



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.82.015.348.017—08

МЕТОД ОТДЕЛЕНИЯ ПОДИРОВАННЫХ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ ОТ ИХ НЕМЕЧЕННЫХ ФОРМ С ПОМОЩЬЮ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ДМИТРИЕВ А. Д., ТЕННОВ А. В., *ГОЛИКОВА Ю. И., *КНЗНИМ Е. А.,
*КОБЫЛЯНСКИЙ А. Г., *САМОВИЛОВА Н. Н.

Институт клинической психиатрии Всесоюзного научного центра психического здоровья АМН СССР, *Центральная научно-исследовательская лаборатория IV Главного управления МЗ СССР, Москва.

В связи с актуальностью изучения распределения и содержания в организме опиоидных пептидов и их рецепторов весьма важной представляется дальнейшая разработка методов получения опиоидных ^{125}I -пептидов, пригодных для использования в качестве меченых лигандов в радиоиммунологических и радиорецепторных исследованиях.

При йодировании пептидов, в состав которых входит остаток тирозина, йод может замещать водород в орто-положениях по отношению к гидроксильной группе ароматического кольца тирозина, при этом образуются моно- и диiodформы олигопептидов [1]. Для биологических исследований особое значение имеет получение моноiodформ пептидов, поскольку диiodформы обладают меньшей иммунореактивностью [2], более слабой биологической активностью [3] и в некоторых случаях практически не связываются со специфическими мембранными рецепторами [3, 4]. При получении же моноiodформ посредством йодирования с большим по отношению к йоду молярным избытком пептида [5] его У. А. оказывается невысокой. В связи с этим особый интерес представляют методы отделения йодированных пептидов от их немеченых форм, для чего используются различные подходы. В частности, для получения моноiodформы D-Ala², D-Leu⁵-энкефалина (DADL) используют две последовательные хроматографии—на бюбеле Р-2 и на ДЭАЭ-сефадексе [4].

В настоящей работе предлагается метод выделения моноiodформ олигопептидов, имеющих свободные аминогруппы или остатки аргинина, сущность которого состоит в применении NOX на SP-сефадексе в градиенте концентрации ацетат-аммонийного буфера, выбранного в связи с возможностью его полной лиофилизации. Значения pH, при

которых проводили хроматографию, подбирали таким образом, чтобы при элюции градиентом 0,05 М—0,5 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ достигалось разделение свободного ^{125}I , немеченого пептида, а также моно- и дийодформ ^{125}I -пептида.

Все исследованные пептиды—Leu-, Met-энкефалины, α -, β - и γ -эндорфины* и DADL («Serva») —йодировали хлораминовым методом [1]. Йодирование останавливали, добавляя к инкубационной смеси 1 мл 0,05 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 3,5, содержащего 5% 2-меркаптоэтанола. Про-

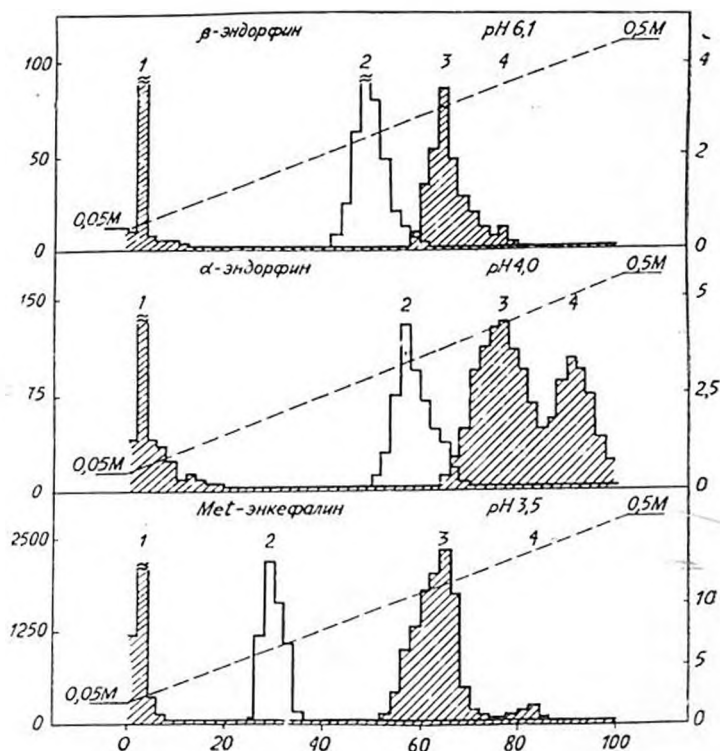


Рис. 1. Хроматография инкубационной смеси (после йодирования пептидов) на колонке с SP-сефадексом C-25 (1,2×5 см). Элюцию проводили градиентом концентрации 0,05 М—0,5 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ со скоростью 10 мл/ч (— — —). Объем фракции—2 мл. В отдельных опытах через колонку в тех же условиях пропускали немеченные опиоидные пептиды (□) и определяли их концентрации во фракциях радиоиммунологическим методом, [■]— ^{125}I -радиоактивность во фракциях. 1— ^{125}I , не включившийся в пептиды, 2—немеченные пептиды, 3—монойодформы ^{125}I -пептидов, 4—дийодформы ^{125}I -пептидов. По оси абсцисс—объем элюента (мл). По оси ординат: слева—концентрация пептидов (нг/мл), справа—включение ^{125}I (10^{-6} · пмп/мл)

бу наносили на колонку с SP-сефадексом C-25 (1,2×5 см), уравновешенным 0,05 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ с необходимым значением pH, не содержащим меркаптоэтанола. В случае β -эндорфина SP-сефадексе перед заполнением колонки выдерживали 1 ч в 1%-ном растворе бычьего сы-

* Пептиды были любезно предоставлены проф. М. И. Титовым (лаборатория синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР, Москва).

