



УДК 541.124:546.11.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ТВЕРДОФАЗНОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА ВОДОРОДА В ДАЛАРГИНЕ

© 2000 г. Ю. А. Золотарев[#], А. К. Дадаян, Б. В. Васьковский*, Н. В. Кост**, С. К. Гаранин*, В. П. Макаренкова**, Н. Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2;

**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;*

***НЦ психического здоровья РАМН*

Поступила в редакцию 01.02.2000 г. Принята к печати 15.03.2000 г.

Реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) водорода на тритий при температуре 150°C получен [³H]даларгин с молярной радиоактивностью 52 Ки/ммоль. Меченный тритием пептид полностью сохранил биологическую активность, которую оценивали по способности связываться с опиоидными рецепторами (ОР) головного мозга крыс. Определена величина константы диссоциации комплексов даларгина с ОР, составляющая 4.3 нМ. Для этого пептида была определена зависимость химического выхода и молярной радиоактивности от длительности и температуры реакции ВТКИО. Рассчитана энергия активации реакции ВТКИО для пептида, составляющая 32 ккал/моль. Аминокислотным анализом [³H]даларгина получены данные по распределению изотопной метки в аминокислотных остатках пептида. При реакции ВТКИО тритиевая метка включается во все аминокислотные остатки пептида, причем с ростом температуры, наряду со значительным увеличением общего включения трития, увеличивается доля активности, находящейся в ароматических остатках.

Ключевые слова: энкефалины; даларгин; изотопный обмен водорода; спилловер водорода; рецепторы опиоидные.

ВВЕДЕНИЕ

Меченные тритием биологически активные пептиды являются эффективным инструментом для исследования лиганд-рецепторных взаимодействий. Коммерчески доступные [³H]пептиды получают, как правило, жидкофазным каталитическим гидрогенолизом газообразным тритием пептидов, содержащих диидотирозиновые остатки [1, 2]. К недостатку этой реакции можно отнести то, что с ее помощью можно ввести метку только в пептиды, содержащие в своей структуре тирозиновые остатки. Другой подход к получению [³H]пептидов и [³H]белков состоит в использовании реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) водорода на тритий [3, 4]. Твердое органическое соединение в этой реакции взаимодействует со спилловер-водородом (СВ)¹ [5], образовавшемся на катализаторе. Реакцию проводят при температуре 100–180°C в

отсутствие растворителя, при этом изотопный обмен не сопровождается рацемизацией. Механизм этой реакции предполагает образование в переходном состоянии карбониевых ионов, приход и уход водородных атомов в которых происходит с сохранением конфигурации асимметрических углеродных атомов [6]. Ранее [7] была исследована способность к обмену водорода при ВТКИО и с помощью ³H-ЯМР получены данные о влиянии электронного строения аминокислот на этот процесс. В данном сообщении исследована относительная реакционная способность аминокислотных остатков в даларгине и влияние физико-химических условий реакции ВТКИО на величину молярной радиоактивности получаемых препаратов.

Даларгин (DALG, Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg), синтетический аналог эндогенного опиоидного пептида [Leu⁵]энкефалина (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), является лекарственным препаратом, используемым в гастроэнтерологии. Кроме того показано, что DALG способен вызывать иммуномодулирующий, анксиолитический и ряд других биологических эффектов [8, 9]. Для оптимизации терапевтического эффекта DALG необходимо изучение его фармакокинетики и взаимодействия с опиоидными рецепторами (ОР) клеток-мишеней. Инструментом для таких исследований мог бы быть меченный тритием DALG, сохраняющий биологические свойства исходного пептида.

Известно, что аффинность DALG к ОР δ-типа, определяемая по ингибированию электрически

Сокращения: ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; ОР – опиоидные рецепторы; СВ – спилловер-водород; DALG – даларгин, Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg; DADLE – [D-Ala², D-Leu⁵]энкефалин; PPA – радиорецепторный анализ.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 196-02-13; факс: +7(095) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru).

