



УДК 541.124.546.11.2

РАВНОМЕРНО МЕЧЕННЫЕ ТРИТИЕМ ПЕПТИДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ИХ БИОДЕГРАДАЦИИ *in vivo* И *in vitro*

© 2006 г. Ю. А. Золотарев^{**}, А. К. Дадаян^{*}, О. В. Долотов^{*}, В. С. Козик^{*}, Н. В. Кост^{**},
О. Ю. Соколов^{**}, Е. М. Дорохова^{*}, В. К. Мешавкин^{**}, Л. С. Иноземцева^{*}, М. В. Габаева^{**},
Л. А. Андреева^{*}, Л. Ю. Алфеева^{*}, Т. С. Павлов^{***}, К. Е. Бадмаева^{***}, С. Е. Бадмаева^{***},
З. В. Бакаева^{***}, Г. Н. Копылова^{***}, Г. Е. Самонина^{***}, Б. В. Васьковский^{****},
И. А. Гривенников^{*}, А. А. Зозуля^{**}, Н. Ф. Мясоедов^{*}

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

^{**}Научный центр психического здоровья РАМН, Москва;

^{***}Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

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

Поступила в редакцию 04.07.2005 г. Принята к печати 05.07.2005 г.

Работа посвящена применению равномерно меченных тритием пептидов для изучения их биодegradации *in vivo* и *in vitro*. Реакцией высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) со спилловер-тритием получены равномерно меченные тритием биологически активные пептиды с молярной радиоактивностью 50–150 Ки/ммоль. Распределение изотопной метки по всем аминокислотам в этих пептидах позволяет определять практически все возможные продукты их ферментативного гидролиза одновременно. Разработанный метод анализа включает экстракцию органическими растворителями меченных тритием пептидов из тканей организма и хроматографическое выделение индивидуальных меченных пептидов из смеси продуктов биодegradации. Концентрацию исследуемого пептида и продуктов его биодegradации рассчитывают с использованием жидкостного сцинтилляционного счета. С использованием описанного подхода исследованы пути биодegradации пептидов ТКРРРРРР (Селанк) и трипептида РРР в плазме крови. Исследована также фармакокинетика пептидного анксиолитика Селанка в тканях мозга при интраназальном введении *in vivo*. Определены концентрации меченых пептидов и показано, что основными продуктами биодegradации Селанка являются пентапептид ТКРРРР, трипептид ТКР, дипептиды РР и РР. Исследована биодegradация гептапептида МЕНРРРРРР (Семакс) в присутствии нервных клеток и определено, что основными продуктами его биодegradации являются пентапептид НРРРРР, трипептид РРР. Исследовано влияние на энкефалиназную активность плазмы крови с использованием равномерно меченного тритием [Leu]энкефалина. Показано, что высокая ингибирующая способность Семакса на энкефалиназы плазмы крови связана с его действием на аминопептидазы. Предложенный метод, основанный на использовании равномерно меченных тритием пептидов, дает возможность как определять концентрацию пептидов в тканях *in vitro* и *in vivo*, так и оценивать активность ферментов, участвующих в их дegradации.

Ключевые слова: пептиды, меченные тритием; биодegradация пептидов, энкефалиназы плазмы крови, ингибиторы пептидаз, Селанк, Семакс

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым элементом создания новых лекарственных препаратов является выяснение механизма их действия. Как правило, работы по исследованию распределения препаратов в тканях, путей их биодegradации и определению специфического связывания с белками-мишенями выполняются с препаратами, мечеными радиоактивными

изотопами. Наиболее универсальными, удобными в работе и безопасными являются препараты, меченные тритием. Эти препараты получают, как правило, реакцией каталитического гидрирования и дегалогенирования соединений-предшественников газообразным тритием. Использование этих реакций ограничивает величину молярной радиоактивности меченых препаратов, требует больших затрат на разработку технологии для каждого соединения и ограничивает номенклатуру имеющихся в каталогах меченых лигандов.

Известно, что в твердой фазе водородные атомы в аминокислотах могут быть замещены на изотопные под действием термически атомизиро-

Сокращения: СВ – спилловер-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен.

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

ванного трития [1, 2]. Этот метод был с успехом использован для исследования пространственно-взаимодействия белков, находящихся в составе белок-белковых комплексов и вирусных частиц [3, 4]. Однако он не позволяет достичь высоких величин включения трития в препараты. Получить изотопным обменом с газообразным тритием многократно меченные тритием соединения, сохраняющие физиологическую активность, удается при использовании реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО), происходящей в твердых органических соединениях под действием спилловер-водорода (СВ) [5–7]. Практически полное отсутствие рацемизации делает эту реакцию ценным препаративным методом.

Реакцию ВТКИО с газообразным тритием или дейтерием проводят при температуре 120–200°C в твердой смеси, образованной органическим веществом, нанесенным на неорганический носитель, и высокодисперсным катализатором платиновой группы. Для ряда аминокислот с использованием этой реакции удалось практически полностью заменить протий на дейтерий или тритий. Данные по реакционной способности аминокислот были получены с использованием спектроскопии ЯМР [8].

