



УДК 541.124:546.11.2

ОДНОРОДНО МЕЧЕННЫЙ ТРИТИЕМ [Leu]ЭНКЕФАЛИН В ИССЛЕДОВАНИИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СЕЛАНКА НА ЭНКЕФАЛИНДЕГРАДИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2004 г. Ю. А. Золотарев^{**}, О. Ю. Соколов^{**}, Н. В. Кост^{**},
Б. В. Васьковский^{***}, Н. Ф. Мясоедов^{*}, А. А. Зозуля^{**}

^{*}Институт молекулярной генетики РАН,
123182, Москва, пл. Курчатова, 2;

^{**}НЦ психического здоровья РАМН, Москва;

^{***}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.02.2003 г. Принята к печати 27.05.2003 г.

Разработан метод анализа энкефалиназной активности плазмы крови, основанный на использовании [Leu]энкефалина, меченного тритием по всем аминокислотным остаткам и позволяющий одновременно оценивать активность нескольких пептидаз в микроколичестве ткани. Методом твердофазного каталитического изотопного обмена получен [G-³H, Leu]энкефалин (120 Ки/ммоль), который подвергали протеолизу под действием плазмы крови, а затем радиоактивные метаболиты разделяли методом ВЭЖХ в присутствии смеси немеченых фрагментов [Leu]энкефалина как внутренних стандартов. Показано, что около 80% энкефалиндеградирующей активности в плазме крови человека приходится на аминопептидазы, 2% – дипептидиламинопептидазы, 10% – дипептидилкарбокисептидазы. Обнаружен новый путь деградации [Leu]энкефалина карбокисептидазой, обеспечивающий около 6% энкефалиндеградирующей активности. Показано, что бестатин ингибирует преимущественно аминопептидазы и карбокисептидазы, а Селанк более специфичен к карбокисептидазам.

Ключевые слова: энкефалины; биodeградация пептидов; Селанк; бестатин; ингибиторы пептидаз, энкефалиназы плазмы крови.

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные молекулы пептидной природы принимают участие в регуляции практически всех жизненно важных функций организма. Однако время существования регуляторных пептидов ограничено в связи с высокой скоростью их гидролиза протеолитическими ферментами, пептидазами. Так, например, время полужизни опиоидных пептидов, энкефалинов, в крови составляет всего несколько минут, причем гидролиз этих пентапептидов происходит с участием группы пептидаз. Ингибирование этих ферментов приводит к повышению времени жизни энкефалинов, что может быть существенно при лечении тех заболеваний, при которых наблюдается снижение активности эндогенной опиоидной системы [1].

Ранее было показано, что новый пептидный анксиолитик Селанк [2, 3] действует на уровень тревожности организма и обладает выраженной способностью ингибировать энкефалиндегради-

рующие ферменты плазмы крови человека [4]. Возможно, что с этим связан один из механизмов его анксиолитического действия [5, 6]. Учитывая то, что ферменты деградации энкефалинов способны расщеплять и другие биологически активные регуляторные пептиды, изучение активности этих пептидаз в норме и патологии, а также поиск новых ингибиторов данных ферментов является важной задачей современной биологии и медицины.

Один из новых методических подходов, используемых для решения этой задачи, связан с применением однородно меченных тритием пептидов. Включение метки практически во все аминокислотные остатки позволяет получать пептиды с высокой удельной радиоактивностью и определять практически все возможные продукты их ферментативного гидролиза одновременно. Это дает возможность анализировать соотношение активностей ферментов деградации исследуемого пептида в микроколичествах биологических образцов.

В данной работе с использованием однородно меченного тритием [Leu]энкефалина исследова-

Автор для переписки (тел.: (095) 196-02-13; эл. почта: zolya@img.ras.ru).

