

УДК 612.82.015.348.017.1—08

## ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИСЫВОРОТОК К ОПИОИДНЫМ ПЕПТИДАМ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИХ СОЕДИНЕНИЙ

ДМИТРИЕВ А. Д., ГОЛИКОВА Ю. И., КОБЫЛЯНСКИЙ А. Г.,  
САМОВИЛОВА Н. Н., ТРУШИНА Е. Д., ЯРЫГИН К. Н.,  
БЕСПАЛОВА Ж. Д., АЗЬМУКО А. А., САКС Т. Р.

Антисыворотки к синтетическим лейцин- и метионин-энкефалинам, а также  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -эндорфинам получены путем многократной иммунизации кроликов олигопептидами, которые были ковалентно связаны с бычьим сывороточным альбумином с помощью бис-диазотированного бензида. Лучшие антисыворотки использовались для радиоиммунологического определения пептидов в конечном разведении от 1:4000 до 1:48000. Чувствительность методов—менее 10 пг в пробе. Все антисыворотки характеризовались высокой специфичностью и давали минимальную перекрестную реакцию с энкефалинами, эндорфинами и  $\beta$ -липотропином. Показано, что экстракты мозга и соответствующий опиоидный пептид одинаковым образом вытесняют  $^{125}\text{I}$ -пептид из его комплекса со специфической антисывороткой.

Энкефалины и эндорфины—группа пептидов с опиоидными свойствами, которые были выделены из экстрактов мозга [1—4]. Эндорфины по своей первичной структуре соответствуют фрагментам 61—76 [2], 61—91 [3, 4], 61—77 [5] и 61—87 [4]  $\beta$ -липотропина и обозначаются  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\sigma$ -эндорфины соответственно. Met-энкефалин также является фрагментом 61—65  $\beta$ -липотропина [3, 4]. Кроме того, описаны высокомолекулярные предшественники Leu- и Met-энкефалинов, отличные от  $\beta$ -липотропина [6—9]. Для определения опиоидных пептидов были предложены конкурентные методы, основанные на способности этих соединений связываться с опиатными рецепторами мозга [10, 11]. Однако в экстрактах тканей эти методы позволяют определять лишь сумму опиоидных пептидов. В настоящее время разработаны радиоиммунологические методы определения энкефалинов и эндорфинов [12—17], но в некоторых случаях используемые антисыворотки характеризовались низкой специфичностью [15, 18]. Антисыворотки к Leu- и Met-энкефалинам, а также  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -эндорфинам, описанные в настоящей работе, при их использовании для радиоиммунологического определения сочетают высокую чувствительность и специфичность в отношении  $\beta$ -липотропина и его фрагментов.

## Материалы и методы

*Синтез пептидов и тестирование их биологической активности.* Опиоидные пептиды (Leu-энкефалин, Met-энкефалин,  $\alpha$ -эндорфин и  $\gamma$ -эндорфин) были получены классическими методами пептидной химии [19]. Гомогенность пептидов проверялась с помощью тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза на бумаге [19]. Биологическую активность пептидов определяли, используя классические тесты с семьявыводящим протоком мышли и подвздошной кишкой морской свинки. Определялась также анальгезирующая активность пептидов [20, 21]. Кроме того, тестировалась способность всех пептидов конкурировать с  $^3\text{H}$ -налоксоном за связывание с рецепторами опиатов мозга крысы [22].