Механизм реакции ВТКИО может быть представлен как одноцентровое синхронное замещение при насыщенном углеродном атоме, характеризующееся образованием в переходном состоянии пятикоординированного углерода и трехцентровой связи с участием приходящего и уходящего водородных атомов [9]. Реакция ВТКИО в аминокислотах, предварительно нанесенных на инертную неорганическую подложку, происходит на каталитических кислотных центрах, образующихся в твердой смеси под действием СВ [10].

На основе квантово-химических расчетов показано, что участие доноров электронов (атомов O и N) в стабилизации переходного состояния реакции ВТКИО является необходимым условием для ее протекания в аминокислотах и пептидах. В пептидах эти атомы могут принадлежать как аминокислоте, в которой происходит обмен, так и пространственно близким с ней аминокислотным остаткам. Реакционная способность аминокислотных фрагментов зависит от строения пептидов [11, 12]. В результате использования реакции ВТКИО был получен целый ряд меченных тритием пептидов, полностью сохранивших свою биологическую активность. Молярная радиоактивность этих пептидов во много раз выше, чем у меченных препаратов, полученных традиционными способами, что особенно важно в исследованиях по специфическому связыванию. Равномерно меченные тритием пептиды, полученные реакцией ВТКИО, использовались для исследования рецепторного связывания на опиоидных и никоти-

новых ацетилхолиновых рецепторах [13–15]. В отличие от метки в пептидах, полученных традиционными способами, изотопная метка, введенная в пептиды с использованием реакции ВТКИО, распределена по всей его молекуле, что открывает возможность слежения за всеми продуктами его биodeградации. Биodeградацию Семакса под действием пептидаз мембран клеток переднего мозга крысы [16] и фетальной сыворотки [17] исследовали с использованием равномерно меченного тритием пептида $[G-^3H]MENFPGP$. Ингибирующее влияние Селанка на биodeградацию $[Leu]$ энкефалина в плазме крови человека анализировали с использованием равномерно меченного тритием пептида $[G-^3H, Leu]$ энкефалина [18, 19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В Институте молекулярной генетики РАН был синтезирован аналог фрагмента адренокортикотропного гормона АСТН-(4–10) Семакс, представляющий собой гептапептид $MENFPGP$, полностью лишенный гормональной активности и обладающий свойствами ноотропа [20]. Было показано, что Семакс обладает способностью увеличивать время жизни нервных клеток в первичных культурах, уменьшая их гибель [21], что, по-видимому, связано с еще одним важным свойством Семакса: он оказался эффективным терапевтическим средством при ишемии мозга.

Пептидные препараты в тканях организма подвергаются быстрой биodeградации. Образующиеся при этом пептидные фрагменты могут вносить существенный вклад в фармакологическую активность препарата. Поэтому важным этапом в исследовании молекулярного механизма действия биологически активного пептида представляется исследование кинетики и путей его превращения в тканях организма. Одним из возможных механизмов нейропротекторного и ноотропного действия Семакса может являться регуляция экспрессии ряда нейротрофинов и их рецепторов в головном мозге [22, 23]. Для выяснения характера биodeградации Семакса в присутствии нейрональных клеток мозга крысы был использован равномерно меченный тритием пептид $MENFPGP$, полученный с помощью реакции ВТКИО [12]. Клеточную культуру инкубировали с пептидом $[G-^3H]MENFPGP$ и методом ВЭЖХ исследовали состав смеси меченых пептидов, образующихся при его биodeградации (табл. 1). Из приведенных данных следует, что деградация Семакса в присутствии культур нейрональных клеток базальных ядер переднего мозга крысы происходит с C- и с N-конца с соизмеримой скоростью. Доминирующим процессом является образование 5-членных фрагментов. Это может свидетельствовать о том, что в деградации Семакса главным образом участвуют дипептидилпептидазы, вызывающие

отщепление *N*- и *C*-концевых фрагментов ME и GP. Можно отметить, что деградация Семакса в присутствии мембран клеток переднего мозга крысы происходит преимущественно с *N*-конца с образованием только пептида HFPGP [16].

В опытах *in vivo* на моделях язвообразования у белых крыс было показано [24], что пептид RGP оказывает защитное действие на слизистую желудка, проявляя протекторные и лечебные противоязвенные свойства. Показано, что пептид был эффективен при стрессорной модели язвообразования, в которой определяющими являются механизмы, реализующиеся с участием центральной нервной системы. Обнаружена также эффективность RGP и в моделях повреждения слизистой желудка, связанных с периферическими механизмами ulcerогенеза, реализующимися при непосредственном воздействии этанола или ледяной уксусной кислоты на слизистую желудка [25, 26]. Равномерно меченный тритием пептид RGP (80 мКи/ммоль), полученный с помощью реакции ВТКИО, был использован для анализа его биодegradации под действием плазмы крови человека (табл. 2). Пептид высоко стабилен, сохраняясь в значительных количествах даже через несколько часов инкубации. Преимущественным путем его биодegradации является отщепление *N*-концевого пролина под действием аминопептидазы.

