
* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Разработан метод, позволяющий получить [5,6-³H₂]PGE₁ с выходом до 35% и молярной радиоактивностью 1,7–1,8 ТБк/ммоль. Установлено, что связывание полученного [5,6-³H₂]PGE₁ с нативными тромбоцитами специфическое, насыщаемое, обратимое и характеризуется малыми (~10⁻⁹ М) наблюдаемыми значениями констант диссоциации для высокоаффинных центров, коррелирует с ингибированием вызванной АДФ агрегации тромбоцитов и может быть отнесено к рецепторному связыванию. Найдено, что специфическое связывание 10±2 молекул PGE₁ с одним тромбоцитом приводит к 50% ингибированию агрегации, вызванной АДФ.

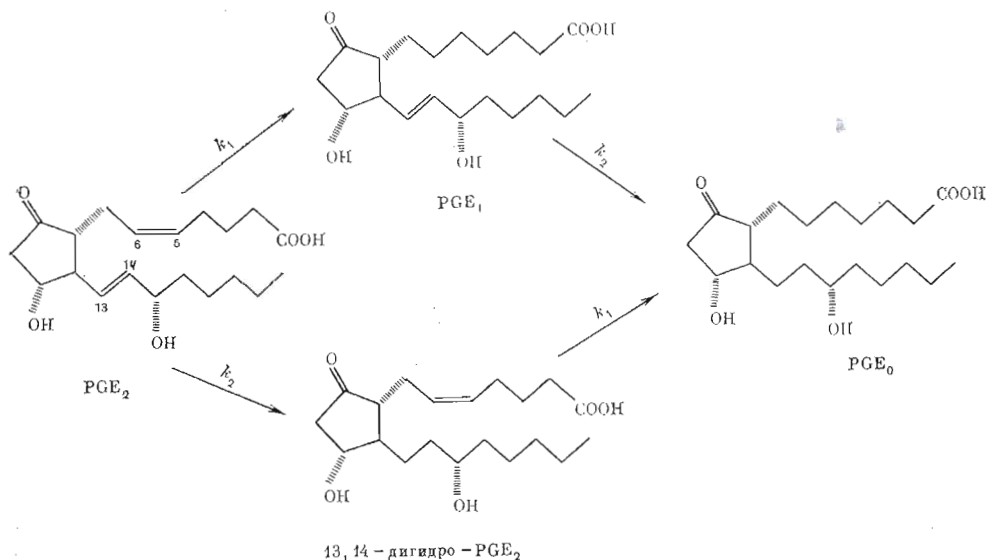
Простагландин E₁ (PGE₁) играет важную роль в регуляции метаболизма, синтезируется во многих органах и тканях и обладает высокой биологической активностью. По ряду физиологических свойств PGE₁ близок к простаглицлину — в частности, PGE₁ проявляет антиагрегантную и сосудорасширяющую активность [1].

Показано [2–4], что при связывании с тромбоцитами PGE₁ является агонистом простаглицлина и может служить лигандом для определения свойств рецепторов этого неустойчивого в водных растворах соединения. PGE₁ также рассматривают в качестве противотромботического средства, концентрацию которого в крови можно регулировать путем изменения содержания дигомо-γ-линоленовой кислоты в пище [1].

В настоящей работе описан синтез меченного тритием PGE₁. Определена биологическая активность препарата [³H]PGE₁ по ингибированию агрегации тромбоцитов человека, вызванной АДФ. С помощью [³H]PGE₁ проведено исследование специфического связывания PGE₁ с нативными тромбоцитами.

Наиболее простым методом получения высокомеченого PGE₁ является селективное гидрирование тритием C₅=C₆-связи в PGE₂ [5, 6]. Так, при использовании в качестве катализатора 5% Pd/C [5] был получен [5,6-³H₂]PGE₁ с молярной радиоактивностью 1,8 ТБк/ммоль, но выход искомого продукта не превышал 6%. Последнее обстоятельство предопределило большой интерес к поискам более совершенных методик. Поэтому первая часть статьи посвящена изучению процессов, происходящих при введении трития в PGE₂ в присутствии гетерогенных катализаторов.

Реакция гидрирования PGE₂ (без учета *цис-транс*-изомеризации и миграции двойных связей) может быть представлена в виде следующей схемы:



При изучении влияния природы катализатора на селективность восстановления двойной 5,6-связи в PGE₂ использовались активные катализаторы гидрирования (5% Pr/BaSO₄, 10% Pd/C, 5% Rh/C, 5% Pt/C — группа I), катализаторы, пассивированные диацетатом свинца (катализаторы Линдлара — группа II), а также катализаторы на основе меди и никеля (5% Ni/CaCO₃, 5% Cu/CaCO₃, LaNi₄Cu — группа III). При этом оказалось, что катализаторы группы I (давление против-третичной смеси 400 гПа, растворитель — диоксан, время реакции 3—180 мин) гидрировали PGE₂ с большой скоростью. Так, уже через 3 мин в реакционной смеси с катализаторами 10% Pd/C или 5% Pt/C оставалось 12% PGE₂, а с катализатором 5% Rh/C — всего 4% PGE₂. Несколько медленнее гидрирование протекало в присутствии 5% Pd/BaSO₄ (рис. 1а), но и в этом случае восстановление PGE₂ до PGE₁ происходило неселективно.