вороточного альбумина (БСА) в воде при pH 9,0 (pH 9,0 устанавливали аммиаком в суспензии сефадекса), затем БСА отмывали дистиллированной водой при pH 9,0, уравнивали сефадекс 0,05 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6,1 и после этого заполняли сефадексом предварительно силиконированную колонку.

Профили разделения меченых и немеченых форм некоторых опиоидных пептидов показаны на рис. 1 (хроматографию γ -эндорфина проводили при pH 4,0, а в случаях Лей-энкефалина и DADL использовали pH 3,5). При соответствующем подборе значения pH сначала элюируется свободный ^{125}I , не включившийся при йодировании в пептид (пик 1), далее последовательно элюируются немеченый пептид (пик 2), моно- и дийодформы ^{125}I -пептидов (пики 3 и 4 соответственно), причем все четыре пика хорошо разделяются. В связи с тем,

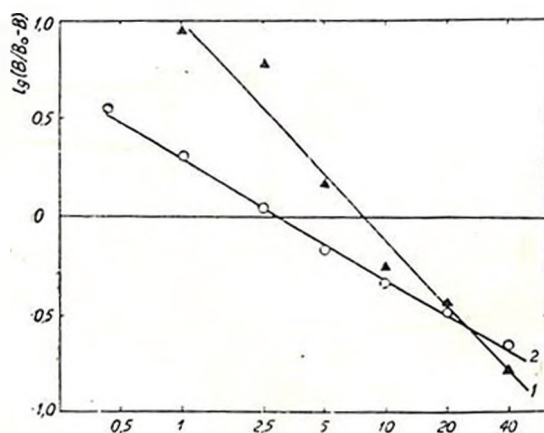


Рис. 2. Вытеснение меченого DADL из комплекса с опиоидными рецепторами мембран мозга крысы возрастающими концентрациями Мет-энкефалина. B_0 —количество меченого лиганда, связанного с рецепторами в отсутствие немеченого лиганда, B —то же при определенной концентрации немеченого лиганда. По оси абсцисс—концентрация Мет-энкефалина, нМ. 1— $[^3\text{H}]$ -DADL, 2— $[^{125}\text{I}]$ -DADL

что в этих условиях достигается практически полная очистка моноидформ ^{125}I -пептидов, их У. А. соответствует удельной радиоактивности используемого ^{125}I и составляет около 2000 Ки/ммоль.

Биологические свойства полученных моноидформ опиоидных пептидов оценивали по их способности связываться с избытком специфической антисыворотки, полученной путем иммунизации кроликов пептидами, ковалентно связанными с БСА бисдиазотированным бензидином [6]. Иммунореактивность ^{125}I -пептидов была при этом не ниже 90%. Пригодность меченых пептидов для использования в конкурентном анализе была проверена путем сравнения способности Мет-энкефалина вытеснять $[^{125}\text{I}]$ -DADL (полученный описанным методом) и $[^3\text{H}]$ -DADL («Amersham», Англия, У. А. 54 Ки/ммоль) из их комплекса с опиоидными рецепторами мембран мозга крысы [4]. Вытеснение 50% меченого лиганда из комплекса с мембранами для ^{125}I -пептида наблю-

далось при концентрации Met-энкефалина 3 нМ, тогда как концентрация, необходимая для вытеснения 50% ^3H -лиганда, была почти в три раза выше и составляла 8 нМ (рис. 2). Таким образом, йодированные пептиды, отделенные от их немеченых форм предлагаемым методом, могут успешно использоваться в радиорецепторном анализе.

Описанный хроматографический метод очистки ^{125}I -пептидов позволяет при небольших затратах ^{125}I получать моноидоформы опиоидных пептидов с У.А. около 2000 Ки/ммоль, имеющие иммунореактивность не менее 90% и пригодные для использования в радиоиммунологических и радиорецепторных исследованиях.

METHOD OF SEPARATION OF IODINATED OPIOID PEPTIDES FROM THEIR NONRADIOACTIVE FORMS BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

DMITRIEV A. D., TENNOV A. V., GOLIKOVA. U. I., KIZIM E. A.,
KOBLYANSKY A. G., SAMOVILOVA N. N.

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

The method of separation of iodinated opioid peptides from their nonradioactive forms by ion-exchange chromatography on SP-sephadex G-25 using $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ gradient is described. The method permits to obtain pure monoiodoforms of peptides with activity about 2000 Ci/mole. The immunoreactivity of the monoiodoforms of Leu-, Met-enkephalins and α -, β - and γ -endorphins thus obtained is $\geq 90\%$. The applicability of these ^{125}I -peptides for radioimmunological and radioreceptor studies is presented.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hunter W. M. Brit. Med. Bull., v. 30, p. 18—23, 1974.
2. Goodfriend T. L., O'day C. E.—In: Methods of hormon radio-immunoassay, p. 365—375. London—N. Y., Acad. Press, 1974.
3. Marshall J. C., Odell W. D. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 149, p. 351—355, 1975.
4. Miller R. J., Chang K. J., Leighton J., Cuatrecasas P. Life Sci., v. 22, p. 379—388, 1978.
5. Stadill F., Rehfeld J. F. Scand J. Clin. Lab. Invest., v. 30, p. 361—368, 1972.
6. Дмитриев А. Д., Голикова Ю. И., Кобылянский А. Г., Самовилова Н. Н., Трушина Е. Д., Ярыгин К. Н., Беспалова Ж. Д., Азьянко А. А., Сакс Т. Р. Нейрохимия, т. 1, с. 66—74, 1982.

Поступила 25. X. 1984