

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА ГРАФЕНА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА РЕАКЦИЮ АТОМОВ ТРИТИЯ С ДАЛАРГИНОМ

© 2020 г. М. Г. Чернышева*, В. А. Буняев, Г. А. Бадун**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра радиохимии, 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 10.

e-mail: *chernysheva@radio.chem.msu.ru; **badunga@yandex.ru

Получено 27.03.2019, после доработки 18.04.2019, принята к публикации 25.04.2019

В работе проведено изучение влияния углеродных подложек (оксид графена, восстановленный оксид графена, одностенные углеродные нанотрубки) на результат введения трития в пептид даларгин с помощью метода термической активации. Показано, что при нанесении даларгина на углеродные подложки существенно меняется распределение трития по аминокислотным остаткам по сравнению с толстой мишенью, нанесенной непосредственно на стеклянные стенки сосуда. Показано, что при нанесении монослоя даларгина на изученные углеродные материалы происходит существенное увеличение содержания трития в фенилаланине, что свидетельствует о протекании реакции изотопного обмена по электрофильному механизму. Также было обнаружено значительное изменение содержания трития в других аминокислотных остатках, что связано с различием структур адсорбционных слоев пептида, образующихся на рассматриваемых углеродных материалах.

Ключевые слова: Изотопный обмен, тритий, метод термической активации трития, даларгин

DOI: 10.31857/S0033831120020112

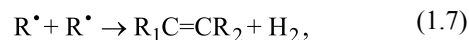
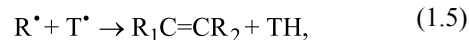
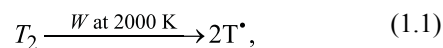
Использование радиоактивной метки позволяет изучать метаболизм различных веществ в живых организмах [1]. Среди радионуклидов биогенных элементов, применяемых для *in vitro* и *in vivo* исследований белков и пептидов, тритий имеет ряд несомненных преимуществ: период полураспада (12,3 лет) обуславливает высокую удельную радиоактивность однократно-меченных соединений 1 ПБк/моль и позволяет проводить достаточно длительные исследования; а низкая энергия β -частиц ($E_{\max} = 18.6$ кэВ) и отсутствие γ -квантов не требует использования защиты от внешнего облучения. Существует множество способов введения трития в органические молекулы, которые можно разделить на химические, которые описаны в обзорах [2–4] и исследовательских статьях [5–12], и физико-химические методы, включающие обработку вещества тритием в условиях высокочастотного разряда [13], плазмы [14], ионного пучка [15] и метод термической активации трития [16].

Метод термической активации трития, основы которого изложены в работе [17], позволяет вво-

дить радиоактивную метку в различные вещества и материалы, включая аминокислоты, пептиды, полимеры, вирусы и углеродные наноматериалы [17–19]. Ниже приведена схема (схема 1) протекающих в системе реакций:

Только реакции (1.2) и (1.4) приводят к получению меченого материнского соединения, в то

Схема 1. Радикальные реакции, протекающие при термической активации трития.



время как результатом остальных реакций является образование побочных продуктов или рекомбинация атомов трития [реакция (1.8)]. Вероятность протекания реакций зависит от условий проведения эксперимента, таких как температура вольфрамового катализатора, давление газа, время экспонирования, температура мишени-вещества. Распределение трития в молекулах определяется как химической природой групп, так и их стерической доступностью, что позволило использовать взаимодействие атомов трития с белками для исследования их пространственной организации – метод тритиевой планиграфии [20–22].

Для получения высокой радиоактивности меченого соединения требуется полное покрытие стеклянных стенок реакционного сосуда веществом, но часто это удается осуществить при использовании количества вещества много больше, чем требуется для равномерного монослойного покрытия. Как следствие не все молекулы вещества доступны для реакции с атомарным тритием, и не удается получить предельно высокую удельную радиоактивность меченого материнского соединения. Решением проблемы может быть предварительное нанесение вещества на подложки с развитой поверхностью.

Влияние подложки на выход меченого продукта ранее подробно не изучалось, однако в работе [23] проведено сравнение распределения трития в олигопептиде даларгин при активации реакции на вольфрамовой проволоке, а также палладии и платине, нанесенных на активированный уголь и малослойный графит. Было показано увеличение содержания трития в ароматических аминокислотных остатках при монослойном нанесении пептида на активированный уголь для двух способов активации реакции.

