

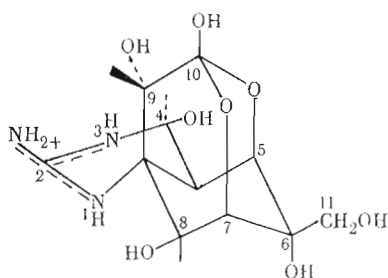


УДК 547.993:546.11.3.07

ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОИЗВОДНОГО  
ТЕТРОДОТОКСИНА, СОДЕРЖАЩЕГО ТРИТИЕВУЮ МЕТКУ*Коваленко В. А., Пашиков В. Н., Гришин Е. В.,  
Овчинников Ю. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва**Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Аксональные нейротоксины — тетродотоксин (ТТХ) и сакситоксин, блокирующие быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран, широко используются для исследования этих важнейших мембранных компонентов. Так, с помощью меченого тритием ТТХ впервые была установлена принципиальная возможность выделения компонентов натриевых каналов как белковых мембранных структур [4]. Для введения трития в молекулы нейротоксинов первоначально применялись неспецифичные обменные методы [2—5]. Существенным недостатком этих методов является невозможность получения препаратов ТТХ с удельной радиоактивностью более 1 Ки/ммоль, что в ряде случаев недостаточно для надежной детекции его мембранных рецепторов. Кроме того, тритиевый обмен сопровождается значительной деградацией нейротоксинов, что приводит к низкому выходу радиоактивных производных и существенно осложняет процесс их выделения в радиохимически чистом виде.

В настоящее время получены биологически активные производные ТТХ, содержащие различные метки: радиоактивные [6, 7], флуоресцентные [8] и фоточувствительные [8—10]. При этом было установлено, что введение разнообразных функциональных групп по С<sub>(6)</sub> существенно не влияет на биологическую активность синтезированных препаратов, причем химические методы синтеза позволяют получить производные ТТХ со значительно более высокой удельной радиоактивностью [6, 7, 9].



В данной работе для получения производного ТТХ с высокой удельной радиоактивностью был использован метод каталитического восстановления ненасыщенных субстратов газообразным тритием. На первой стадии ТТХ (Calbiochem, США) подвергался периодатному окислению в мягких условиях [4]. Образовавшееся кетопроизводное (норТТХ) далее было обработано цианистым водородом для получения соответствующего цианидрина. Затем осуществлялось каталитическое восстановление модифицированного нейротоксина в присутствии 5% Pd/C газообразным тритием по методу [11]. Очистка радиоактивного производного ТТХ проводилась при помощи хроматографии на катионите биорекс-70 [12]. Гомогенность

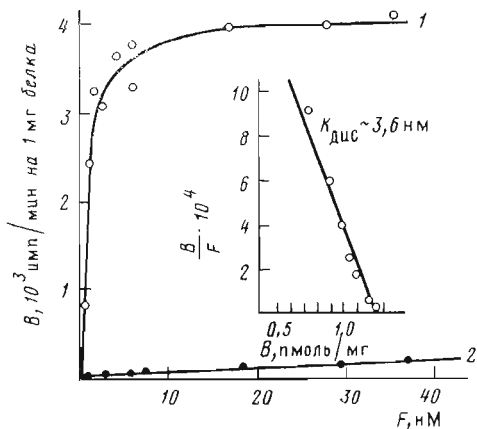


Рис. 1

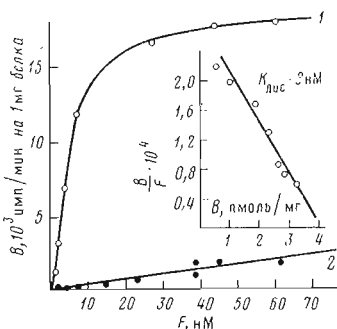


Рис. 2

Рис. 1. Специфичное (1) и неспецифичное (2) связывание [ $^3\text{H}$ ]N-TTX (уд. радиоактивность 4,5 Ки/ммоль) мембранами мозга крыс, солиобилизованными 1% лубролом РХ. Рецепцию детектировали методом быстрой гель-хроматографии [13]. На врезке – параметры связывания в координатах Скэтчарда:  $B$  и  $F$  – соответственно координаты связанного и свободного [ $^3\text{H}$ ]N-TTX

Рис. 2. Связывание [ $^3\text{H}$ ]N-TTX (уд. радиоактивность 8,1 Ки/ммоль) плазматической мембраной аксонов краба, солиобилизованной 1% лубролом РХ. Обозначения см. в подписи к рис. 1