¹ В гетерогенном катализе спилловером (от англ. spillover – перетекать) называют миграцию активных частиц, сорбированных или образованных на одной фазе, на другую фазу, которая в данных условиях не сорбирует или не образует эти частицы.

стимулированного сокращения семьявыводящего протока мыши, ниже, чем у [Leu⁵]энкефалина и выше, чем у [Met⁵]энкефалина. А сродство к ОР μ - и κ -типа, тестированное на препарате подвздошной кишки морской свинки, несколько выше, чем у энкефалинов [10]. Поэтому сохранение биологической активности [³H]DALG, полученного реакцией ВТКИО, оценивали по его способности связываться с ОР головного мозга крыс. В качестве препарата сравнения использовали [³H]DADLE (Enkephalin (2-*D*-alanine-5-*D*-leucine), [tyrosil-3,5-³H(N)], catalog number NET648), синтезированный фирмой NEN, который широко используется в практике радиорецепторных исследований как лиганд ОР δ -типа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ вытеснения меченых лигандов немеченым DALG показал, что эффективная концентрация DALG, при которой наблюдается 50% вытеснение (EC_{50}) 5 нМ [³H]DALG, составляет 6.6 нМ, что свидетельствует об идентичности характеристик связывания меченого и немеченого пептидов с рецепторами. EC_{50} DALG при вытеснении 5 нМ [³H]DADLE равна 11.7 нМ.

Для изучения характеристик связывания исследуемого соединения с ОР был проведен сравнительный анализ взаимодействия [³H]DALG и [³H]DADLE с мембранной фракцией головного мозга крыс (рис. 1). Из рисунка видно, что взаимодействие обоих меченых лигандов с рецепторами с высокой степенью достоверности описывается параллельными прямыми, причем константы диссоциации (K_d), определяемые по наклону этих прямых, составляют 4.3 нМ, что свидетельствует о том, что оба лиганда связываются с одним и тем же типом ОР и соответствуют литературным данным о взаимодействии ряда *D*-Ala²-замещенных аналогов [Leu⁵]энкефалина с ОР δ -типа [11].

Таким образом, сравнительный анализ взаимодействия [³H]DALG и [³H]DADLE с мембранной фракцией головного мозга крыс показал, что используемый метод замещения водорода на тритий сохраняет биологическую активность даларгина, в частности, его характеристики связывания с ОР головного мозга крыс.

Зависимость молярной радиоактивности (M_R , Ки/ммоль) и химического выхода [³H]даларгина (P , %) от условий реакции ВТКИО с водородом, содержащим 0.1% трития*

Время, мин	Температура, °C									
	140		155		170		180		190	
	M_R	P	M_R	P	M_R	P	M_R	P	M_R	P
10	1.8	81	6.7	82	19.9	82.6	75	64	184.2	40
20	6.5	64	11.2	78	51.9	62.2	140	56	273.5	40
30	6.2	72	—	—	—	—	189	46	—	—
40	10.8	70	24.7	58	94.2	52.2	211	46	323.1	12
60	6.0	86	39.3	75	147.5	46.8	139	22	556.1	6

* Состав твердой фазы DALG : Al₂O₃ : Rh/Al₂O₃ = 1 : 20 : 2.

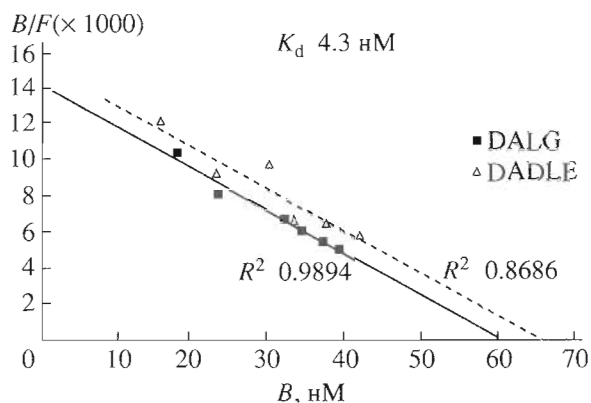


Рис. 1. Анализ связывания [³H]DADLE и [³H]DALG с опиоидными рецепторами головного мозга крыс. Результаты представлены в координатах Скэтчарда; по оси абсцисс – концентрация связавшейся метки, по оси ординат – отношение концентраций связавшейся (B) и свободной метки (F) в инкубационной среде. R^2 – величина достоверности аппроксимации, K_d – константа диссоциации.