Для дальнейшего выявления влияния подложки на взаимодействие атомов трития с даларгином в данной работе использовали углеродные наноматериалы с разным содержанием функциональных групп и отличающихся структурой (оксид графена, восстановленный оксид графена, однослойные углеродные нанотрубки). Выбор даларгина обусловлен его строением – наличием ароматических и алифатических аминокислотных остатков, а также его важностью в биохимических процессах в организме [24–26].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

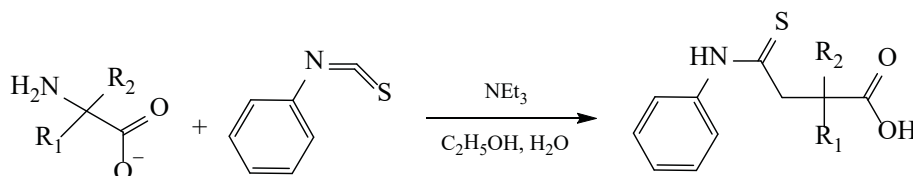
Материалы. В работе использовали олигопептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат (ООО «Эллара», Россия) коммерчески известный как даларгин (PubChem CID 6917894). Использовали одностенные углеродные нанотрубки и монослойный оксид графена компании CheapTubes. Удельная поверхность материалов, определенная по сорбции азота и рассчитанная по теории Брюнера–Эммета–Теллера, составила 570 и 60 м²/г для нанотрубок и оксида графена соответственно. Восстановленный оксид графена получали по методике, описанной ниже. Для приготовления суспензий и растворов использовали воду, очищенную с помощью системы Milipore.

Получение восстановленного оксида графена. Восстановление оксида графена проводили по модифицированной методике, описанной в работе [27]. 30 мг оксида графена суспендировали в 15 мл воды, добавляли 300 мг аспарагиновой кислоты, нагревали суспензию до 90°C и выдерживали при этой температуре 3 ч. По окончании реакции цвет суспензии менялся от исходно коричневого до черного. В качестве контроля проводили нагревание суспензии оксида графена без добавки аспарагиновой кислоты. В этом случае суспензия оставалась коричневой. Суспензию с восстановленным оксидом графена центрифугировали в течение 30 мин при 21000 об./мин. Осадок декантировали, промывали водой и высушивали.

Введение трития в даларгин. 1 мг даларгина растворяли в 6.7 мл метанола. К 1 мл раствора добавляли 5 мг углеродного материала и подвергали ультразвуковой обработке. Затем суспензию равномерно распределяли по стенкам реакционного сосуда и удаляли метанол током газа.

Сосуд с готовой мишенью присоединяли к специальной вакуумной установке для работы с газообразным тритием и заполняли протий-тритиевой смесью, содержащей 60% трития до давления 0.5 Па. Вольфрамовую проволоку, расположенную в центре реакционного сосуда, нагревали электрическим током до 1850 К в течение 10 с. Затем откачивали остаточный газ с помощью форвакуумного насоса, заполняли сосуд новой порцией газовой смеси и повторяли нагрев катализатора.

Схема 2. Получение дериватов аминокислот.



Материал диспергировали в воде, удаляли тритий из лабильных положений молекул двукратным упариванием с помощью роторного испарителя и повторного суспендирования в воде.

Анализ распределения трития в аминокислотных остатках даларгина. Проводили гидролиз даларгина без удаления с углеродных наноматериалов [28]. Высушенный углеродный материал с нанесенным пептидом суспендировали в смеси соляной и трифторуксусной кислот (2:1 по объему) с добавкой 0.001% β -меркаптоэтанола. Гидролиз проводили в запаянных стеклянных ампулах при 155°C в течение 1 ч. Отделяли гидролизат от углеродного материала и удаляли компоненты гидролизной смеси двукратной лиофилизацией.

Предколониальную дериватизацию аминокислот проводили по модифицированной методике [29]. Лиофильно высушенную смесь аминокислот растворяли в смеси этанол-триэтиламин 2:1 по объему и высушивали с помощью роторного испарителя. Затем растворяли аминокислоты в 100 мкл смеси этанол-триэтиламин-вода-фенилизотиоцианат 7:1:1:1 по объему и выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение ночи. Реакция дериватизации показана на схеме 2.

Жидкие компоненты реакционной смеси удаляли с помощью роторного испарителя при 40°C. Осадок растворяли в 0.5 мл воды и проводили экстракцию побочных продуктов реакции смесью гексан-этилацетат 7:1 по объему. При этом дериваты аминокислот оставались в водной фазе. Органическую фазу отбрасывали и экстракцию повторяли до тех пор, пока водная фаза не становилась прозрачной. Затем водный раствор упаривали с помощью роторного испарителя, осадок растворяли в 50 мкл воды и проводили анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с контролем радиоактивности выходящих фракций. Анализ проводили на колонке C_{18} (NovaPark), в качестве подвижной фазы использовали градиент буфера AccQ Tag Eluent (Waters) и 60% ацетонитрила в воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате обработки даларгина, нанесенного на углеродные наноматериалы, атомами трития в течение 10 с при температуре атомизатора 1850 К была достигнута удельная радиоактивность от 0.57 Ки/ммоль (оксид графена) до 0.84 Ки/ммоль (восстановленный оксид графена и нанотрубки). Значение удельной радиоактивности хотя и выше полученного для даларгина, нанесенного на активированный уголь (0.47 Ки/ммоль [30]), оно сильно уступает величинам, достигнутым при нанесении даларгина на стеклянные стенки реакционного сосуда (8.4 и 31 Ки/ммоль для температуры стенок 77 и 295 К [23]).