В присутствии катализаторов группы III гидрирование PGE₂ вообще не осуществлялось. Наиболее интересные результаты были получены при использовании катализаторов группы II (табл. 1) [7]. В качестве объекта исследования использовалась смесь PGE₂ с [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15-³H₇]PGE₂ (37 МБк на 10 мг простагландина), а гидрирование проводили водородом.

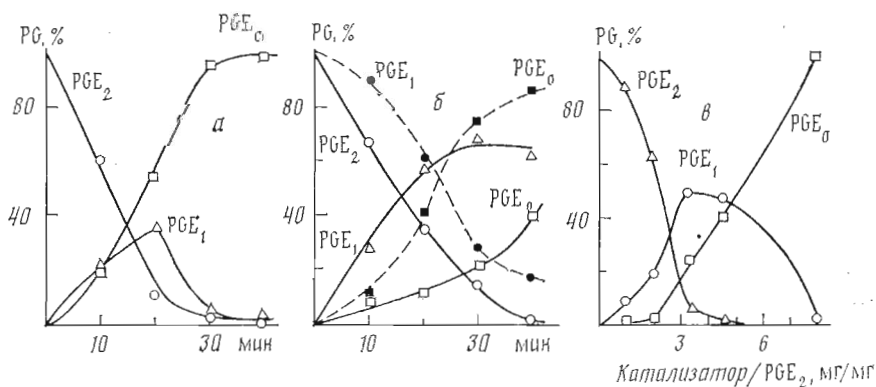


Рис. 1. Продукты восстановления PGE противем (анализ в виде бромфенацетатов на хроматографе «Милихром»): а — PGE₂, катализатор — 5% Pd/BaSO₄, растворитель — диоксан; б — PGE₁ (штриховые линии), PGE₂ (сплошные линии), катализатор Линдлара, этилацетат; в — зависимость выхода продуктов восстановления PGE₂ от соотношения катализатор — PGE₂, катализатор Линдлара, этилацетат, время реакции 40 мин

Таблица 1

Зависимость соотношения продуктов реакции при селективном гидрировании PGE_2 от качества катализатора Линдлара *

Соединение	Катализатор			
	А	Б	В	Г
PGE_2	50	62	92	22
PGE_1	39	33	5	67
PGE_0	11	5	3	11

* Условия реакции: растворитель — этилацетат, давление водорода 400 гПа, время реакции 30 мин. В качестве катализаторов использовали 5% $Pd/BaSO_4$ производства СССР (А), ФРГ (Б), Швейцарии (В), обработанные по методу Линдлара [7], а также коммерческий катализатор Линдлара (Fluka) (Г). Здесь и в табл. 2 приведено распределение радиоактивности (% от суммарной) вдоль аналитических пластинок при ТСХ на аргентированном силикагеле.

Таблица 2

Зависимость соотношения продуктов реакции при селективном гидрировании PGE_2 от природы растворителя *

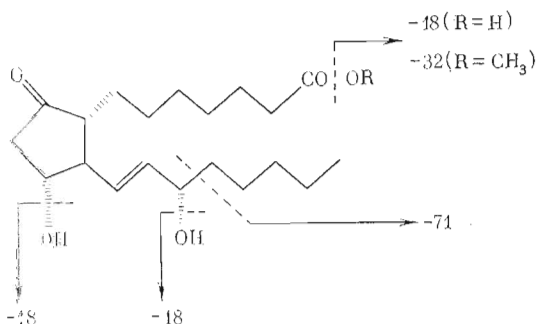
Соединение	Растворитель					
	бензол	метанол	хлороформ	диоксан	ацетон	этилацетат
PGE_2	45	79	67	74	43	28
PGE_1	43	17	23	24	48	52
PGE_0	8	4	10	2	9	20

* Условия реакции: катализатор Линдлара (Fluka), давление водорода 400 гПа, время реакции 30 мин.

Наибольший выход PGE_1 (табл. 1, 2) получен при использовании катализатора Линдлара (Fluka) и этилацетата в качестве растворителя. При использовании других растворителей (ацетона, бензола, диоксана, хлороформа и метанола) наблюдалось уменьшение выхода PGE_1 (табл. 2).

Кинетические исследования были проведены в этилацетате в присутствии катализатора Линдлара (рис. 1б) и в диоксане в присутствии 5% $Pd/BaSO_4$ (рис. 1а). При этом, как видно из приведенных данных, наибольший выход продуктов, содержащих одну восстановленную двойную связь, при использовании катализатора Линдлара наблюдался через 30–40 мин, а при использовании 5% $Pd/BaSO_4$ — через 20 мин. Изучение зависимости выхода PGE_1 от соотношения простагландин — катализатор показало, что лучший результат получен при соотношении 1 : 3 (рис. 1в).