Скорость реакции обмена водорода может быть определена из данных о молярной радиоактивности меченого продукта и длительности реакции ВТКИО. Реакцию проводили с твердой смесью постоянного состава, образованной пептидом, неорганическим носителем и катализатором, используя в качестве газовой фазы водород, содержащий 0.1% трития. Как видно из данных, приведенных в таблице, при изменении температуры реакции от 140 до 190°C молярная радиоактивность меченого пептида увеличивается в 30–100 раз. Химический выход [³H]DALG практически не зависит от длительности реакции при температуре 140–155°C, а при температуре 170°C и выше выход уменьшается с ростом температуры и длительности реакции. По-видимому, снижение химического выхода связано с реакцией гидронолиза исходного пептида.

При рацемизации пептида по одному аминокислотному остатку образуются диастереомеры, однако, такие пептиды можно разделить с помощью ВЭЖХ. Ранее нами было показано, что при ВТКИО трипептида Gly-Val-Gly при 180°C возможная рацемизация не превышала 1% [12]. Конфигурация асимметрических углеродных атомов

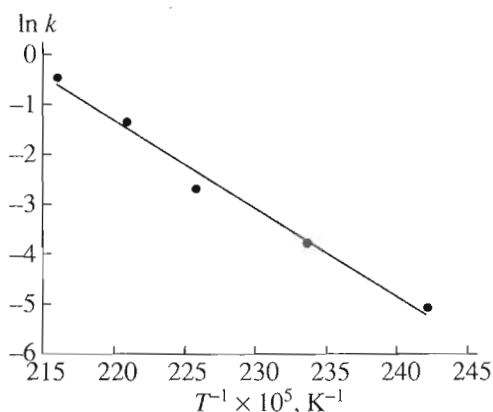


Рис. 2. Зависимость константы скорости от температуры в аррениусовских координатах.

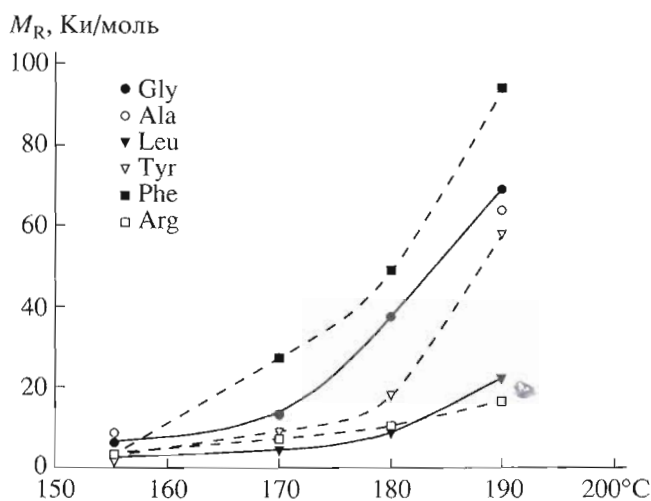


Рис. 3. Зависимость молярной радиоактивности аминокислотных фрагментов даларгина от температуры реакции ВТКИО водорода на тритий.

в пептидах является определяющей для сохранения их биологической активности, поэтому для синтеза $[^3\text{H}]\text{DALG}$ была выбрана несколько меньшая температура (160°C), а от продуктов гидролиза и диастереомерных пептидов препарат двукратно очищали с помощью ВЭЖХ. Длительность реакции ВТКИО составила 40 мин, при этом был получен меченый пептид с молярной радиоактивностью 52 Ки/ммоль.