*Получение иммуногенных конъюгатов.* Конъюгацию эндорфинов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) проводили с помощью бисдиазотированного бензидина (БДБ) [23]. Молярное отношение пептид: БСА: БДБ в инкубационной смеси равнялось 20:1:40. Опиоидные пептиды, БСА и БДБ смешивали в 5—10 мл 0,16 М боратного буфера pH 9 с 0,15 М NaCl. К инкубационной смеси добавляли  $10^6$  имп/мин соответствующего  $^{125}\text{I}$ -пептида. Реакцию проводили в ледяной бане 1 ч; связывание пептида с БСА оценивали по убыли радиоактивности [ $^{125}\text{I}$ ], связывающейся с углем; аликвоту инкубационной смеси объемом 5 мкл смешивали с 200 мкл суспензии угля (10 мг/мл) в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,5 с 0,2% БСА; после центрифугирования (1000 г, 10 мин) оценивали радиоактивность в супернатанте и осадке. Реакционную смесь анализировали при  $+4^\circ$  против дистиллированной воды до исчезновения в ней радиоактивности и еще 1 сутки против 0,15 М NaCl. Конъюгаты хранили при  $-40^\circ$  в пластиковых пробирках.

*Иммунизация кроликов.* Для первой иммунизации 1 мг конъюгата доводили до 1 мл 0,15 М NaCl, добавляли равный объем полного адьюванта Фрейнда и эмульгировали смесь путем обработки ультразвуком. По 0,2 мл эмульгата вкалывали в подушечку каждой из лап кролика, оставшуюся часть инъецировали подкожно в 10—12 точек спины. Последующие иммунизации проводили с месячным интервалом подкожно в 8—10 точек спины, используя 0,2—0,5 мг конъюгата в 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда.

*Радиоиммунологическое определение опиоидных пептидов.* Все компоненты инкубационной смеси растворяли в буфере: 0,05 М фосфат pH 7,5 с 0,15 М NaCl, 0,2% БСА и 0,02% азида натрия (РИО-буфер). Инкубационная смесь объемом 0,4 мл содержала:  $^{125}\text{I}$ -пептид— $10^5$  имп/мин в 0,1 мл, антисыворотку в соответствующем разведении—0,1 мл, стандартное количество эндорфина или неизвестный образец—0,1 мл, РИО-буфер—до 0,4 мл. Пробы инкубировали 18—24 ч при  $+4^\circ$ . Для отделения связавшихся с антителами энкефалинов, а также  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфинов от «свободных», к инкубационной смеси добавляли 0,1 мл нейтральной сыворотки, разведенной РИО-буфером в 5 раз и 0,5 мл насыщенного при  $+4^\circ$  раствора сульфата аммония. Через 30 мин про-

бы центрифугировали (2000 г, 0°, 15 мин) и регистрировали радиоактивность в осадках. Для осаждения связавшегося с антисывороткой  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -эндорфина в пробы добавляли 0,05 мл нейтральной сыворотки, разведенной в 100 раз, и 0,05 мл антисыворотки барана к  $\gamma$ -глобулину кролика. После инкубации в течение 18—24 ч при +4° пробы центрифугировали (2000 г, 0°, 20 мин) и определяли радиоактивность в осадках, используя  $\gamma$ -счетчик ЛКВ.

*Получение экстрактов мозга.* В опытах использовали беспородных крыс массой 120—150 г без учета пола. Немедленно после декапитации животных вскрывали черепную коробку, извлекали мозг, промывали его холодным 0,15 М NaCl, взвешивали и помещали в 0,2 М HCl (5—6 объемов по отношению к весу). Пробы прогревали в кипящей водяной бане 10 мин и размельчали на холоду в гомогенизаторе стекло-стекло. Экстракты центрифугировали (2000 г, 0°, 20 мин), осадок отбрасывали, а супернатант замораживали в жидком азоте. После оттаивания пробы нейтрализовали до pH 7 1 М NaOH с 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а супернатант использовали для радиоиммунологического определения опиоидных пептидов.

*Получение йодированных пептидов.* Опиоидные пептиды йодировали хлораминовым методом [14]. Йодированные пептиды отделяли от свободного [ $^{125}\text{I}$ ] гель-фильтрацией на Био-геле Р-2 [14].