Разделение реакционных смесей проводили методом ВЭЖХ (рис. 2а). Для более детального изучения состава выделенных фракций содержащиеся в них простагландины метилировали диазометаном и вновь анализировали методом ВЭЖХ (см., например, рис. 2б). Анализ продуктов, восстановленных дейтерием в аналогичных условиях и разделенных как описано выше, осуществлялся методами масс-спектрометрии (табл. 3, 4) и ПМР (табл. 5). Полученные соединения имели в масс-спектрах характерные пики, обусловленные отщеплением H_2O , C_5H_{11} , $OSCH_3$ или CH_3OH в различной последовательности:



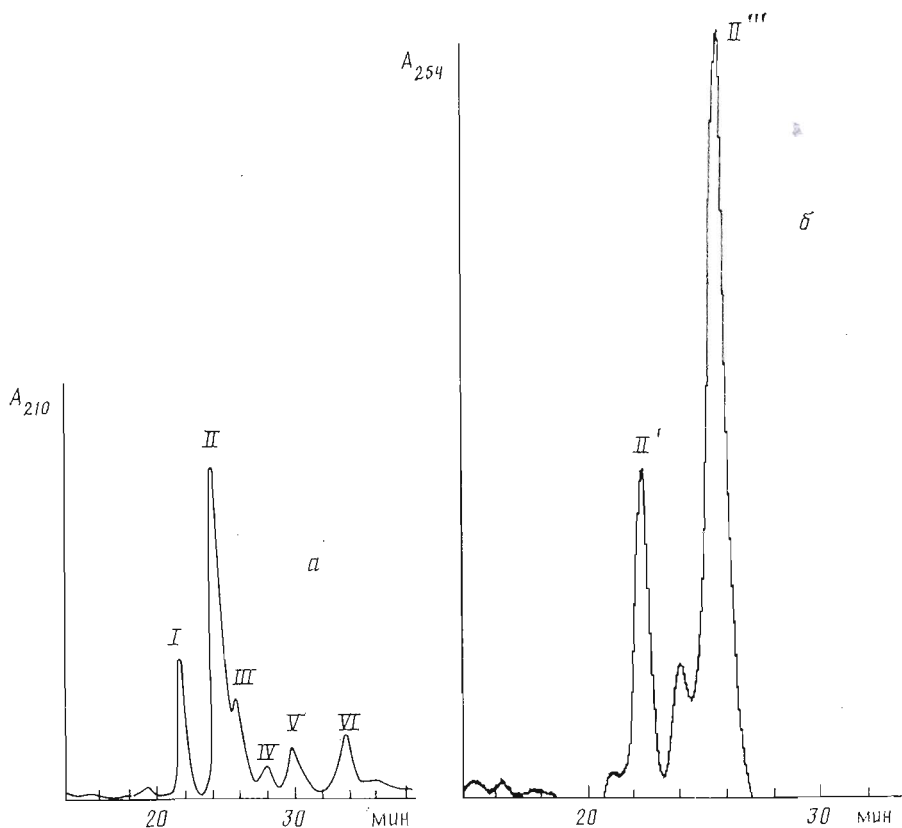


Рис. 2. Анализ продуктов восстановления PGE_2 дейтерием в виде свободных кислот (а) и фракции II в виде метиловых эфиров (б) на хроматографе Gilson (Франция). Условия восстановления: этилацетат, катализатор Линдлара, 40 мин, соотношение катализатор — PGE_2 3 : 1. II' — 5,6-транс- PGE_2 , II'' — 13,14- $^2\text{H}_2$ дигидро- PGE_2 , катализатор — PGE_2 3 : 1. I — PGE_2 , II''' — PGE_1 , IV — PGE_0

Приведенные исследования позволили идентифицировать основные продукты, образующиеся при восстановлении PGE_2 (фракции I—VI, рис. 2а, б). Фракция I содержала исходный PGE_2 , фракция II — смесь транс-изомера PGE_2 (II'), 13,14-дигидро- PGE_2 (II'') и PGE_1 (II''') (см. рис. 2б), IV — PGE_0 , VI — смесь 13,14-дигидро-15-кето- PGE_2 и 15-кето- PGE_0 , III и V — низкомолекулярные соединения не простагландиновой природы.

При математической обработке полученных кинетических данных использовали уравнения первого порядка для описания каждой стадии восстановления. При этом принималось допущение, что значения константы скорости реакции гидрирования двойной 5,6-связи PGE_2 и 13,14-дигидро- PGE_2 равны k_1 , а значения константы скорости гидрирования двойной 13,14-связи PGE_2 и PGE_1 равны k_2 . Очевидно, что выход PGE_1 природного строения зависит от соотношения величин констант k_1 и k_2 .

При использовании активных катализаторов группы I существенных различий в константах скоростей k_1 и k_2 не наблюдалось, что приводило к низким выходам искомого PGE_1 . Так, при использовании 5% Pd/BaSO_4 (рис. 1а) получены значения $k_1=0,14\pm 0,02 \text{ мин}^{-1}$ и $k_2=0,15\pm 0,03 \text{ мин}^{-1}$. Максимальный выход искомого продукта (PGE_1) в этом случае составлял лишь 18—19% (суммарный выход изомеров ~37%).

На катализаторах Линдлара восстановление двойной 5,6-связи в PGE_2 проходило более селективно. В оптимальных условиях (рис. 1б) значения k_1 и k_2 оказались равными $0,06\pm 0,01$ и $0,03\pm 0,006 \text{ мин}^{-1}$ соответственно. При этом выход PGE_1 в максимуме кинетической кривой составил 35% при содержании изомерных продуктов ~14%, что хорошо коррелировало с расчетными данными (38 и 15% соответственно).