В Институте молекулярной генетики РАН совместно с Институтом фармакологии РАМН был разработан препарат Селанк (TKPRPGP), обладающий устойчивым анксиолитическим действием и лишенный всех побочных эффектов, свойственных известным транквилизаторам-анксиолитикам. Анксиолитическое действие Селанка выгодно сочетается с активирующим действием на мнестические и когнитивные функции мозга [27]. Фармакокинетику Селанка исследовали с помощью его равномерно меченого тритием аналога, полученного реакцией ВТКИО при температуре 180°C с молярной радиоактивностью 110 Ки/ммоль, содержащего изотопную метку во всех аминокислотных остатках (табл. 3). Состав смеси продуктов гидролиза Селанка полиферментной системой пептидаз плазмы крови в конкретный момент времени анализировали хроматографически (рис. 1). Концентрацию [G - 3H]Селанка и его фрагментов в плазме определяли по величине радиоактивности соответствующих фракций, полученных с помощью ВЭЖХ.

Показано, что 90% пептидазной активности в плазме крови *in vitro* приходится на дипептидилкарбоксипептидазы, обеспечивающие образование пентапептида TKPRP и наиболее долго живущих трипептида ТКР, дипептидов RP и GP. На долю дипептидиламинопептидаз приходится 10% активности, а аминопептидазы и карбоксипептидазы, отщепляющие аминокислотные остатки с

Таблица 1. Концентрация (нМ) Семакса и продуктов его расщепления, образующихся в ходе биодegradации пептидазами нейрональных клеток переднего мозга крысы *in vitro*

Пептид	Время инкубации, ч				
	0.5	1	2	3	24
ЕНHFPGP	0	0	1	2	3
FPGP	0	0	1	4	10
HFPGP	9	15	29	44	79
МЕНFPG	4	6	8	10	16
МЕНFP	7	13	17	20	45
МЕНFPGP (Семакс)	418	397	371	336	116

Примечание. Начальная концентрация [3H]МЕНFPGP в инкубационной среде составила 440 нМ.

Таблица 2. Фармакокинетика RGP в плазме крови человека*

Время, мин	Концентрация пептида, нМ			Степень деградации, %
	PG	GP	RGP	
5	10	520	2960	20
10	50	700	2160	42
15	70	900	1400	62
30	60	1090	860	77
60	50	910	490	87
120	40	530	370	90
240	40	460	290	92

* Исходная концентрация RGP составила 3710 нМ.

Таблица 3. Концентрация Селанка (нМ) и продуктов его расщепления, образующихся в ходе биодegradации пептидазами плазмы крови крысы *in vitro*

Пептид*	Время инкубации, мин						
	0.33	1	1.5	2	2.5	4	23
1 ТКР	0	39	82	125	137	166	19
2 RP	0	38	69	123	185	207	31
3 PRPGP	12	37	46	53	35	37	5
4 TKPR	0	0	0	0	0	0	0
5 TKPRPG	0	0	0	0	0	0	0
6 TKPRP	109	151	171	164	145	118	6
7 TKPRPGP	895	731	555	410	321	158	8
8 RGP	0	0	0	0	0	0	0
9 KPRPGP	0	0	0	0	0	0	0

* Порядок расположения пептидов в таблице соответствует порядку их выхода при хроматографии (рис. 1).

Исходная концентрация [3H]TKPRPGP 1210 нМ.