### Результаты и обсуждение

При конъюгации Leu-энкефалина с БСА с помощью бис-дiazотированного бензидина около 60% олигопептида ковалентно связывалось с белком в течение часа (рис. 1), и дальнейшая инкубация не приводила к увеличению связывания. Для других опиоидных пептидов связывание также было близко к 60%. Учитывая молярное отношение компонентов реакции в инкубационной смеси, следует заключить, что 12 молекул пептида ковалентно связывалось с одной молекулой БСА, что составляло около 10 мкг Leu- и Met-энкефалинов, 30 мкг  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфинов и 60 мкг  $\beta$ -эндорфина на 100 мкг БСА. При использовании в качестве конъюгирующего агента карбодимида с БСА связывается около 6 молекул пептида [23]. БДБ связывает пептид с белком через остатки тирозина или гистидина; в молекулах энкефалинов,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфинов один остаток тирозина—Tyr<sup>1</sup>, в молекуле  $\beta$ -эндорфина верблюда, который использовался для приготовления иммуогенных конъюгатов, таких остатков два—Tyr<sup>1</sup> и His<sup>27</sup>. В то же время молекулы эндорфинов насчитывают несколько свободных карбоксил- и аммино-групп, через которые пептид связывается с белком при использовании карбодимида. Таким образом, конъюгация карбодимидом в сравнении с бис-дiazотированным бензидином приводит к большему разнообразию мест связывания эндорфинов с белком, что, по-видимому, уменьшает специфичность антисывороток, особенно в случае  $\beta$ -эндорфина.

Для получения антисывороток иммунизировали 12 кроликов:

двух—конъюгатами  $\gamma$ -эндорфина, по два животных конъюгатами энкефалинов и по три животных конъюгатами  $\alpha$ - и  $\beta$ -эндорфинов. У всех кроликов после пятой—седьмой иммунизации обнаруживались антитела к соответствующему олигопептиду. Лучшие сыворотки связывали 40—50%  $^{125}\text{I}$ -пептида в следующих конечных разведениях: антисыворотка (АС) № 80 к  $\alpha$ -эндорфину—1:40000, АС № 50 к  $\beta$ -эндорфину—1:6000, АС № 17 к Leu-энкефалину—1:8000, АС № 19 к Met-энкефалину—1:3200 и АС № 49 к  $\gamma$ -эндорфину—1:40000.

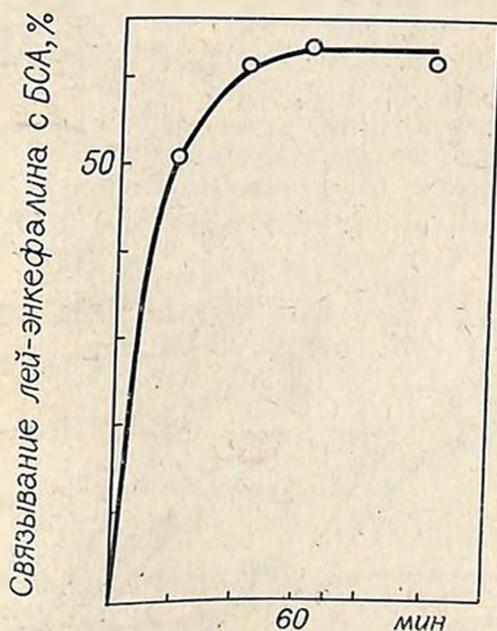


Рис. 1. Конъюгация Leu-энкефалина с бычьим сывороточным альбумином с помощью бис-диазотированного бензидаина. К 20 мкл инкубационной смеси, отобранным в указанный момент времени, добавляли 380 мкл 1% суспензии (вес/объем) смеси активированного угля с декстраном Т70 в отношении 9:1 в РИО-буфере. После центрифугирования регистрировали радиоактивность [ $^{125}\text{I}$ ] в осадке и супернатанте