Масс-спектры дейтерированных продуктов, полученных при разделении ВЭЖХ восстановленного PGE₂ (I, %)

Фракции рис. 2а	Соединение	M _T	M-107	M-89	M-54	M-36	M-18
—	PGE ₁ (стандарт)	354	100	44	11	16	6
I	PGE ₂	352	88	28	16	10	14
II	[² H ₂]PGE ₁	356	100	32	10	18	12
IV	[² H ₄]PGE ₀	360	100	6	3	3	3
VI	Смесь 13,14-[² H]дигидро-15-кето-PGE ₂ и [² H ₃]15-кето-PGE ₀	354 358	24 30	— —	— —	54 50	100 44

Таблица 4

Масс-спектры индивидуальных метиловых эфиров дейтерированных простагландинов, выделенных из фракции II (рис. 2б) (I, %)

Метилловый эфир PG	M _T	M-121	M-103	M-89	M-71	M-67	M-62	M-49	M-36	M-18
PGE ₁ (стандарт)	368	90	12	100	16	14	5	8	11	10
[5,6- ² H ₂]PGE ₁ (II ^{'''})	370	100	19	94	22	42	12	20	28	22
13,14-[² H ₂]-дигидро-PGE ₂ (II ^{''})	370	74	20	100	—	66	11	46	56	34

Таблица 5

Параметры спектров ПМР метиловых эфиров дейтерированных простагландинов, выделенных из фракции II (рис. 2б)
Растворитель — C²HCl₃

Метилловый эфир	—C ₁₃ H=C ₁₁ H—		—C ₆ H=C ₆ H—	
	δ, м. д.	W _{1/2} [*] , Гц	δ, м. д.	W _{1/2} , Гц
PGE ₁	5,64	15	—	—
5,6- <i>транс</i> -PGE ₂ (II')	5,63	15	5,33	15
13,14-[² H ₂]-дигидро-PGE ₂ (II'')	—	—	5,35	12
[5,6- ² H ₂]PGE ₁ (II''')	5,63	17	—	—

* Сигналы олефиновых протонов простагландинов представляли собой слабо разрешенные мультиплеты, по полуширине (W_{1/2}) которых делали вывод о конфигурации двойной связи [8].

Таким образом, в результате проведенных исследований найдены условия получения PGE₁ с выходом до 35%. При использовании различных изотопов водорода в ряду протий, дейтерий, тритий скорость реакции гидрирования заметно снижалась, в то время как селективность процесса практически не менялась (рис. 3). При этом выход PGE₁ (в расчете на вступивший в реакцию PGE₂) составил 52, 55, 49% соответственно, а соотношение PGE₂ и продуктов восстановления изменялось от 0,04 для протия, 0,25 для дейтерия до 1,78 для трития.

При использовании 80% трития получен [5,6-³H₂]PGE₁ с выходом 30–35% и молярной радиоактивностью 1,7–1,8 ТБк/ммоль. Меченный тритием PGE₁ после отделения примесей *транс*-изомера PGE₂ и 13,14-дигидро-PGE₂ хроматографией на аргентированном силикагеле [9] и очистки методом ВЭЖХ имел радиохимическую чистоту 95–97%.

Полученный продукт [5,6-³H₂]PGE₁ был использован в исследованиях по определению количественной взаимосвязи между специфическим связыванием PGE₁ с нативными тромбоцитами и его биологическим эффектом, определяемым как степень ингибирования агрегации тромбоцитов. В настоящее время принято считать, что связывание агониста с рецепто-

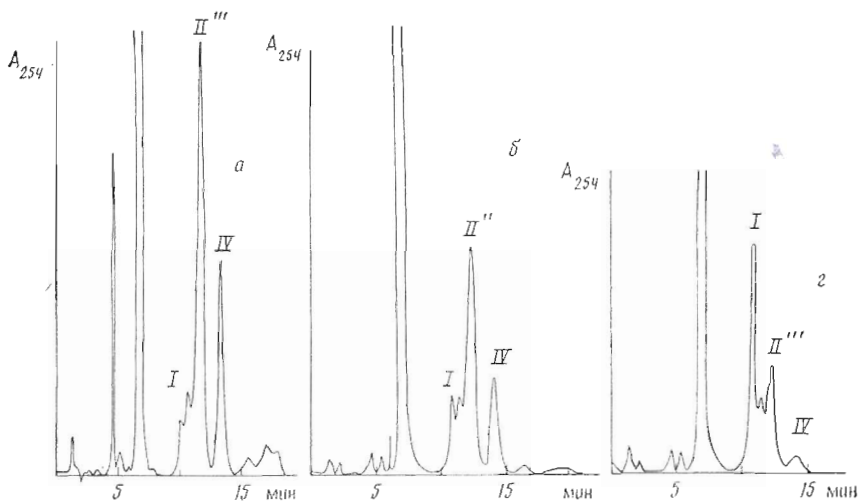


Рис. 3. Анализ продуктов восстановления PGE_2 противом (а), дейтерием (б) и 80% тритием (в) в виде бромфенациловых эфиров на хроматографе «Милхром» (СССР). Условия восстановления: этилацетат, катализатор Линдлара, 40 мин, соотношение катализатор — PGE_2 3 : 1. I — PGE_2 , II''' — PGE_1 , IV — PGE_0

рами простаглицлина/ PGE_1 увеличивает активность аденилатциклазы, приводя к повышению уровня внутриклеточного cAMP, что в свою очередь приводит к ингибированию агрегации тромбоцитов [2, 3]. Рецепция — это первый, ингибирование агрегации — последний этап в экспериментально наблюдаемой сложной биохимической цепочке проявления биологического действия PGE_1 . Представляется интересным выяснить, какие характеристики рецепторов существенны для проявления биологического ответа PGE_1 .