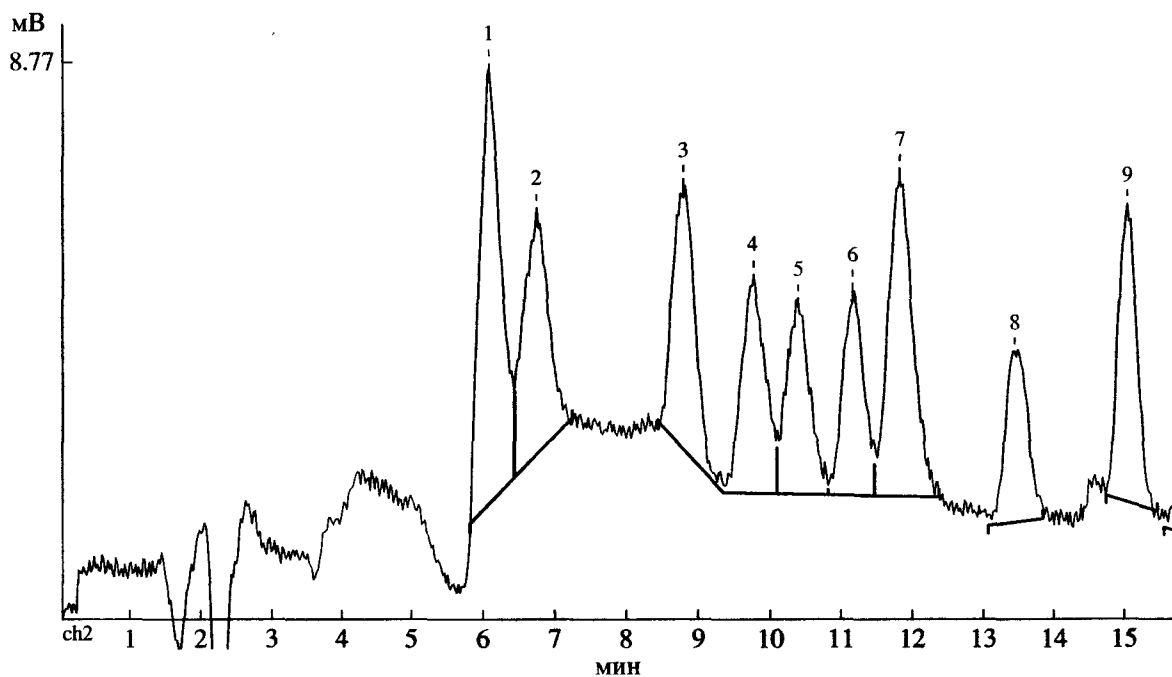


Рис. 1. Исследование биодеградации Селанка в органах крысы *in vivo* и *in vitro*. Хроматография смеси Селанка, его пептидных фрагментов (по 5 мкг) и пептидной фракции, экстрагированной из образца плазмы, содержащей [³H]Селанк и продукты его биодеградации. Колонка Kromasil (4 × 150 мм), градиентное элюирование ацетонитрилом в 0.1% гептафтормасляной кислоте, 1 – ТКР; 2 – РР; 3 – РРРРР; 4 – ТКРР; 5 – ТКРРРР; 6 – ТКРРР; 7 – ТКРРРРР; 8 – РРРР; 9 – РРРРР.

N- и *C*-конца, не вносят существенного вклада в биодеградацию Селанка *in vitro*.

Равномерно меченные тритием пептиды являются эффективным инструментом для исследова-

Таблица 4. Концентрация Селанка и продуктов его пептидазной биодеградации (пмоль/г) в органах крысы *in vivo* при интраназальном введении 500 мкг меченого тритием Селанка

Номер*	Пептид	Кровь	Обонятельные луковицы	Средний мозг	Кора	Мозжечок
1	ТКР (С)	1.96	9.8	1.8	0.5	0.5
2	РР (С)	1.63	6.3	1	0.5	0.6
3	РРРРР (N)	0.23	0	0	0	0
4	ТКРР (С)	0	0	0	0	0
5	ТКРРРР (С)	1.28	7.8	2.2	0.7	1.8
6	ТКРРР (С)	2.40	22	5.4	2.5	4.3
7	ТКРРРРР	5.92	56	11.6	3.1	6.1
8	РРРР (N)	0.12	0	0	0	0
9	РРРРР (N)	0.94	4.1	0.9	0.6	1.7

* Порядок расположения пептидов соответствует порядку выхода пептидов при хроматографии на рис. 1; в скобках указано направление действия пептидаз на исходный пептид (*N*- или *C*-конец).

ния распределения пептидов и их фрагментов в органах и тканях *in vivo*. Как видно из данных по распределению Селанка и продуктов его пептидазной биодеградации в органах крысы *in vivo* через 3 мин после интраназального введения (табл. 4), их содержание в отделах мозга в несколько раз выше, чем в крови. В обонятельных луковицах при интраназальном введении наибольшая концентрация Селанка в 5–10 раз выше, чем в крови. Состав продуктов биодеградации Селанка в отделах мозга и крови *in vivo* близок и определяется, в основном, действием дипептидилкарбоксипептидаз (около 70%). Продукты действия дипептидиламинопептидаз и аминопептидаз составляют около 20 и 10% соответственно. Таким образом, в протеолизе Селанка *in vivo* аминопептидазы играют несколько большую роль, чем в его биодеградации *in vitro* в плазме крови.

Эндогенная опиоидная система организма является одной из важнейших регуляторных систем организма. Она включает в себя опиоидные пептиды и соответствующие им опиоидные рецепторы, а также энкефалиназы и ингибиторы энкефалиназ. Большинство функций эндогенной опиоидной системы являются регуляторными, направленными на поддержание гомеостаза в организме. Функционирование этой системы включает регуляцию болевой чувствительности, эмоциональной сферы, процессов обучения, памяти, терморегуляции, секреции гормонов, деятельности дыхатель-