Специфичность антисывороток определяли радиоиммунологическим методом. Рис. 2 иллюстрирует определение специфичности АС № 50 к  $\beta$ -эндорфину. Доза  $\beta$ -эндорфина, которая на 50% ингибирует связывание [ $^{125}\text{I}$ ]  $\beta$ -эндорфина с антисывороткой, составляла 200 пг. В той же системе  $\gamma$ -эндорфин подавлял связывание наполовину при концентрации 30 пг. Отношение дозы  $\beta$ -эндорфина, подавлявшей связывание наполовину, к соответствующей концентрации  $\gamma$ -эндорфина равнялось 0,8%. Эта величина и характеризует перекрестную реакцию АС № 50 к  $\beta$ -эндорфину в отношении  $\gamma$ -эндорфина. Сходным образом определялась специфичность всех исследованных антисывороток к эндорфинам в отношении  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и Des-Tyr<sup>1</sup>- $\gamma$ -эндорфинов, Leu- и Met-энке-

фаллинов и  $\beta$ -липотропина\*. Эти данные представлены в табл. 1. Можно видеть, что АС № 50 к  $\beta$ -эндорфину давал минимальную перекрестную реакцию с другими эндорфинами и практически нулевую с энкефалинами; ее перекрестная реакция с  $\beta$ -липотропином составляла 6,6%. Описанная система для радиоиммунологического определения  $\beta$ -эндорфина человека является гетерологичной: иммуногенные конъюгаты получали, используя  $\beta$ -эндорфин верблюда (фирма «Serwa»), а для йодирования и приготовления стандартов применяли  $\beta$ -эндорфин человека (фирма «Векстап»).  $\beta$ -Эндорфин верблюда в сравнении с  $\beta$ -эндорфином человека имеет две аминокислотных замены: гистидин в 27 положении заменен на тирозин и С-концевой глутамин—на глутаминовую кислоту. Несмотря на гетерологичность системы радиоиммунного тестирования, она характеризовалась высокой чувствительностью и специфичностью. Большинство описанных сывороток к  $\beta$ -эндорфину обладает гораздо худшей специфичностью, особенно в отношении  $\beta$ -липотропина [18]!

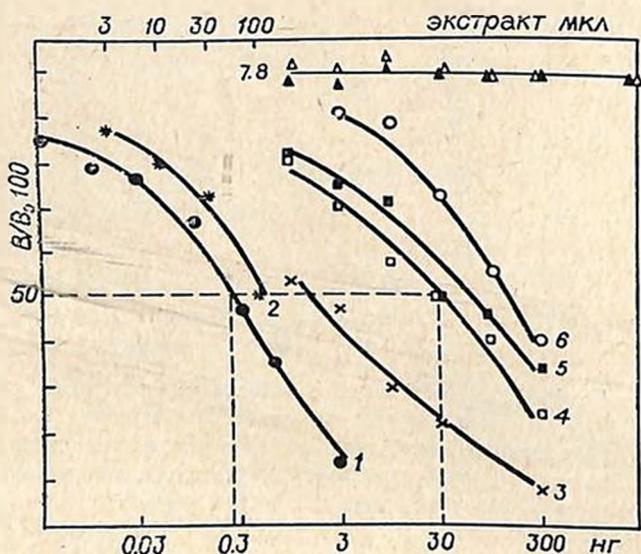


Рис. 2. Специфичность антисыворотки № 50 к  $\beta$ -эндорфину: 1— $\beta$ -эндорфин, 2—экстракт, 3— $\beta$ -липотропин, 4— $\gamma$ -эндорфин, 5—Des-Tyr<sup>1</sup>- $\gamma$ -эндорфин, 6— $\alpha$ -эндорфин, 7—Leu-энкефалин, 8—Met-энкефалин;  $B_0$ —связывание  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -эндорфина с антисывороткой в отсутствие конкурирующего агента;  $B$ —то же при определенной концентрации пептида или экстракта

Хорошей специфичностью характеризовалась АС № 80 к  $\alpha$ -эндорфину. Ее перекрестная реакция с  $\gamma$ -эндорфином равнялась 14% (табл. 1), хотя оба олигопептида отличаются лишь одним аминокислотным остатком на С-конце—Leu<sup>77</sup>  $\beta$ -липотропина. Des-Tyr<sup>1</sup>- $\gamma$ -эндорфин обладал той же перекрестной реакцией, что и  $\gamma$ -эндорфин, а для  $\beta$ -эндорфина

\*  $\beta$ -липотропин быка был любезно предоставлен проф. Ю. А. Папковым (Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов, Москва)

эта величина была значительно ниже и составляла 2,6%. Перекрестная реакция с энкефалинами и  $\beta$ -липотропином практически равнялась нулю.