Таблица 1. Энкефалиндеградирующая активность ферментов плазмы крови человека по данным хроматографического анализа [G - 3H , Leu]энкефалина и его метаболитов

Фермент	Фрагмент	Молярная радиоакт., Ки/ммоль	Концентрация образовавшихся фрагментов, нМ		
			I	II	III
–	YGGFL (субстрат)	120	435(53)	359(63)	270(62)
Аминопептидаза	Y	33.6	325	202	173
	GGFL	86.4	302(81)	184(88)	160(86)
Дипептидиламинопептидаза	YG	70.2	8(2)	2(1)	5(3)
	GFL	49.8	6	1	6
Дипептидилкарбоксипептидаза	YGG	108.4	42(11)	18(9)	8(4)
	FL	11.6	50	20	11
Карбоксипептидаза	YGGF	119.3	23(6)	6(3)	12(6)

Представлены результаты тестирования образцов плазмы крови трех здоровых доноров (I, II, III). Время инкубации – 15 мин. В скобках приведено содержание (в процентах) оставшегося в среде [Leu]энкефалина (в ряду “субстрат”) либо содержание (в процентах) фрагментов от количества [Leu]энкефалина, подвергнутого биодegradации с образованием данного продукта.

лись энкефалиназы плазмы крови человека и изучалось влияние Селанка на эти ферменты.

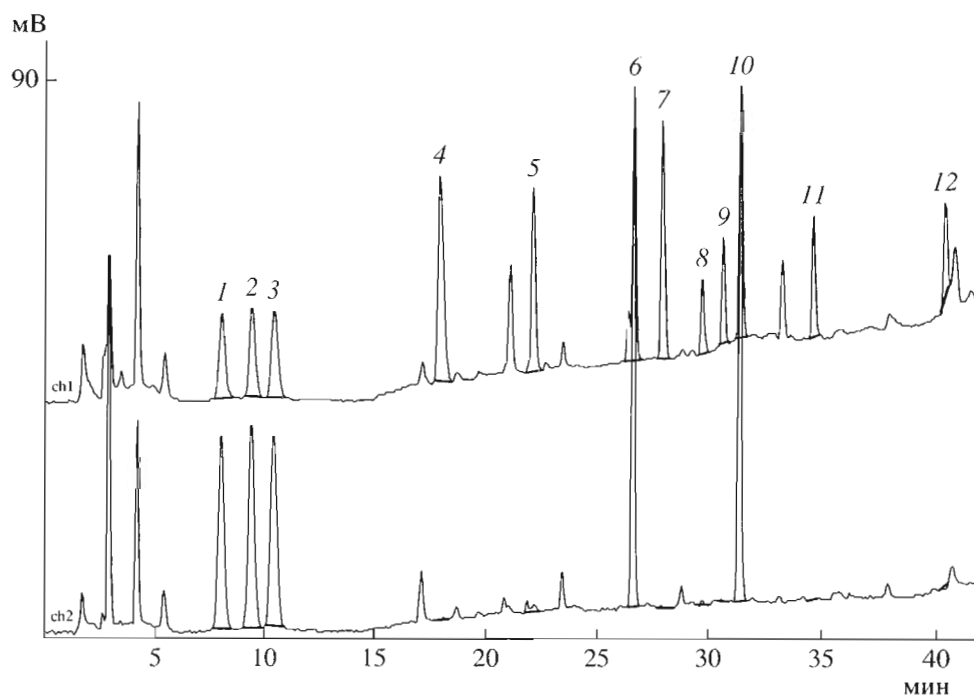
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