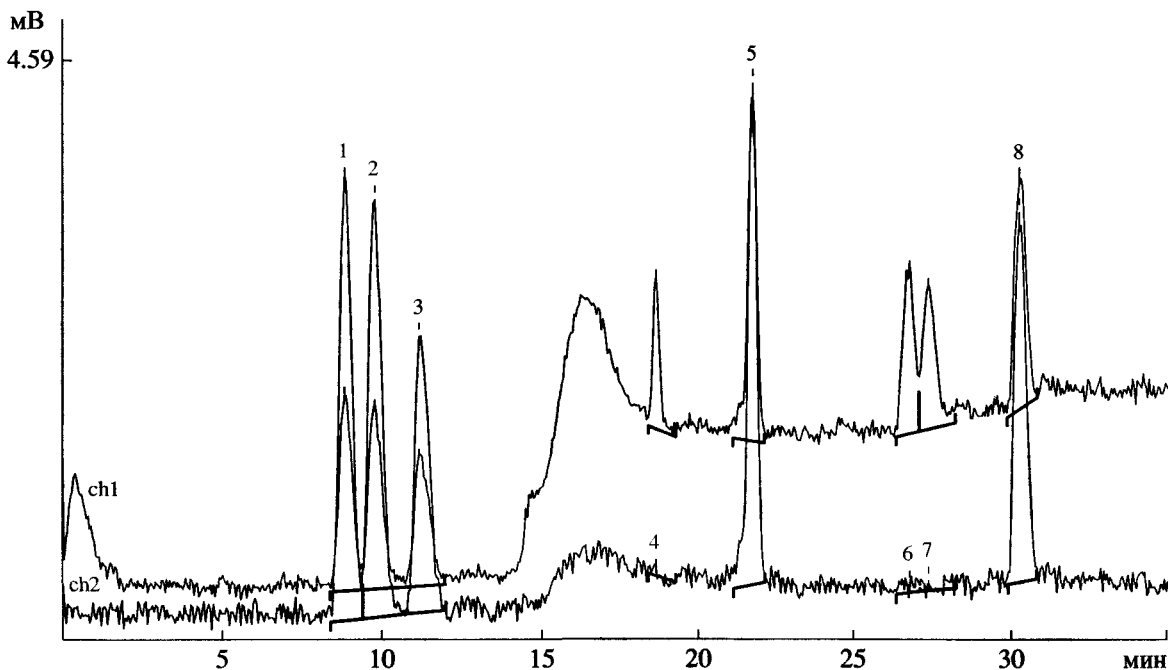


Рис. 2. Исследование биodeградации [Leu]энкефалина в плазме крови *in vitro* в присутствии 40 мкМ гептапептида Семакс. Хроматография смеси [Leu]энкефалина, его пептидных фрагментов (по 5 мкг) и пептидной фракции, экстрагированной из образца плазмы, содержащей $G\text{-}^3\text{H}$, [Leu]энкефалин и продукты его биodeградации. Градиентное элюирование ацетонитрилом в 0.1% смеси гептафтормасляной и трифторуксусной кислоты, ch1 – 254 нм; ch2 – 280 нм; 1 – YGG; 2 – Y; 3 – YG; 4 – GGF; 5 – YGGF; 6 – GGFL; 7 – GFL; 8 – YGGFL.

ной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и иммунной систем. Кроме того, известно, что ферменты, гидролизующие эндогенные опиоидные пептиды, в частности энкефалиназы, в той или иной мере участвуют в деградации других регуляторных пептидов, таких, как вещество P, брадикинин, ангиотензин. Поэтому ингибиторы энкефалиназ могут влиять на физиологические функции, напрямую не связанные с эндогенной опиоидной системой, например, кровяное давление или частоту сердечных сокращений.

В этом сообщении приводятся данные по ингибирующему влиянию Семакса на активность энкефалиназы плазмы крови крысы. Энкефалиназную активность определяли по скорости накопления продуктов ферментативной деградации [Leu]энкефалина (YGGFL) [18]. Определение концентрации [Leu]энкефалина и продуктов его пептидазной деградации основано на использовании равномерно меченного тритием [Leu]энкефалина, данные по распределению метки в котором получены с помощью спектроскопии ЯМР [12]. Методом ВЭЖХ исследовали состав смеси меченых пептидов, образующихся при его биodeградации (рис. 2).

Реакцию ферментативного гидролиза проводили, достигая 20–80% конверсии исходного [Leu]энкефалина. Радиоактивные продукты из [Leu]энкефалина образуются по четырем путям, но основ-

ным является действие аминопептидаз – на их долю приходится около 90% активности (табл. 5). Такой характер биodeградации находится в соответствии с результатами по биodeградации [Leu]энкефалина в плазме человека, полученными ранее этим же методом [16]. В присутствии Семакса происходит существенное уменьшение скорости гидролиза [Leu]энкефалина. При его концентрации, равной 40 мкМ, скорость гидролиза [Leu]энкефалина в разведенной плазме крови крысы уменьшается примерно в 2 раза. Основной вклад в изменение энкефалиназной активности плазмы крови крысы вносит ингибирование аминопептидазы, так как в присутствии Семакса концентрация пептида $[^3\text{H}]YGGF$ и тирозина, образующиеся при ее участии, уменьшается также примерно в 2 раза. Судя по незначительному уменьшению концентрации других меченых пептидов, Семакс не оказывает большого влияния на активность других ферментов плазмы крови, принимающих участие в гидролизе [Leu]энкефалина.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что равномерно меченные тритием пептиды позволяют эффективно исследовать кинетику и пути превращений пептидов *in vivo* и *in vitro*. Высокая молярная радиоактивность меченых пептидов, полученных с использованием реакции ВТКИО,

Таблица 5. Влияние Семакса на скорость биодеградации [Leu]энкефалина (YGGFL) в плазме крови крысы по данным хроматографического анализа [G-³H, Leu]энкефалина и его фрагментов*

Номер пика	Пептид**	Время инкубации, мин					
		8		16		32	
		А	Б	А	Б	А	Б
1	YGG	0.07	0.07	0.24	0.32	0.15	0.25
2	Y	1.26	0.76	3.02	1.18	5.44	2.73
3	YG	0.02	0.02	0.10	0.12	0.07	0.12
4	GGF	0.05	0.01	0.44	0.02	0.17	0.04
5	YGGF	0.03	0.03	0.15	0.09	0.12	0.15
6	GGFL	1.15	0.74	2.28	1.08	4.48	2.27
7	GFL	0.18	0.06	0.15	0.07	0.38	0.28
8	YGGFL [Leu]энкефалин	5.64	6.23	3.65	5.25	1.45	4.27
Конверсия YGGFL, %		20	11	48	25	79	39

* Приведена концентрация [Leu]энкефалина и продуктов его пептидазной биодеградации (мкМ) в 5-кратно разведенной буфером плазме – А; то же самое в присутствии 40 мкМ Семакса – Б.