Антисыворотка № 49 к  $\gamma$ -эндорфину также обладала высокой специфичностью и давала минимальную перекрестную реакцию с  $\alpha$ - и  $\beta$ -эндорфинами, энкефалинами и  $\beta$ -липотропином (табл. 1). Однако ее перекрестная реакция в отношении Des-Tyr<sup>1</sup>- $\gamma$ -эндорфина была очень высока и составляла 50%, что позволило определить сумму  $\gamma$ - и Des-Tyr<sup>1</sup>- $\gamma$ -эндорфинов.

Таблица 1

Пептид	Перекрестная реакция, %		
	Антисыворотка № 80 к $\alpha$ -эндорфину	Антисыворотка № 50 к $\beta$ -эндорфину	Антисыворотка № 49 к $\gamma$ -эндорфину
$\alpha$ -эндорфин	100	0,15	0,25
$\beta$ -эндорфин	2,6	100	4,4
$\gamma$ -эндорфин	14	0,8	100
Des-Tyr <sup>1</sup> - $\gamma$ -эндорфин	14,2	0,66	60
Leu-энкефалин	<0,02	<0,02	<0,02
Met-энкефалин	<0,02	<0,02	<0,02
$\beta$ -липотропин	0,34	6,6	0,5
Чувствительность 50% вытеснения*	2-5 пкг 30-50 пкг	5-10 пкг 150-200 пкг	2-5 пкг 30-50 пкг

Примечание. Специфичность рассчитывали, исходя из концентрации конкурирующих агентов, выраженной в единицах веса.

\* концентрация эндорфина, при которой на 50% ингибируется связывание 125I-эндорфина с соответствующей антисывороткой.

Таблица 2

Пептид	Перекрестная реакция, %	
	Антисыворотка № 17 к Leu-энкефалину	Антисыворотка № 19 к Met-энкефалину
Leu-энкефалин	100	5,8
Met-энкефалин	0,93	100
$\beta$ -эндорфин	<0,01	<0,1
$\beta$ -липотропин	<0,01	<0,1
Брадикинин	<0,01	<0,1
Чувствительность 50% вытеснения	3-5 пкг 30-50 пкг	100-200 пкг 1-3 пкг

См. пояснения к табл. 1.

Специфичность антисывороток к Leu- и Met-энкефалинам определяли в отношении следующих пептидов: энкефалинов,  $\beta$ -эндорфина,  $\beta$ -липотропина и брадикинина (табл. 2). Можно видеть, что АС № 17 к Leu-энкефалину давала перекрестную реакцию с Met-энкефалином (5,8%); перекрестная реакция в отношении  $\beta$ -эндорфина,  $\beta$ -липотропина и брадикинина была менее 0,03%. Антисыворотка № 19 к Met-эн-

кефалину характеризовалась более высокой специфичностью: ее перекрестная реакция в отношении Leu-энкефалина составляла 1%, а с другими пептидами — менее 0,1% (табл. 2).

Все антисыворотки помимо высокой специфичности характеризовались высокой чувствительностью и позволяли уверенно определять менее 10 пг пептида в пробе. Исключение составляла АС № 19 к Met-энкефалину: чувствительность метода при использовании этой антисыворотки не превышала 100 пг пептида в пробе; вероятно, при использовании двухстадийной инкубации [18] чувствительность метода несколько возрастет.