До настоящего времени при исследовании процессов ферментативного гидролиза энкефалинов в качестве радиоактивного субстрата использовали пептиды, меченные тритием по тирозину [7]. Как следствие, среди продуктов реакции радиоактивными являлись только тирозинсодержащие фрагменты энкефалина. В данном исследовании был использован однородно меченный тритием [G - 3H , Leu]энкефалин (120 Ки/ммоль), полученный реакцией твердофазного каталитического изотопного обмена (ТКИО) [8]. При выбранной для введения температуре в 160°C реакция ТКИО происходит с высокой стереоселективностью и замещение H при асимметрических углеродных атомах не сопровождается рацемизацией ни в аминокислотах, ни в пептидах [9]. Замещение водородных атомов на изотопные происходит по одноцентровому механизму в твердой фазе, что и обеспечивает сохранение конфигурации асимметрических атомов [10]. Реакция ТКИО с успехом используется для введения тритиевой метки в соединения различных классов, в том числе и белков, обеспечивая при этом полное сохранение их нативных свойств [11, 12]. По данным ЯМР, распределение тритиевой метки в представленном [G - 3H , Leu]энкефалине составляет (в процентах): Tyr¹ – 28, Gly² – 30.5, Gly³ – 31.8, Phe⁴ – 9.1, Leu⁵ – 0.61 [12]. Включение метки во все аминокислоты увеличило удельную радиоактивность пептида более чем в три раза по сравнению с энкефалином, меченным только по тирозину, и позволило изучать

процессы образования всех без исключения возможных продуктов гидролиза этого пептида в микроколичествах (5 мкл) плазмы крови.

Методика определения содержания [G - 3H , Leu]энкефалина (3H YGGFL) и его метаболитов – 3H YGGF, 3H YGG, 3H YG, 3H GGFL, 3H GFL, 3H FL, 3H Y и 3H F – основана на определении радиоактивности, находящейся в хроматографических фракциях соответствующих фрагментов, дополнительно введенных в исследуемый образец перед разделением и выделенных по данным УФ-детекции. Так как масса пептида 3H YGGFL и его 3H метаболитов, подвергнутых хроматографическому разделению по данной методике, слишком мала для непосредственного наблюдения с помощью УФ-детекции. Для разделения продуктов гидролиза [Leu]энкефалина был использован метод ВЭЖХ с УФ-детекцией при двух длинах волн – 250 и 280 нм. Выбор длин волн для детектирования определялся удобством надежной идентификации продуктов биодegradации [Leu]энкефалина на фоне компонентов плазмы крови. На рис. 1 представлена типичная хроматограмма смеси пептидных фрагментов [Leu]энкефалина и пептидной фракции, экстрагированной из образца плазмы, содержащей [G - 3H , Leu]энкефалин и бестатин. Выбранные условия хроматографии позволяют количественно разделить все продукты биодegradации [Leu]энкефалина. Разработанная методика дает возможность с высокой надежностью идентифицировать и, учитывая их молярную радиоактивность, определить концентрацию всех фрагментов [Leu]энкефалина, образовавшихся под действием отдельных пептидаз.

В табл. 1 представлены результаты тестирования продуктов гидролиза [Leu]энкефалина фер-



Исследование биодеградации [Leu]энкефалина в присутствии 500 мкМ бестатина в плазме крови, 30 мин. Хроматография смеси по 5 мкг пептидных фрагментов [Leu]энкефалина и пептидной фракции, экстрагированной из образца плазмы объемом 1 мкл, содержащей $[G-^3H, Leu]$ энкефалин и бестатин в условиях, приведенных в "Эксперимент. части". ch1 и ch2 – профили детектирования на длине волны 250 и 280 нм; 1 – YGG; 2 – Y; 3 – YG; 4 – F; 5 – GF; 6 – YGGF; 7 – FL; 8 – GGFL; 9 – бестатин; 10 – YGGFL; 11 – GGF; 12 – GFL.

ментами плазмы крови трех здоровых доноров. При некоторой вариабельности полученных результатов можно видеть, что более 80% исследуемой активности приходится на аминокептидазы (продукты Tyr и Gly-Gly-Phe-Leu), около 2% соответствует дипептидиламинопептидазам и менее 10% – дипептидилкарбокисептидазам (активность оценивали по накоплению меченых Tyr-Gly и Tyr-Gly-Gly соответственно, как продуктов с более высокой молярной радиоактивностью). Соотношение активностей этих трех групп ферментов деградации энкефалинов в крови, качественно соответствующее полученным результатам, неоднократно описано в литературе [7]. Продуктов, которые могли получиться с участием только нескольких ферментов одновременно (например, Gly-Gly-Phe, Gly-Phe, Phe) в течение 15 мин инкубации, обнаружено не было.