Для начальных участков кинетических зависимостей, полученных при разных температурах, была определена скорость, в которой происходит замещение в пептиде водорода на тритий (рис. 2). Из наклона прямой определена энергия активации реакции изотопного обмена в DALG, составляющая 32 ккал/моль.

Из данных по молярной радиоактивности для $[^3\text{H}]\text{DALG}$, полученного при различных температурах (рис. 3), следует, что изотопная метка включается во все аминокислотные фрагменты. При 140°C несколько большей реакционной спо-

собностью обладают остатки Ala и Gly, а при 190°C возрастает доля трития, включенного в ароматические остатки Phe и Tyr.

Таким образом, использование реакции твердофазного каталитического изотопного обмена водорода позволило получить меченый тритием даларгин с молярной радиоактивностью 52 Ки/ммоль. Меченый пептид сохранил биологическую активность и имеет изотопную метку во всех аминокислотных фрагментах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Твердофазный изотопный обмен водорода в даларгине на тритий. 100 мг окиси алюминия (Serva) смешивали с 5.0 мг DALG в водном растворе. Воду удаляли при уменьшенном давлении при 20°C . Окись алюминия с нанесенным пептидом смешивали с 10 мг катализатора (5% Rh/Al₂O₃, Fluka). В ампулу объемом 10 мл помещали полученную твердую смесь, содержащую 0.5 мг DALG. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным тритием или водородом, содержащим 0.1% трития, до давления 250 мм рт. ст. и проводили реакцию при $140\text{--}190^\circ\text{C}$ в течение 10–60 мин. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 20% водным этанолом. Для удаления лабильного трития пептид еще дважды растворяли в 20% водном этаноле и упаривали. Очистку $[^3\text{H}]\text{DALG}$ последовательно проводили на колонках Кромасил C18 10×250 (Элсико, Россия) и Nucleosil C18 4×250 (Macherey-Nagel, ФРГ). Молярную радиоактивность пептида рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счета.

Распределение изотопной метки по аминокислотным фрагментам пептида было исследовано с помощью последовательно проведенных кислотного гидролиза и аминокислотного анализа. Гидролиз проводили в 6 н. HCl при 105°C в течение 6 ч. Содержание трития в аминокислотных фракциях определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счета.

Мембраную фракцию головного мозга крыс, используемую в радиорецепторном анализе (РРА), получали модифицированным методом [13]. Кору и средний мозг выделяли на холоду непосредственно после декапитации животных и сразу гомогенизировали в охлажденном 50 мМ Трис-HCl-буфере pH 7.7 (4°C) (соотношение масса/объем = 1/20) в гомогенизаторе типа Potter (стекло/тефлон). Гомогенат центрифугировали (30000g, 30 мин, 4°C), осадок ресуспендировали в том же объеме 50 мМ Трис-HCl буфера pH 7.7 (37°C) и инкубировали 40 мин при 37°C для протеолитического расщепления эндогенных опиоидов. Суспензию центрифугировали в тех же условиях, супернатант удаляли, а осадок мембран замораживали, хранили при -20°C и использовали в РРА.

Радиорецепторный анализ. Для постановки микроварианта РРА использовали плоскодонные платы "Linbro" (Великобритания), которые, как

было показано в контрольных экспериментах, практически не сорбируют применяемые в РРА меченые лиганды. Все растворы готовили на 50 мМ Трис-НСI-буфере рН 7.7 (20°C). Инкубационная смесь объемом 300 мкл содержала 1.0–1.5 мг/мл белка мембран головного мозга крыс, 50 мкг/мл ингибитора протеиназ бацитрацина (Sigma, США) и лиганды ОР (0.5–3.0 нМ) [³H]DADLE (NEN, Du Pont, США, 44 Ки/ммоль) и DALG, меченный тритием по описанной выше методике (52 Ки/ммоль). Величину специфического связывания определяли по разности связывания меченого лиганда в отсутствие и в присутствии избытка (2 мМ) DALG. Она составляла в среднем 65–85% от общей величины связывания для DADLE и 40–50% – для DALG.