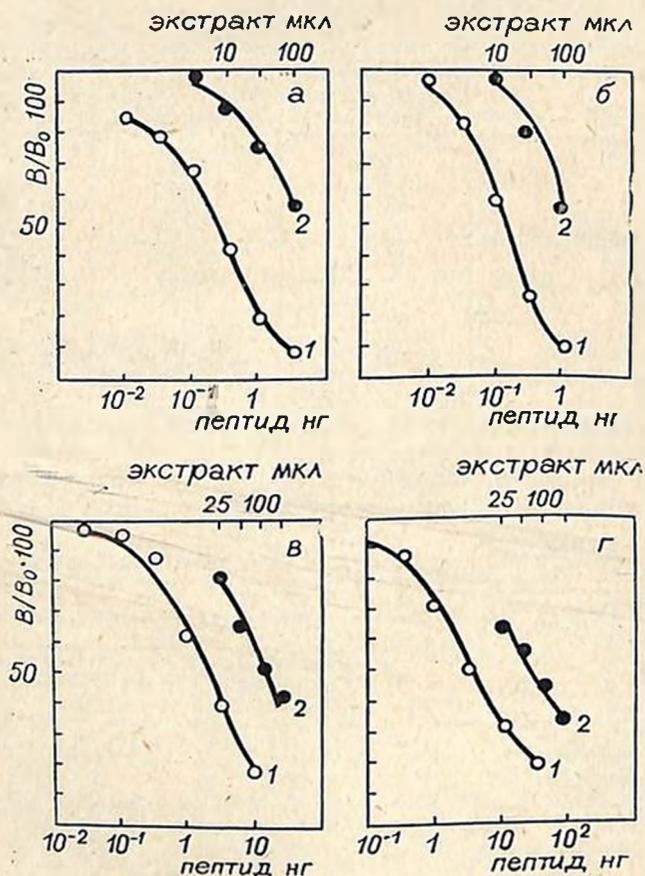


Рис. 3. Конкуренция экстрактов мозга крысы с  $^{125}\text{I}$ -опиатными пептидами за связывание со специфической антисывороткой:  $B_0$ —связывание  $^{125}\text{I}$ -пептида со специфической антисывороткой в отсутствие конкурирующего агента;  $B$ —то же при определенной концентрации синтетического пептида (1) или экстракта (2). а— $\alpha$ -эндорфин, б— $\gamma$ -эндорфин, в—Leu-энкефалин, г—Met-энкефалин

Пригодность сывороток для радиоиммунологического определения эндорфинов и энкефалинов в экстрактах мозга крысы оценивалась по их способности конкурировать с соответствующим  $^{125}\text{I}$ -пептидом за связывание со специфической антисывороткой. Рис. 2 и 3 иллюстри-

руют конкуренцию экстрактов с соответствующими  $^{125}\text{I}$ -пептидами. Можно видеть, что характер конкуренции синтетического пептида и экстрактов за связывание со специфической антисывороткой идентичен в случае  $\alpha$ - (рис. 3, а),  $\beta$ - (рис. 2) и  $\gamma$ -эндорфинов (рис. 3, б), а также Leu- и Met-энкефалинов (рис. 3, в и г соответственно). Подобный ход кривых конкуренции свидетельствовал о родственности или полной идентичности конкурирующей субстанции мозговых экстрактов с соответствующим синтетическим пептидом. Таким образом, полученные нами антисыворотки позволяют весьма специфично определять содержание энкефалинов и эндорфинов в нефракционированных экстрактах мозга.

## SPECIFIC ANTISERA TO OPIOID PEPTIDES: PREPARATION AND USING FOR RADIOIMMUNOASSAY OF THESE PEPTIDES

DMITRIEV A. D., GOLIKOVA U. I., KOPYLYANSKY A. G., SAMOVILOVA N. N., TRUSHINA E. D., YARYGIN K. N., BESPALOVA J. D., AZMUKO A. A., SAKS T. P.