Среди продуктов гидролиза $[G-^3H, Leu]$ энкефалина присутствует около 6% Tyr-Gly-Gly-Phe, что свидетельствует об относительно большом вкладе карбокисептидаз в деградацию этого пептида. Экзокарбокисептидазный путь гидролиза $[Leu]$ энкефалина в крови до сих пор обнаружен не был. Наши результаты могут быть обусловлены как преимуществами использованного в настоящей работе метода разделения продуктов, так и другими методическими отличиями. Так, ряд авторов, утверждавших, что гидролиз $[Leu]$ энкефа-

лина не идет по карбокисептидазному пути, использовали EDTA в качестве антикоагулянта [7], инактивируя тем самым Ca-зависимые ферменты, включая карбокисептидазы [13].

Использование ВЭЖХ-продуктов ферментативного гидролиза однородно меченных тритием пептидов позволило также изучить специфичность ингибиторов в такой сложной системе ферментов, какой является плазма крови (табл. 2). Из таблицы видно, что в присутствии бестатина в концентрации 500 мкМ, которая обычно используется для наиболее полного ингибирования этих ферментов [14], скорость деградации энкефалина уменьшается более чем в 6 раз. При 30-минутном воздействии ферментной системы плазмы крови на $[Leu]$ энкефалин в присутствии бестатина концентрация продуктов действия аминокептидаз уменьшается в 20 раз, а для карбокисептидазы – в 10 раз. В то же время бестатин не влияет на активность дипептидиламинопептидазы и дипептидилкарбокисептидазы. В присутствии 500 мкМ бестатина основной путь биодеградации $[Leu]$ энкефалина в плазме крови связан с действием дипептидилпептидаз, а не аминокептидаз. Полученные данные согласуются с тем, что бестатин – активный ингибитор аминокептидаз и не действует на дипептидилпептидазы [15]. Наряду с этим, показано, что бестатин может также значительно подавить наблюдающуюся относительно невысо-

Таблица 2. Влияние бестатина на активность энкефалиндеградирующих ферментов плазмы крови человека по данным хроматографического анализа [$G\text{-}^3\text{H}$, Leu]энкефалина и его метаболитов

Фермент	Фрагмент	Концентрация образовавшихся фрагментов, нМ			
		контроль	бестатин, 500 мкМ		
		30 мин	30 мин	90 мин	120 мин
– Аминопептидаза	YGGFL (субстрат)	167(38)	376(90)	357(74)	336(67)
	Y	230	8	22	33
Дипептидиламинопептидаза	GGFL	216(79)	10(26)	25(20)	40(24)
	YG	9(3)	11(28)	35(29)	46(28)
	GFL	7	8	30	40
Дипептидилкарбоксипептидаза	YGG	19(7)	15(39)	49(40)	61(37)
	FL	20	20	50	60
Карбоксипептидаза	YGGF	30(11)	3(8)	13(11)	17(10)

В скобках приведено содержание (в процентах) оставшегося в среде [Leu]энкефалина (в ряду “субстрат”) либо содержание (в процентах) фрагментов от количества [Leu]энкефалина, подвергнутого биодegradации с образованием данного продукта.