Связывание [$^3\text{H}_2$] PGE_1 и агрегацию тромбоцитов исследовали на одном и том же свежесыведенном препарате плазмы, богатой тромбоцитами. Для определения специфического связывания PGE_1 тромбоцитами человека наиболее предпочтителен метод, основанный на микроцентрифугировании инкубационной смеси, позволяющий достаточно быстро разделять свободный и связанный радиолиганд [2]. Для того чтобы избежать включения в осадок большого количества плазмы, содержащей свободный радиолиганд, мы проводили микроцентрифугирование с использованием плотного раствора сахаразы по аналогии с методикой [10]. Для обеспечения счета радиоактивности в гомогенном режиме осадок тромбоцитов солибилизировали 1% раствором додецилсульфата натрия. Солюбилизация клеток происходила быстро и была полной, присутствие додецилсульфата натрия в диоксановой сквинтиляционной смеси не вызывало понижения эффективности счета тритиевой метки. Разработанный метод определения связывания [$^3\text{H}_2$] PGE_1 с тромбоцитами обладает высокой чувствительностью (связывание молекулы [$^3\text{H}_2$] PGE_1 с тромбоцитом в условиях нашего эксперимента эквивалентно увеличению радиоактивности пробы на 10–12 рас./мин) и воспроизводимостью (стандартное квадратичное отклонение в определении общего связывания не превышало 5%).

Было исследовано связывание [$^3\text{H}_2$] PGE_1 с тромбоцитами около 20 человек одной возрастной категории. На рис. 4 представлены данные по кинетике ассоциации и диссоциации комплекса [$^3\text{H}_2$] PGE_1 с тромбоцитами. Достижение максимального и не изменяющегося во времени специфического связывания и быстрая диссоциация связанного с тромбоцитами радиолганда после добавления избытка немеченого PGE_1 свидетельствует о том, что связывание [$^3\text{H}_2$] PGE_1 со специфическими центрами на поверхности тромбоцитов имеет обратимый характер.

На рис. 5 представлены данные по равновесному комплексообразованию [$^3\text{H}_2$] PGE_1 с тромбоцитами. Неспецифическое связывание в наших

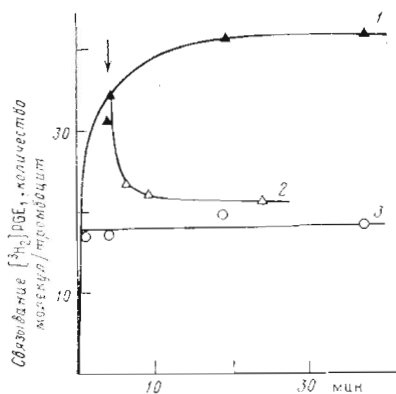


Рис. 4

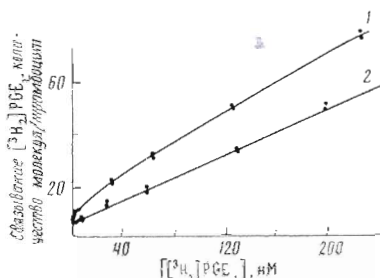


Рис. 5

Рис. 4. Кинетика ассоциации и диссоциации комплекса $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ с тромбоцитами. 250 000 тромбоцитов/мкл, концентрация $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ 30 нМ. 1 — общее связывание, 2 — связывание после добавления к среде инкубации немеченого PGE_1 (конечная концентрация 40 мкМ), момент добавления показан стрелкой, 3 — неспецифическое связывание в присутствии 40 мкМ немеченого PGE_1

Рис. 5. Равновесное комплексообразование $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ с тромбоцитами. 310 000 тромбоцитов/мкл. Время инкубации 30 мин. 1 — общее связывание, 2 — неспецифическое связывание в присутствии 40 мкМ немеченого PGE_1

экспериментах всегда имело вид строго линейной зависимости от концентрации радиолиганда, что позволяет при вычислении специфического связывания ($B_{\text{сн}}$) использовать не точечные значения неспецифического связывания, а его линейную интерполяцию. Специфическое связывание (определяемое как разница между общим и неспецифическим связыванием) для случая, показанного на рис. 5, не линеаризуется в координатах Скэтчарда [11] (рис. 6) и может быть представлено как результат связывания $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ двумя независимыми центрами. Сплошная линия на рис. 6 — это представление в координатах Скэтчарда теоретических значений связывания радиолиганда с двумя центрами связывания — высокоаффинным с константой диссоциации 2 нМ и концентрацией мест связывания в расчете на один тромбоцит 3,7 и низкоаффинным с константой диссоциации 320 нМ и концентрацией мест связывания — 19. Экспериментальные данные анализировали с использованием программы обработки результатов эксперимента по связыванию лигандов в системах с независимыми центрами связывания [ДЕЛЬТА] [11].