Пробы инкубировали 40 мин при температуре 20°C с постоянным перемешиванием. Связавшуюся с рецепторами метку отделяли от свободной, перенося содержимое плат на стекловолочные фильтры GF/B "Whatman" (Великобритания), предварительно замоченные в 0.25% полиэтиленмине, используя клеточный харвестер "Skatron" (Норвегия). При этом лунки промывали 4 мл охлажденного 50 мМ Трис-НСI-буфера рН 7.7 (4°C) в течение 10 с. После высушивания на воздухе фильтры помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-8 (Рехим), выдерживали в течение ночи и определяли уровень радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном счетчике "MiniBeta" (LKB-Wallac, Финляндия). Эффективность счета составляла 25%.

Содержание белка в пробах определяли по методике [14] с использованием наборов фирмы "Bio-Rad" (США) на спектрофотометре фирмы "Perkin-Elmer". Калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98-03-32905а)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Золотарев Ю.А., Петренко Б.В., Мясоедов Н.Ф., Беспалова Ж.Д., Молокоедов А.С., Ярыгин К.И. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. С. 1615–1619.
2. Darula Z., Peter A., Toth G. // J. Label. Compds. Radiopharm. 1998. V. 29. P. 817–826.
3. Золотарев Ю.А., Козик В.С., Зайцев Д.А., Дорохова Е.М., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 1989. Т. 308. С. 1146–1151.
4. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Dorokhova E.M., Zaitsev D.A., Myasoedov N.F. // J. Radioanal. Nucl. Chem. Art. 1992. V. 162. P. 3–14.
5. Sermon P.A., Bond D.C. // Catalysis Reviews. 1973. V. 8. P. 211–245.
6. Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // J. Phys. Chemistry. 1999. V. 103. P. 4861–4864.
7. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Дорохова Е.М., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 8. С. 1611–1617.
8. Зозуля А.А., Кост Н.В., Торопов А.В., Мешавкин В.К., Бутенко О.Б., Барсегян Г.Г. // Иммунология. 1996. Т. 5. С. 25–29.
9. Зозуля А.А., Мешавкин В.К., Торопов А.В., Гуревич К.Г., Кост Н.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 127. С. 211–214.
10. Pencheva N., Bocheva A., Dimitrov E., Ivancheva C., Radomirov R. // Eur. J. Pharmacol. 1996. V. 304. P. 99–108.
11. Leslie F.M. // Pharmacol. Rev. 1987. V. 39. P. 197–249.
12. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1995. V. 8. P. 353–365.
13. Simantov R., Childers S.R., Snyder S.H. // Eur. J. Pharmacol. 1978. V. 47. P. 319–331.
14. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

The Solid-state Catalytic Isotope Exchange of Hydrogen in Dalargin

Yu. A. Zolotarev[#], A. K. Dadayan*, B. V. Vas'kovskii^{**}, N. V. Kost^{***},
S. K. Garanin^{**}, V. P. Makarenkova^{***}, and N. F. Myasoedov*

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

***Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

A [³H]Dalargin preparation with a molar radioactivity of 52 Ci/mmol was obtained by the high temperature solid-state catalytic isotope exchange (HSCIE) of tritium for hydrogen at 150°C. This tritium-labeled peptide was shown to completely retain its biological activity in the test of binding to opioid receptors from rat brain. The dissociation constant of the Dalargin–opioid receptor complex was found to be 4.3 nM. The dependencies of the chemical yield and the molar radioactivity on the reaction time and temperature of HSCIE were determined. The activation energy of the HSCIE reaction for the peptide was calculated to be 32 kcal/mol. The amino acid analysis showed that tritium is distributed between all the amino acid residues of [³H]Dalargin at the HSCIE reaction, with the temperature growth significantly increasing the total tritium incorporation and, especially, enhancing the radioactivity incorporation into aromatic residues.

Key words: Dalargin, enkephalins, hydrogen isotope exchange, hydrogen spillover, opioid receptors

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 196-0213; fax: +7 (095) 196-0221;
e-mail: zolya@img.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.