Таблица 3. Влияние Селанка на активность энкефалиндеградирующих ферментов плазмы крови человека по данным хроматографического анализа [$G\text{-}^3\text{H}$, Leu]энкефалина и его метаболитов

Фермент	Фрагмент	Концентрация образовавшихся фрагментов, нМ			
		контроль	Селанк, 15 мкМ		
		30 мин	30 мин	90 мин	120 мин
Аминопептидаза	YGGFL (субстрат)	167(38)	297(72)	154(40)	146(33)
	Y	230	117	223	233
	GGFL	216(79)	110(95)	220(94)	228(93)
Дипептидиламинопептидаза	YG	9(3)	4(4)	11(5)	14(5)
	GFL	7	3	8	10
Дипептидилкарбоксипептидаза	YGG	19(7)	1(1)	3(1)	5(2)
	FL	20	2	4	7
Карбоксипептидаза	YGGF	30(11)	0(0)	0(0)	0(0)

В скобках приведено содержание (в процентах) оставшегося в среде [Leu]энкефалина (в ряду “субстрат”) либо содержание (в процентах) фрагментов от количества [Leu]энкефалина, подвергнутого биодegradации с образованием данного продукта.

кую активность карбоксипептидаз плазмы крови по отношению к [Leu]энкефалину.

Способность пептидного анксиолитика Селанка (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) ингибировать основные группы энкефалиндеградирующих ферментов плазмы крови представлена в табл. 3. Видно, что Селанк в концентрации 15 мкМ, соответствующей его IC_{50} в этой полиферментной системе [4], полностью ингибирует карбоксипептидазы, почти в 20 раз снижает активность дипептидилкарбоксипептидаз и лишь в 2 раза замедляет накопление *N*-концевых продуктов гидролиза [Leu]энкефалина – Tyr и Tyr-Gly. Таким образом, выраженность ингибирующего эффекта Селанка

на аминокпептидазы на порядок ниже, чем на карбоксипептидазы. Т.е. по отношению к ферментам плазмы крови, расщепляющим [Leu]энкефалин, Селанк может рассматриваться как относительно селективный ингибитор карбокси- и дипептидилкарбоксипептидаз. В присутствии 15 мкМ Селанка биодegradация [Leu]энкефалина в плазме крови происходит еще с большей селективностью по пути, связанному с действием аминокпептидаз, чем без него.

Данное исследование и определение IC_{50} Селанка (15 мкМ) по отношению к общей активности энкефалиндеградирующих ферментов [4] проводилось на 10-кратно разведенной плазме крови.

Расчетное значение IC_{50} Селанка в цельной крови, по-видимому, будет на порядок выше. С другой стороны, приблизительный расчет показывает, что при тех дозах Селанка, при которых он оказывает анксиолитическое (противотревожное) действие на животных (100–400 мкг/кг внутривенно [3, 6]), концентрация этого пептида в крови не превышает 1 мкМ. Такой концентрации явно недостаточно, чтобы заингибировать аминопептидазы, обеспечивающие более 80% общей энкефалиназной активности. Однако активность карбокси- и дипептидилкарбоксипептидаз в плазме крови на порядок ниже (табл. 1), а степень их ингибирования Селанком на порядок выше, чем для аминопептидаз (табл. 3). В результате можно предположить, что достигаемой при фармакологическом воздействии концентрации Селанка в крови вполне достаточно, чтобы повлиять на активность карбокси- и дипептидилкарбоксипептидаз.

К последним относятся, в частности, ангиотензинпревращающий фермент и нейтральная эндопептидаза, которые обладают способностью гидролизовать, помимо энкефалина, ряд других регуляторных пептидов, например, катализировать превращение ангиотензина I в ангиотензин II, расщеплять субстанцию P, нейротензин, натрийуретический пептид, брадикинин и др. [16], т.е. механизм биологического действия Селанка может быть связан с воздействием не только на опиоидную систему, но и на ряд других систем регуляторных пептидов. Следовательно, есть основание для поиска новых сфер применения этого препарата, таких, как регуляция кровяного давления и других функций сердечно-сосудистой системы, коррекция процессов, связанных с обучением и памятью. Для подобных исследований также могут быть использованы однородно меченные тритием соответствующие пептиды.