Изучение равновесного комплексообразования $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ со свежely выделенными тромбоцитами показало, что специфическое связывание насыщаемо, однако характер экспериментально наблюдаемой зависимости специфического связывания от концентрации радиолиганда разный для тромбоцитов разных индивидуумов. В большинстве случаев зависимость специфического связывания от концентрации $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ соответствовала представлениям о существовании двух независимых центров связывания (см. рис. 6), в ряде случаев зависимость в координатах Скэтчарда была линейной, что указывало на существование одного центра связывания. Полученные в результате математической обработки параметры связывания $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ существенно различались для тромбоцитов разных индивидуумов. Представляется вполне вероятным, что экспериментально наблюдаемый одноцентровый характер связывания для ряда индивидуумов вызван такими изменениями параметров связывания, когда проявление одного из центров маскируется экспериментальной ошибкой. Литературные данные по определению параметров связывания простациклина и PGE_1 на нативных тромбоцитах и их мембранах также отличаются большим разбросом значений констант диссоциации и концентрации мест связывания [2].

Биологическую активность препарата $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ определяли как спо-

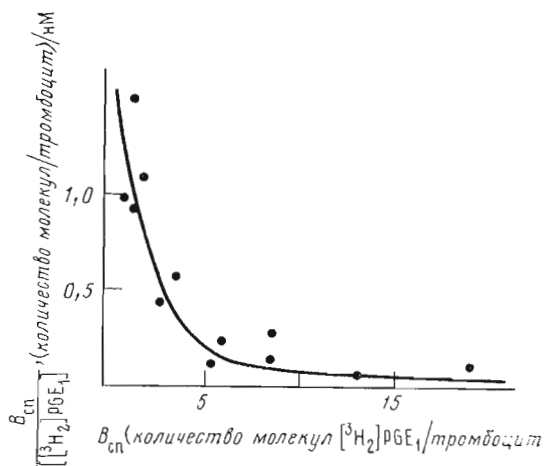


Рис. 6. Представление данных по равновесному специфическому комплексообразованию (рис. 5) в координатах Скэтчарда

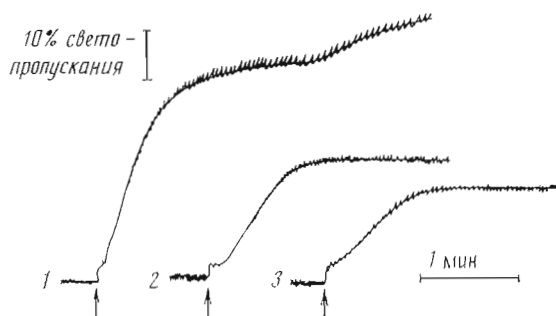


Рис. 7. Агрегация тромбоцитов под действием ADP. 1 — без добавок, 2 — 5-минутная инкубация с 14 нМ $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ до добавления ADP, 3 — 5-минутная инкубация с 37 нМ PGE_1 до добавления ADP. Стрелками показан момент добавления ADP

способность ингибировать агрегацию тромбоцитов, вызванную ADP (рис. 7). В присутствии как меченого, так и немеченого препаратов PGE_1 уменьшается как начальная скорость агрегации, так и степень агрегации тромбоцитов, при концентрации простагландина >300 нМ агрегация полностью прекращается. По характеру ингибирования агрегации тромбоцитов препарат $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ соответствует своему немеченому аналогу.

Определяемые из количественных зависимостей скорости и степени агрегации тромбоцитов от концентрации PGE_1 значения IC_{50} (концентрации PGE_1 , при которой наблюдается 50% ингибирование агрегации) различны для тромбоцитов разных индивидуумов; в наших экспериментах значения IC_{50} изменялись в пределах 17–100 нМ PGE_1 . Проводя одновременно эксперименты по определению специфического связывания $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$ и ингибированию агрегации тромбоцитов под действием PGE_1 , определяли величину $\text{B}(\text{IC}_{50})$ — число молекул $[^3\text{H}_2]\text{PGE}_1$, специфически связавшихся с одним тромбоцитом при концентрации PGE_1 , равной IC_{50} . $\text{B}(\text{IC}_{50})$ численно равна числу мест связывания PGE_1 на тромбоците, заселение которых приводит к 50% ингибированию агрегации тромбоцитов. На рис. 8 представлена зависимость $\text{B}(\text{IC}_{50})$ от IC_{50} , определенная как для скорости агрегации, так и для степени агрегации тромбоцитов. Оказалось, что величина $\text{B}(\text{IC}_{50})$ довольно постоянна для тромбоцитов разных индивидуумов (ее значение 10 ± 2 молекул $\text{PGE}_1/\text{тромбоцит}$) на фоне значительного разброса значений IC_{50} (рис. 8) и параметров свя-

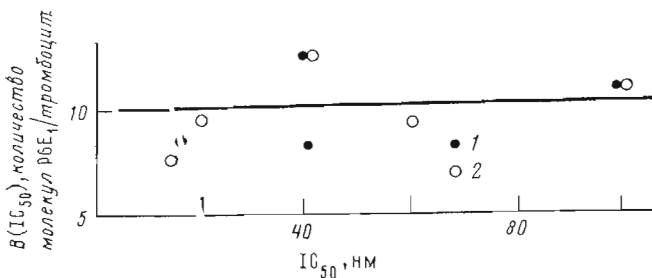


Рис. 8. Зависимость $V(IC_{50})$ от IC_{50} для PGE_1 , определенная для скорости агрегации (1) и степени агрегации (2).
Объяснения в тексте

звания (константы диссоциации для комплекса высокоаффинного центра и $[^3H_2]PGE_1$ изменялись от 0,6 до 16 нМ, для некоторых индивидуумов связывание соответствовало одноцентровой модели).