Institute of Psychiatry of the USSR Academy of Medical Sciences, Research Laboratory of the USSR Ministry of Public Health, All-Union Cardiological Center of the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The preparation of highly specific antisera to synthetic Leu- and Met-enkephalins and  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -endorphins is described. Antisera were raised in rabbits by prolonged immunization using peptides conjugated to bovine serum albumine by bis-diazotized benzidine. The best antisera have been used for radioimmunoassay of peptides in final dilution from 1:4000 to 1:48000. The sensitivity of the assay was higher than 10 pg/tube for leu-enkephalin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -endorphin and 100 pg/tube for met-enkephalin. All antisera are characterized by high specificity and exhibit minimal cross-reactivity to enkephalins, endorphins and  $\beta$ -lipotropin. The inhibition of binding of  $^{125}\text{I}$ -peptides in the RIA by rat brain extract was parallel to the inhibition curve produced by the addition of unlabeled peptides.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Huges J. T., Smith T. V., Kosterlitz H. W., Fothergill Y. A., Morgan B. A., Morris H. R. *Nature*, 258, 577-579, 1975.
2. Guillemain R., Ling N., Burgus R. C. R. *Acad. Sci.*, 232, 783-785, 1976.
3. Li C. H., Ching D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1145-1148, 1976.
4. Bradbury A. F. D., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. M., Hulme E. C. *Nature*, 250, 793-795, 1976.
5. Bradbury A. F. D., Feldberg W. F., Smyth D. G., Snell C. R.—In: *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* (Kosterlitz H. W. ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 9-17, 1976.
6. Lewis R. V., Stern A. S., Kimura S., Rossier J., Stein S., Udenfriend S. *Science*, 203, 4451, 1459-1461, 1980.
7. Kimura S., Lewis R. V., Stern A., Rossier J., Stein S., Udenfriend S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1681-1685, 1980.
8. Brownstein M. J. *Nature*, 287, 678-679, 1980.

9. Goldstein A., Chazarossian V. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6207—6210, 1980.
10. Hazum E., Chang K. J., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem., 254, 1765—1767, 1979.
11. Stmantov R., Childers S. R., Snyder S. H. Brain Res., 135, 358—367, 1977.
12. Weissman B. A., Gershon H. FEBS Lett., 70, 245—248, 1976.
13. Yang H. Y., Hong G. S., Costa E. Neuropharmacology, 16, 303—307, 1977.
14. Miller R. G., Chang K., Cooper B., Cuatrecasas P. J. Biol. Chem. 253, 531—538, 1978.
15. Rossier J., Bayon A., Vargo T. M., Ling N., Guillemin R., Bloom F. Life Sci., 21, 847—852, 1977.
16. Jegon S., Tonon M. Ch., Leboulenger F., Delarue C., Vaudry H., Ling N. Biochem. Biophys. Res. Com., 83, 201—208, 1978.
17. Guillemin R., Ling N., Vargo T. Biochem. Biophys. Res. Com., 77, 361—366, 1977.
18. Rossier J., Vargo T. M., Minick S., Ling N., Bloom F. E., Guillemin R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5162—5165, 1977.
19. Methoden der organischen chemie synthese von peptiden (ed. Wuensch E.). Georg Thieme verlag, Stuttgart, 1974.
20. Alder M. W. Life Sci., 26, 497—510, 1980.
21. Opmeer F. A., Vanree J. M. Eur. J. Pharmacol., 53, 395—397, 1979.
22. Pert C. B., Snyder H. S. Mol. Pharmacol., 10, 868—879, 1974.
23. Bassiri R. M., Utiger R. D. Endocrinology, 90, 722—727, 1972.

Институт психиатрии АМН СССР,  
 Центральная научно-исследовательская  
 лаборатория Четвертого главного  
 управления при МЗ СССР,  
 Всесоюзный кардиологический центр  
 АМН СССР, Москва

Поступила 24. XI 1981