** Порядок расположения пептидов соответствует порядку их выхода при хроматографии (рис. 2).

дает возможность эффективно использовать их в исследованиях пептидэргических систем.

но меченные тритием пептиды МЕНFPGP и PGP с молярной радиоактивностью 45 и 80 Ки/моль соответственно.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Твердофазный изотопный обмен водорода в пептидах на тритий

Пептиды в количестве 1.0 мг растворяли в 1 мл воды и смешивали с 20 мг окиси алюминия (Serva). 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, вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 1.84 Па и выдерживали при 140–190°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 досуха. Очистку меченных тритием пептидов проводили последовательно на колонках Kromasil C18 (10 × 250 мм) и Nucleosil C18 (4 × 250 мм) в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты. Молярную радиоактивность пептида рассчитывали с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика. При 180°C получены равномерно меченные тритием пептиды ТКPRPGP и YGGFL с молярной радиоактивностью 110 и 50 Ки/моль соответственно. При 160°C получены равномерно

Подготовка образцов для проведения хроматографического анализа биодеградации меченых пептидов

Для изучения фармакокинетики меченных тритием пептидов эксперименты *in vivo* проводили на самцах беспородных крыс массой 200–250 г. Раствор анализируемого меченого пептида упаривали досуха и растворяли в физиологическом растворе. 20 мкл полученного раствора с концентрацией 25 мКи/мл интраназально вводили крысам. Крыс умерщвляли методом декапирования, исследуемые ткани извлекали в течение 1–1.5 мин и замораживали жидким азотом.

Фракции, содержащие меченые пептиды, выделяли с помощью экстракции органическими растворителями при дроблении в клеточном измельчителе. Для этого 1–2 г замороженной ткани помещали в клеточный измельчитель, добавляли 20 мл 90% ацетонитрила, содержащего 1% трифторуксусной кислоты и измельчали ее в течение 10 мин. Смесь центрифугировали при 4°C 15 мин при 12000 g. Отбирали супернатант и высушивали его в роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 1 мл метанола. Центрифугировали при тех же условиях, супернатант снова высушивали в роторном испарителе, сухой остаток растворяли

в 100 мкл 0.1% TFA и замораживали. Хранили при -20°C .

Для изучения биodeградации меченных тритием пептидов (эксперименты *in vitro*) анализируемый образец упаривали досуха, растворяли в физиологическом растворе и раствор с концентрацией 10 мКи/мл использовали для инкубации. После инкубации к образцу объемом 10–200 мкл прибавляли 10-кратный объем 90% ацетонитрила, содержащего 1% трифторуксусной кислоты. Смесь центрифугировали при 4°C 15 мин при 12000 g. Дальнейшую обработку проводили как описано для анализа фармакокинетики меченных тритием пептидов *in vivo*.

Для анализа биodeградации PGP 50 мКи ^{3}H PGP инкубировали в 150 мкл плазмы крови человека, после чего прерывали реакцию протеолиза, экстрагировали из плазмы пептидную фракцию и выделяли фракции PGP, GP и PG с помощью ВЭЖХ.

Исследование биodeградации Семакса в присутствии нейрональных клеток in vitro

Первичную диссоциированную культуру нейронов базальных ядер переднего мозга крысы получали из 16–18-дневных эмбрионов по методике [28]. Беременных крыс линии Sprague-Dowley массой 200–300 г умерщвляли методом углекислотной асфикции (15 мин) и помещали на 1 мин в 80% водный этанол. Выделенный из эмбриона мозг в асептических условиях диссоциировали на отдельные клетки механически с помощью пипетирования. Культивирование первичных нейронов проводили в 24-луночных планшетах (500×10^3 клеток на лунку) в среде, содержащей 6 г/л D-глюкозы, 2 мМ прогестерон, 25 мг/л инсулина, 100 мг/л путресцина и 30 нМ селенит натрия. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 и 95% воздуха. В инкубационную смесь вводили 440 нМ ^{3}H Семакс с удельной активностью 45 Ки/моль. Инкубационную среду отбирали, кипятили в течение 2 мин, охлаждали до 4°C и центрифугировали при 4°C 15 мин при 15000 g. Супернатанты хранили при -20°C .

Анализ биodeградации пептидов с использованием ВЭЖХ

Методика определения содержания меченого пептида и его метаболитов основана на определении радиоактивности хроматографических пиков соответствующих немеченых фрагментов, предварительно введенных в исследуемый образец перед разделением и выделенных по данным УФ-детекции (масса меченого пептида и его ^{3}H метаболитов, подвергнутых хроматографическому разделению по данной методике, слишком мала для их непосредственного наблюдения с

помощью УФ-детекции). Разделение смеси пептидных фрагментов проводили методом ВЭЖХ на колонке Kromasil C18 – 5 μm (4×150 мм) при 20°C . В качестве детектора использовали спектрофотометр Beckman модели 165 (Altex) при одновременной детекции на длинах волн 254 и 280 нм.