полученного аналога токсина ([ $^3\text{H}$ ]N-TTX) была подтверждена хроматографией в тонком слое силикагеля в условиях работы [3]. Биологическая активность определялась по токсическому эффекту на мышцах при внутрибрюшинном введении и по связыванию фракцией аксональной мембраны краба [12]. Концентрация и удельная радиоактивность [ $^3\text{H}$ ]N-TTX оценивались по связыванию с фракцией плазматической мембраны  $F_1$ , содержащей известное количество рецепторов ТТХ [12]. Согласно полученным данным, удельная радиоактивность препаратов [ $^3\text{H}$ ]N-TTX составляла 4,5–8,1 Ки/ммоль при выходе 4–6% в расчете на исходный токсин.

Параметры взаимодействия [ $^3\text{H}$ ]N-TTX с солиобилизованными мембранами из мозга крыс (рис. 1) и аксонов краба (рис. 2) свидетельствуют о высоком сродстве радиоактивного производного токсина к рецепторам. Следует отметить также незначительный уровень неспецифичного связывания даже при больших концентрациях [ $^3\text{H}$ ]N-TTX. Полученное радиоактивное производное ТТХ обладает достаточной стабильностью. Так, при хранении его водного раствора с концентрацией  $10^{-6}$ – $3 \cdot 10^{-5}$  М при  $-50^\circ\text{C}$  в течение 5 месяцев не обнаруживается заметных изменений в уровне специфичного и неспецифичного связывания токсина препаратами мембран.

Таким образом, предложенный способ введения тритиевой метки в молекулу ТТХ позволяет получать с хорошим выходом биологически активное производное, обладающее высокой удельной радиоактивностью. Данное производное ТТХ успешно используется нами для идентификации и выделения компонентов натриевых каналов плазматической мембраны нервов краба и мозга крыс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ritchie J. M., Rogart R. B. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 1977, v. 79, № 1, p. 1–50.
2. Benzer T., Raftery M. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 12, p. 3634–3637.
3. Colquhoun D., Henderson R., Ritchie J. M. J. Physiol., 1972, v. 227, № 1, p. 95–126.
4. Balerna M., Fosset M., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M. Biochemistry, 1972, v. 14, № 25, p. 5500–5511.
5. Reed J. K., Trzos W. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 2, p. 414–422.
6. Chicheportiche R., Balerna M., Lombet A., Romey G., Lazdunski M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 104, № 2, p. 617–625.
7. Grünhagen H. H., Rack M., Stämpfli R., Fasold H. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 206, № 1, p. 198–204.
8. Chicheportiche R., Balerna M., Lombet A., Romey G., Lazdunski M. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 5, p. 1552–1557.

9. *Angelides K. J.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 4, p. 4107-4119.  
 10. *Balerna M., Lombet A., Chicheportiche R., Romey G., Lazdunski M.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 644, № 2, p. 219-225.  
 11. *Fellman J. H. J. J.* Label. Compounds and Radiopharm., 1981, v. 8, № 5, p. 765-768.  
 12. *Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1813-1827.  
 13. *Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 12, с. 1828-1837.

Поступило в редакцию  
27.I.1982

## SYNTHESIS OF A BIOLOGICALLY ACTIVE TRITIUM LABELED TETRODOTOXIN DERIVATIVE

KOVALENKO V. A., PASHKOV V. N., GRISHIN E. V., OVCHINNIKOV Yu. A.,  
SHEVCHENKO V. P., MYASOEDOV N. F.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Molecular Genetics,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A new procedure for the synthesis of radioactive tetrodotoxin derivative was developed. Cyanic acid was coupled to the carbonyl at C<sub>6</sub> of oxidized tetrodotoxin and the product was catalytically reduced by gaseous tritium. After purification, the biologically active tritiated tetrodotoxin derivative had the specific radioactivity from 4,5 to 8,1 Ci/mmole. The binding of this compound was studied with the crab nerve and rat brain membranes, the apparent dissociation constants being about 8 and 3,6 nM, respectively.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 19.02.82      Подписано к печати 08.04.82      Т-04296      Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
 Зысокая печать      Усл. печ. л. 12,6      Усл. вр.-отт. 10,7      Уч.-изд. л. 14,0      Бум. л. 4,5  
 Тираж 833 экз.      Зак. 1366

Издательство «Наука», 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
 2-я типография издательства «Наука», 121099 Москва, Шубинский пер., 10