Тот факт, что 50% ингибирование агрегации тромбоцитов у разных индивидуумов наблюдается при связывании одного и того же количества PGE_1 , свидетельствует о том, что количественные характеристики послерецепторного участка в механизме ингибирования агрегации тромбоцитов (активация аденилатциклазы и чувствительность агрегации к внутриклеточному cAMP) консервативны и мало различаются для тромбоцитов разных индивидуумов. По-видимому, определение значений величины $V(IC_{50})$ может иметь диагностическую значимость, так как изменение значений этой величины должно прямо свидетельствовать об изменении свойств внутриклеточного участка PGE_1 -зависимого ингибирования агрегации тромбоцитов.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам НИИ неврологии АМН СССР Э. А. Суслиной и В. Г. Высоцкой за консультации и помощь в работе.

Экспериментальная часть

В качестве катализаторов использовали 5% Pd/BaSO₄, 10% Pd/C, 5% Rh/C, 5% Pt/C; 5% Pd/BaSO₄, обработанный 5% раствором диацетата свинца по методу Линдлара [7]; коммерческий катализатор Линдлара (Fluka) (Г); 5% Ni/CaCO₃, 5% Cu/CaCO₃, LaNi₃Cu. Очистку растворителей проводили по стандартным методикам.

Масс-спектры низкого разрешения снимали на масс-спектрометре CN-5 (Varian, ФРГ) с использованием прямого ввода образца в ионный источник при температуре ионизационной камеры 250° С, ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре испарения 70–100° С (интенсивности определяли в области 240–370 m/z). ПМР-спектры регистрировали на спектрометре WM-500 Bruker в дейтерохлороформе.

Бромфенациловые эфиры простагландинов получали следующим образом: к 5–50 мкг анализируемой смеси, упаренной досуха, добавляли четырехкратный избыток *n*-бромфенацилбромида (0,5% раствор в ацетоне), двукратный мольный избыток триэтиламина (0,5% раствор в ацетоне) и смесь выдерживали ~2 ч при 20° С. Выход эфиров 85–90%.

Для анализа реакционных смесей использовали отечественный хроматограф «Милхром», оснащенный колонкой размером 2×60 мм, фаза Nucleosil-5 C₁₈, элюент – ацетонитрил – вода, 55 : 45; коэффициенты удерживания для бромфенациловых эфиров PGE_2 , PGE_1 , PGE_0 равны 7,00; 8,40; 9,60 соответственно.

Препаративное разделение (до 4 мг) реакционной смеси осуществляли на жидкостном хроматографе Gilson, оснащенный колонкой размером 4,6×250 мм, фаза Serwachrom Octadecyl Si 100, 10 мкм; элюент – ацетонитрил – вода – уксусная кислота, 33 : 67 : 0,1, скорость элюции 1 мл/мин. Коэффициенты удерживания для PGE_2 , PGE_1 , PGE_0 равны 6,26; 7,13 и 8,33 соответственно. Для отделения PGE_1 от изомерных продуктов полученную смесь II (рис. 2а) метилировали диазометаном и хроматографировали на той же колонке в системе ацетонитрил – вода, 40 : 60 (рис. 2б). Коэффициенты удерживания для метиловых эфиров 5,6-*транс*- PGE_2 , 13,14-дигидро- PGE_2 и PGE_1 равны 6,49; 7,05 и 7,55 соответственно.

Препаративную ТСХ проводили в системе хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода, 95 : 7,5 : 1,0 : 0,6, на пластинках (13×18 см) с закрепленным слоем силикагеля Kieselgel-5 с 10% гипса, импрегнированным 12% раствором нитрата серебра. Аналитическую ТСХ осуществляли на пластинках с силифолом УФ-254, непо-

средственно перед использованием импрегнированных однократным пропусканием 12% раствора нитрата серебра с последующим высушиванием теплым воздухом в течение 5 мин.

Гидрирование 0,1% тритием и дейтерием проводили по методу [12].

Гидрирование 80% тритием проводили следующим образом. В реакционную ампулу помещали 5 мг PGE₂, 15 мг катализатора Линдлара, 1,0 мл этилацетата. Реакционную смесь замораживали жидким азотом, вакуумировали до давления $1 \cdot 10^{-3}$ гПа и заполняли газообразным тритием (давление 400 гПа). Ампулу размораживали и реакционную смесь перемешивали 40 мин. Затем ампулу вновь замораживали жидким азотом и удаляли избыточный тритий. Лабильный тритий удаляли трехкратным упариванием раствора продуктов реакции с 5 мл метанола при пониженном давлении. [5,6-³H₂]PGE₁ (выход 27%, молярная радиоактивность 1,8 ТБк/ммошь) очищали как описано выше. Радиохимическая чистота препарата 95–97%.

Эксперименты по связыванию [³H₂]PGE₁ тромбоцитами и ингибированию агрегации тромбоцитов, вызванной ADP, проводили с использованием препаратов плазмы, богатой тромбоцитами, выделенных центрифугированием (15 мин при 200g) свежеполученной цельной крови практически здоровых мужчин 45–55 лет (антикоагулянт – 0,38% цитрат натрия). Все эксперименты заканчивали в течение 4 ч с момента получения крови. Подсчет тромбоцитов проводили в камере Горяева по стандартной методике.