Полученные образцы пептидных экстрактов из тканей (объем 40 мкл) смешивали с 30 мкл раствора исследуемого немеченого пептида и его метаболитов (по 5 мкг каждого пептида), подвергали градиентному элюированию и определяли радиоактивность продукта каждого из пиков. Содержание $[\text{G-}^3\text{H}]$ пептида и его метаболитов в ткани определяли из данных по содержанию радиоактивности в пептидной фракции и молярной радиоактивности соответствующего фрагмента, рассчитанной из распределения метки в пептиде.

Хроматографическое разделение $[\text{G-}^3\text{H}]$ Семакса и его пептидных фрагментов биodeградации проводили методом ВЭЖХ на той же колонке при 20°C как описано в работе [16]. Для хроматографического анализа $[\text{G-}^3\text{H}]$ Селанка и его пептидных фрагментов использовали градиентное элюирование ацетонитрилом 15–35%, содержащим 0.1% гептафтормасляной кислоты за 20 мин (рис. 1).

Хроматографический анализ меченого тритием $[\text{Leu}]$ энкефалина проводили в смеси элюента А (5% ацетонитрил, содержащий 0.05% трифторуксусной кислоты и 0.05% гептафтормасляной кислоты) и В (30% ацетонитрил в элюенте А). Использовали градиент В в А: от 0 до 10% за 10 мин, от 10 до 50% за 12 мин, от 50 до 100% за 40 мин при скорости потока 1 мл/мин (рис. 2). Для хроматографического анализа $[\text{G-}^3\text{H}]$ PGP использовали градиентное элюирование ацетонитрилом 2–15%, содержащим 0.1% трифторуксусной кислоты за 20 мин, при скорости потока 1 мл/мин.

Влияние Семакса на энкефалиназную активность пептидаз плазмы крови крысы. Энкефалиназную активность определяли по скорости накопления продуктов ферментативной деградации $[\text{G-}^3\text{H}, \text{Leu}]$ энкефалина по модифицированной методике [16]. Инкубационная смесь (конечный объем 125 мкл) содержала 25 мкл 5-кратно разведенной гепариновой плазмы крысы, 100 мкл буфера 10 мМ Трис- HCl (pH 7.5) с 150 мМ NaCl , 44 мКи $[\text{G-}^3\text{H}, \text{Leu}]$ энкефалина (удельная активность 50 Ки/ммоль) и исследуемый пептид с концентрацией 40 мМ. Инкубацию проводили при 37°C , отбирали по 10 мкл раствора и останавливали биodeградацию добавлением к 100 мкл 90% ацетонитрила, содержащего 0.1% трифторуксусной кислоты.