В данной работе применение однородно меченого тритием [Leu]энкефалина позволило выявить ранее не описанный путь расщепления этого пептида карбоксипептидазами, активность которых составляет около 6% общей энкефалиндеградирующей активности ферментов плазмы крови человека. Кроме того, показано, что ингибитор этих ферментов Селанк обладает на порядок более выраженной активностью по отношению к карбокси- и дипептидилкарбоксипептидазам по сравнению с амино- и дипептидиламинопептидазами.

Предложенная методика обеспечивает содержание в хроматографической фракции [G-³H, Leu]энкефалина, с учетом разбавления, более чем 95% радиоактивности исходного образца, введенного во взаимодействие с плазмой крови при нулевом времени воздействия. Профиль хроматограмм исходного образца плазмы с добавлением модельной смеси немеченых пептидов, таких же об-

разцов в присутствии [G-³H, Leu]энкефалина, полученных при разном времени биодеградации, и образцов, полученных в присутствии 15 мкМ гептапептида Селанк (ИМГ РАН), по данным УФ-детектирования полностью соответствуют друг другу. Различие между ними заключается только в распределении радиоактивности в хроматографических фракциях соответствующих фрагментов. Проведение экспериментов по исследованию биодеградации [G-³H, Leu]энкефалина в присутствии 500 мкМ бестатина (Bachem) позволяет на хроматограмме одновременно наблюдать пик количественно экстрагированного бестатина. Предложенная методика, основанная на использовании однородно меченных тритием пептидов, позволяет на микрообразцах тканей организма с высокой чувствительностью исследовать биодеградацию физиологически активных пептидов под действием нескольких ферментных систем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие приборы: спектрофотометр Ultraspec 4050 (ЛКВ, Швеция), ЯМР-спектрометр Varian UNITY-600 (США), ВЭЖХ-колонок: Kromasil C18 10 × 250 мм (Элсико, Россия), Nucleosil C18 4 × 250 мм (Macherey-Nagel, ФРГ), УФ-детектор для ВЭЖХ Model 116 (Gilson, Франция), полупромышленную установку обмена водорода на тритий ОВТ-1 (Россия), плащечный спектрофотометр Σ960 (Metertech, Тайвань), сцинтилляционный счетчик РЖС-20 (Россия), центрифуги: Centrifuge 5414 (Eppendorf, ФРГ), К-23D, К-70D (МЛМ, ГДР), жидкостный термостат УН 4 (МЛМ, ГДР), вращающийся вакуумный испаритель РВО-64 (Микротехна, Чехословакия), установка для лиофилизации Chinisto Alfa-5 (Medizinischer Apparatebau, ФРГ).

Плазму крови получали от пяти здоровых доноров с использованием гепарина (20 ед./мл венозной крови) в качестве антикоагулянта. Кровь центрифугировали (1000 g, 10 мин, 4°C). Образцы плазмы замораживали и хранили при -20°C.

Твердофазный изотопный обмен водорода в [Leu]энкефалине на тритий. 100 мг окиси алюминия (Alusorb A 075 Chemapol) смешивали с 5.0 мг [Leu]энкефалина (Bachem) в водном растворе, объем 1 мл. 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 [Leu]энкефалина. Ампулу вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 торр и проводили реакцию при 160°C в течение 20 мин. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 20% водным этанолом. Для удаления легко обменивающегося трития пептид дважды растворяли в

20% водном этаноле и упаривали в вакууме. Очистку [G-³H, Leu]энкефалина последовательно проводили на колонках Kromasil C18 10 × 250 и Nucleosil C18 4 × 250. Использование ВЭЖХ позволяет отделить продукты авторадииолиза и диастереомерные пептиды. Количество пептида определяли из данных УФ-детектирования, молярную радиоактивность рассчитывали из данных жидкостного сцинтилляционного счета. Получено 25 мКи [G-³H, Leu]энкефалина с молярной радиоактивностью 120 Ки/ммоль. Гомогенность меченого пептида подтверждена результатами тонкослойной радиохроматографии на пластинках Silufol в системе 2-бутанон–*трет*-бутанол–аммиак–вода, 2 : 2.4 : 1 : 1. Сохранение нативной структуры пептида подтверждено результатами ¹H-ЯМР, распределение трития в пептиде определено по данным ³H-ЯМР.