Инкубацию плазмы, богатой тромбоцитами, с меченым PGE₁ проводили в полипропиленовой пробирке при 37°С при непрерывном легком вибрировании. Состав инкубационной смеси общего объема 0,45 мл: 0,4 мл плазмы, богатой тромбоцитами, [³H₂]PGE₁ (0,5–200 нМ), PGE₁ (0 или 40 мкМ). Растворы препаратов PGE₁ готовили с использованием раствора Тироде: 137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 11,9 мМ NaHCO₃, 0,417 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4 (37°С).

Количество радиоактивно меченного лиганда, связавшегося с клетками, определяли по радиоактивности осадка тромбоцитов, полученного центрифугированием (2 мин при 8000g) аликвот инкубационной смеси (150 мкл) через 1 мл раствора сахарозы (200 г/л в растворе Тироде, pH 7,4; 0°С). Осадок тромбоцитов солиоблизировали в 1 мл 1% додецилсульфата натрия в сцинтилляционном флаконе, добавляли 15 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 и определяли радиоактивность с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark-III. Эффективность счета в применяемой нами сцинтилляционной смеси, определенная с применением высшего стандарта, равна 36%.

Общесвязывание определяли по количеству [³H₂]PGE₁, связавшегося с тромбоцитами, в отсутствие немеченого PGE₁ в инкубационной смеси; неспецифическое связывание определяли по количеству [³H₂]PGE₁, связавшегося с тромбоцитами в присутствии избытка немеченого PGE₁ (40 мкМ); специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием [13].

Связывание выражали в количестве молекул [³H₂]PGE₁, связавшихся с одним тромбоцитом:

$$B = \frac{AN_A}{kan},$$

где B – связывание (количество молекул [³H₂]PGE₁/тромбоцит), A – радиоактивность осадка тромбоцитов (расп./мин), N_A – число Авогадро ($6,02 \cdot 10^{23}$ молекул/ммошь), k – коэффициент пересчета (60 расп./мин/Бк), a – молярная радиоактивность меченого PGE₁ (Бк/ммошь), n – количество тромбоцитов в анализируемой аликвоте инкубационной смеси (шт).

Агрегация тромбоцитов определяли с помощью сконструированного в МГУ агрегометра ЛС-1. Регистрировали увеличение светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами, после добавления индуктора агрегации ADP до конечной концентрации 20 мкМ. Скорость перемешивания 1200 об/мин, температура 37°С, длина волны падающего светового потока 650 нм. При калибровке прибора за 100% принимали разницу в светопропускании плазмы, богатой тромбоцитами, и плазмы, лишенной тромбоцитов (центрифугированием при 1000g, 10 мин) [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Проблемы и гипотезы в учении о свертывании крови. /Ред. Гаврилов О. К. М.: Медицина, 1981. С. 93.
2. Siegl A. M. // Meth. Enzymol. 1982. V. 86. P. 179–192.
3. Shafer A. I., Coper B., O'Hara D., Hadlin R. I. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 8. P. 2914–2917.
4. Lombroso M., Nicosia S., Paoletti R., Whittle B. J. R., Monkada S., Vane J. R. // Prostaglandins. 1984. V. 27. № 2. P. 321–333.
5. Samuelsson B. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. № 12. P. 4091–4096.
6. Koch G. K., Dalenberg J. W. // J. Label. Compounds. 1970. V. 6. № 4. P. 395–398.
7. Lindlar H. // Helv. chim. acta. 1952. V. 35. P. 446–450.
8. Азрем А. А., Королева Е. В. // Изв. АН БССР. 1978. № 6. С. 103–118.
9. Шевченко В. П., Мясоходов Н. Ф., Безуглов В. В., Бергельсон Л. Д. // Химия природы соединений. 1980. № 2. С. 148–157.
10. Measurement of Platelet Function/Eds Harker L. A., Zimmerman T. S. Edinburgh, Melbourne, New York, London: Churchill Livingstone, 1983. P. 241.

11. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Варфоломеев С. Д. // Современные проблемы биокинетики/Ред. Варфоломеев С. Д. М.: Изд-во МГУ, 1987. С. 198-254.
12. Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф., Бергельсон Л. Д. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 730-734.
13. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М.: Изд-во МГУ, 1982.

Поступила в редакцию
22.VI.1987
После доработки
8.I.1988

**SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED PROSTAGLANDIN E₁
AND ITS USE AS A RADIOLIGAND IN STUDYING PGE₁ BINDING
TO HUMAN PLATELETS**

**SHEVCHENKO V. P., NAGAYEV I. Yu., VRZHESHCH P. V. *, ERSHOV D. E. *,
ZAITSEV S. V. *, VARFOLOMEEV S. D. *, MYASOEDOV N. F.**

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR;
Moscow; * M. V. Lomonosov Moscow State University*

A method has been developed that makes it possible to obtain [5,6-³H₂]PGE₁ with a yield of 35% and a molar radioactivity of 1,7-1,8 TBq/mmol. The binding of [5,6-³H₂]PGE₁ to native platelets proved to be specific, saturating and reversible. It is characterized by low values ($\sim 10^{-9}$ M) of dissociation constants for high-affinity sites, correlates with the inhibition of ADP-induced aggregation of platelets and can be considered as receptor binding. Specific binding of 10 ± 2 molecules of PGE₁ with one platelet was found to cause 50% inhibition of the ADP-induced aggregation.