Работа поддержана Программой РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантом РФФИ № 05-03-32411.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шишков А.В., Филатов Э.С., Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Гольданский В.И., Несмеянов Ан.Н. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 228. С. 1237–1239.
2. Шишков А.В., Баратова Л.А. // Успехи химии. 1994. Т. 63. С. 825–841.
3. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 12892–12897.
4. Shishkov A.V., Goldanskii V.I., Baratova L.A., Fedorova N.V., Ksenofontov A.L., Zhirnov O.P., Galkin A.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 7827–7830.
5. Золотарев Ю.А., Козик В.С., Зайцев Д.А., Дорохова Е.М., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. С. 1146–1151.
6. Zolotarev Yu.A., Kozic V.S., Zaitsev D.A., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // J. Radioanal. Nucl. Chem. Art. 1992. V. 162. P. 3–14.
7. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Борисов Ю.А. // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31. С. 3–21.
8. 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.
9. Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // J. Phys. Chemistry A. 1999. V. 103. P. 4861–4864.
10. Золотарев Ю.А., Ласкателев Е.В., Козик В.С., Дорохова Е.М., Розенберг С.Г., Борисов Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 1997. № 4. С. 757–762.
11. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Dorokhova E.M., Kozik V.S., Vtyurin N.N., Vocharov E.V., Ziganshin R.N., Lunina N.A., Kostrov S.V., Ovchinnikova T.V., Myasoedov N.F. // Bioorg. Chem. 2003. V. 31. P. 453–463.
12. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Vocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 2003. V. 24. P. 325–333.
13. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Васьяковский Б.В., Кост Н.В., Гаранин С.К., Макаренко В.П., Мясоедов Н.Ф. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 512–515.
14. Золотарев Ю.А., Бочаров Э.В., Дадаян А.К., Кашеверов И.Е., Жмак М.Н., Масленников И.В., Борисов Ю.А., Арсеньев А.С., Мясоедов Н.Ф., Цетлин В.И. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 587–592.
15. Navolotskaya E.V., Kovalitskaya Yu.A., Zolotarev Yu.A., Kudryashova N.Yu., Goncharenko E.N., Kolobov A.A., Kampe-Netm E.A., Malkova N.V., Yurovsky V.V., Lipkin V.M. // Peptides. 2003. V. 24. P. 1941–1946.
16. Долотов О.В., Золотарев Ю.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 241–246.
17. Сафарова Э.Р., Шрам С.И., Золотарев Ю.А., Мясоедов Н.Ф. // Бюл. экспер. биол. 2003. Т. 135. С. 309–313.
18. Золотарев Ю.А., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Васьяковский Б.В., Мясоедов Н.Ф., Зозуля А.А. // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. С. 234–240.
19. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Kozik V.S., Myasoedov N.F. Proceedings of the Eighth Intern. Symp. "Solid Phase Synthesis" Mayflower Worldwide Limited, Kingswinford, England Roger Epton (ed.), 2004. P. 325–326.
20. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Антонова Л.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н., Каменский А.А., Ашмарин И.П. // Хим.-фарм. журн. 1984. № 7. С. 790–795.
21. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. // Молекул. биология. 1999. Т. 33. С. 120–126.
22. Shadrina M.I., Dolotov O.V., Grivennikov I.A., Slominsky P.A., Andreeva L.A., Inozemtseva L.S., Limborska S.A., Myasoedov N.F. // Neurosci. Lett. 2001. V. 308. P. 115–118.
23. Долотов О.В., Середенина Т.С., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Нагаев И.Ю., Золотарев Ю.А., Гривенников И.А., Энгле Ю., Мясоедов Н.Ф. // Докл. АН. 2003. Т. 391. С. 131–134.
24. Ашмарин И.П., Самонина Г.Е., Желязник Н.Я., Бакаева З.В. // Докл. АН. 1999. Т. 368. С. 709–710.
25. Samonina G., Ashmarin I., Lyapina L. // Pathophysiol. 2002. V. 8. P. 229–234.
26. Жуйкова С.Е., Бадаева К.Е., Самонина Г.Е., Плесская Л.Г. // Эксп. клин. гастроэнтерол. 2003. № 4. С. 88–92.
27. 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.
28. Hefti F., Hartikka J., Sanchez-Ramos J. // Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System / Eds Shaha A., de Vellis J.A. New York: Wiley-Liss, 1989. P. 172–182.

Evenly Tritium-Labeled Peptides in Study of Peptide In Vivo and In Vitro Biodegradation

Yu. A. Zolotarev^{a,*}, A. K. Dadayan^a, O. V. Dolotov^a, V. S. Kozik^a, N. V. Kost^b, O. Yu. Sokolov^b,
E. M. Dorokhova^a, V. K. Meshavkin^b, L. S. Inozemtseva^a, M. V. Gabaeva^b, L. A. Andreeva^a,
L. Yu. Alfeeva^a, T. S. Pavlov^c, K. E. Badmaeva^{***}, S. E. Badmaeva^c, Z. V. Bakaeva^c,
G. N. Kopylova^c, G. E. Samonina^c, B. V. Vaskovsky^d, I. A. Grivennikov^a,
A. A. Zozulya^b, and N. F. Myasoedov^a

* Phone: +7 (495) 196-0213; fax: +7 (495) 196-0221; e-mail: zolya@img.ras.ru

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

^b National Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences,
Kashirskoe sh. 34, Moscow, 115522 Russia

^c Biological Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 117234 Russia

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

Biologically active peptides evenly labeled with tritium were used for studying the in vitro and in vivo biodegradation of the peptides. Tritium-labeled peptides with a specific radioactivity of 50–150 Ci/mmol were obtained by high temperature solid phase catalytic isotope exchange (HSCIE) with spillover tritium. The distribution of the isotope label among all amino acid residues of these peptides allows the simultaneous determination of practically all possible products of their enzymatic hydrolysis. The developed analytical method includes extraction of tritium-labeled peptides from organism tissues and chromatographic isolation of individual labeled peptides from the mixture of degradation products. The concentrations of a peptide under study and the products of its biodegradation were calculated from the results of liquid scintillation counting. This approach was used for studying the pathways of biodegradation of the heptapeptide TKPRPGP (Selank) and the tripeptide PGP in blood plasma. The pharmacokinetics of Selank, an anxiolytic peptide, was also studied in brain tissues using the intranasal in vivo administration of this peptide. The concentrations of labeled peptides were determined, and the pentapeptide TKPRP, tripeptide TKP, and dipeptides RP and GP were shown to be the major products of Selank biodegradation. The study of the biodegradation of the heptapeptide MEHFPGP (Semax) in the presence of nerve cells showed that the major products of its biodegradation are the pentapeptide HFPGP and tripeptide PGP. The enkephalinase activity of blood plasma was studied with the use of evenly tritium-labeled [Leu]enkephalin. A high inhibitory effect of Semax on blood plasma enkephalinases was shown to arise from its action on aminopeptidases. The method, based on the use of evenly tritium-labeled peptides, allows the determination of peptide concentrations and the activity of enzymes involved in their degradation on a μg scale of biological samples both in vitro and in vivo.

The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2006, vol. 32, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

Key words: enkephalinases of blood plasma, peptidase inhibitors, peptide biodegradation, peptides labeled with tritium, Selank, Semax