Энкефалиназную активность определяли по скорости накопления продуктов ферментативной деградации [G-³H, Leu]энкефалина по методу [17]. Инкубационная смесь (конечный объем 250 мкл, 15 мКи [G-³H, Leu]энкефалина с удельной активностью 120 Ки/ммоль) содержала 10-кратно разведенную плазму крови, 10 mM Трис-НС1 (рН 7.5), 0.15 M NaCl, 500 нМ [G-³H, Leu]энкефалин и исследуемые ингибиторы в концентрациях, указанных в табл. 1, 2. Инкубацию проводили при 37°C, отбирали по 50 мкл и останавливали биodeградацию добавлением 5 мкл 0.2 M HCl. К образцам добавляли по 200 мкл ацетонитрила и охлаждали до –20°C.

Для определения содержания [G-³H, Leu]энкефалина и его пептидных фрагментов в биологических пробах проводили экстрагирование пептидной фракции образцов с помощью органических растворителей, с последующей ВЭЖХ полученных экстрактов. Смесь, содержащую 80% ацетонитрила, центрифугировали при 4°C 15 мин при 5000 об/мин. Отбирали супернатант и высушивали его на роторном испарителе при пониженном давлении. Сухой остаток растворяли в двух порциях по 500 мкл метанола и переносили в пластиковую пробирку для центрифугирования объемом 1.5 мл. Центрифугировали при тех же условиях, супернатант высушивали на роторном испарителе при уменьшенном давлении, сухой остаток растворяли в 100 мкл 0.1% TFA.

Хроматографический анализ продуктов биodeградации [G-³H, Leu]энкефалина. Разделение смеси пептидных фрагментов и продуктов биodeградации [G-³H, Leu]энкефалина проводили методом ВЭЖХ на колонке Kromasil C18 – 5 мкм (4 × 150 мм) при 20°C. В качестве детектора использовали спектрофотометр Beckman модели 165 (Altex, США) при одновременном детектировании на длинах волн 250 и 280 нм. Полученные образцы пептидных экстрактов из плазмы крови

объемом 20 мкл смешивали с 30 мкл раствора [Leu]энкефалина и его метаболитов (по 5 мкг каждого пептида) (ИМГ РАН) и подвергали градиентному элюированию в смеси элюентов А (0.1% TFA) и В (80% ацетонитрил в элюенте А) с выделением YGGFL и его фрагментов. Использовали градиент от 4 (0–10 мин) до 58% раствора В за 40 мин, при скорости потока 1 мл/мин (рисунок). С помощью жидкостного сцинтилляционного счета определяли радиоактивность в каждой фракции. Молярную радиоактивность пептидных фрагментов [Leu]энкефалина (табл. 1) рассчитывали по данным распределения тритиевой метки в [³H]YGGFL, полученным с помощью тритиевого ЯМР [12]. Концентрацию [G-³H, Leu]энкефалина и его фрагментов в плазме определяли из данных по радиоактивности пептидной фракции соответствующего метаболита и его молярной радиоактивности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-48519а) и Программой физико-химической биологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля А.А., Степура О.Б., Кост Н.В., Акатова Е.В., Пак Л.С., Мартынов А.И. // Кардиология. 1999. Т. 39. С. 59–62.
2. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Антонова Л.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потапов В.Н., Каменский А.А., Ашмарин И.П. // Хим.-фарм. журн. 1984. Т. 18. С. 790–795.
3. Середенин С.Б., Козловская М.М., Бледнов Ю.А., Козловский И.И., Семенова Т.П., Чабак-Горбач Р., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф. // Журн. высш. нервн. деят. 1998. Т. 48. С. 153–160.
4. Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. С. 180–183.
5. Зозуля А.А., Кост Н.В., Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гривенников И.А., Андреева Л.А., Золотарев Ю.А., Иванов С.В., Андриященко А.В., Мясоедов Н.Ф., Смудевич А.Б. // Бюл. эксп. биол. мед. 2001. Т. 131. С. 376–378.
6. Соколов О.Ю., Мешавкин В.К., Кост Н.В., Зозуля А.А. // Бюл. эксп. биол. мед. 2002. Т. 133. С. 158–161.
7. Marini M., Urbani A., Trani E., Bonjorno L., Rodo L. // Peptides. 1997. V. 18. P. 741–748.
8. Золотарев Ю.А., Козик В.С., Зайцев Д.А., Дорохова Е.М., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 1989. Т. 308. С. 1146–1150.
9. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Velikodvorskaia G.A., Neumivakin L.V., Zverlov V.V., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1995. V. 8. P. 353–365.
10. Zolotarev Y.A., Borisov Y.A., Myasoedov N.F. // J. Phys. Chemistry A. 1999. V. 103. P. 4861–4864.
11. Klimova O.A., Zolotarev Yu.A., Chebotarev V.Yu. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 195. P. 758–761.

12. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E. M., Myasoedov N.F. // *Amino Acids*. 2003. V. 24. P. 325–333.
13. Bunnett N.W., Goldstein S.M., Nakazato P. // *Gastroenterology*. 1992. V. 102. P. 76–87.
14. Shibanoki S., Weinberger S.B., Schulteis G., Ishikawa K., Martinez J.L. // *Life Sci*. 1992. V. 50. P. 667–675.
15. Suda H., Aoyagi T., Takeuchi T., Nagase H. // *Arch. Biochem. And Biophys*. 1976. V. 177. P. 196–200.
16. Гомазков О.А. Нейропептиды и ростовые факторы мозга. М.: изд-во ин-та биомедицинской химии РАН, 2002. С. 168–210.
17. Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гуревич К.Г., Акатова Е.В., Алфимова М.В., Кост Н.В. // *Нейрохимия*. 2000. Т. 17. С. 150–156.

Leu-Enkephalin Generally Labeled with Tritium in Studying the Selank Inhibiting Effect on the Enkephalin-Degrading Enzymes of Human Blood Plasma

Yu. A. Zolotarev*, O. Yu. Sokolov**, N. V. Kost**,
B. V. Vas'kovsky***, N. F. Myasoedov*, and A. A. Zozulya****

Phone: +7 (095) 196-0213, e-mail: zolya@img.ras.ru

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

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

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

A method of analysis of enkephalinase activity in blood plasma based on the application of Leu-enkephalin generally labeled with tritium at all its amino acid residues was developed. The method allows the simultaneous estimation of activity of several peptidases in microquantities of tissues. [$G-^3H$]Leu-enkephalin was prepared by the method of solid phase catalytic isotope exchange (120 Ci/mmol) and subjected to proteolysis by the treatment with blood plasma. The resulting radioactive metabolites were separated by HPLC in the presence of the mixture of unlabeled fragments of Leu-enkephalin as internal standards. It was shown that aminopeptidases, dipeptidylaminopeptidases, and dipeptidylcarboxypeptidases respond for approximately 80%, 2%, and 10% of the total enzymatic activity, respectively. The new pathway of degradation of Leu-enkephalin by carboxypeptidase that provides for ~6% of the total enkephalin-degrading activity was discovered. Bestatin was shown to predominantly inhibit aminopeptidases and carboxypeptidases, whereas Selank is more specific for carboxypeptidases and dicarboxypeptidases. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: bestatin, biodegradation of peptides, blood serum enkephalins, enkephalins, inhibitors of proteases, Selank