Наиболее высокая удельная радиоактивность даларгина была получена в работе [31] при использовании высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена, когда пептид наносили на Al_2O_3 , а в качестве активации реакции использовали нагрев системы до 140–190°C в течение 10–60 мин в присутствии 5% Rh/Al_2O_3 . При моделировании реакции на смеси водорода и трития в соотношении 1000:1 при температуре 190°C указана удельная радиоактивность 323 Ки/ммоль, хотя это значение кажется завышенным, так как молярная радиоактивность глицина 70 Ки/ммоль в составе пептида превышает теоретически достижимую. Эксперимент с тритием при 150°C позволил получить пептид с удельной радиоактивностью 52 Ки/ммоль.

Помимо величины удельной радиоактивности важно знать внутримолекулярное распределение трития, так как оно определяется механизмом изотопного обмена и зависит от химической природы вступающего в реакцию трития. Рассмотрим изменение этого параметра для различных подложек, на которые был нанесен пептид. Для удобства сопоставления результатов распределения трития по аминокислотным остаткам пептида используем нормирование удельной радиоактивности каждого остатка на удельную радиоактивность пептида,

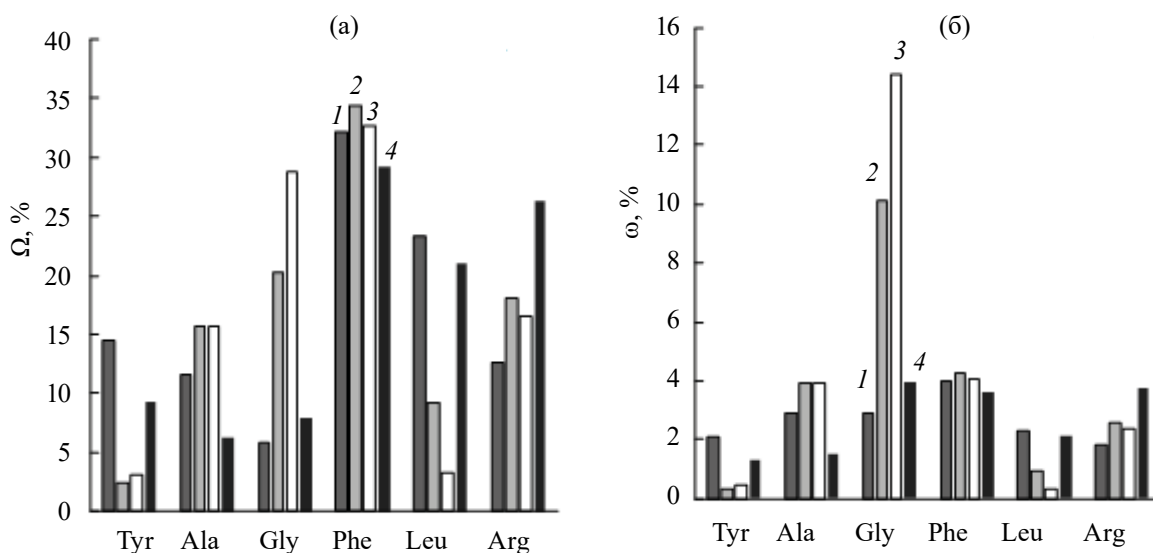


Рис. 1. Распределение трития в аминокислотных остатках даларгина на углеродных поверхностях: (1) активированный уголь по данным работы [23], (2) оксид графена, (3) восстановленный оксид графена, (4) одностенные углеродные нанотрубки: (а) нормирование удельной радиоактивности остатка на удельную радиоактивность пептида; (б) нормирование на число необменных атомов водорода (С–Н) в аминокислотном остатке.

определенную как сумму удельных радиоактивностей всех остатков:

$$\Omega = \frac{a_{\text{моль}_i}}{\sum_i a_{\text{моль}_i}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $a_{\text{моль}_i}$ удельная радиоактивность i -го аминокислотного остатка.

Для учета способности атомов водорода к изотопному обмену в составе различных остатков используем также нормировку на число необменных атомов водорода (С–Н) в аминокислотном остатке

$$\omega = \frac{a_{\text{моль}_i}}{n_i \sum_i a_{\text{моль}_i}} \times 100\%, \quad (3)$$

где n_i – число необменных атомов водорода в i -ом аминокислотном остатке.

На рис. 1а и 1б приведено распределение трития по аминокислотным остаткам даларгина в рассматриваемых единицах.

Важно отметить, что для всех использованных углеродных наноматериалов наблюдается высокое (от 29 до 34%) содержание трития в остатке фенилаланина. Ранее было показано, что при нанесении даларгина на стеклянные стенки в аналогичных условиях проведения эксперимента в фенилаланине содержится только 4% трития, а при использовании в качестве подложки активи-

рованного угля – 32%. В эксперименте, описанном в работе [31], в фенилаланине содержалось около 30% радиоактивности. Этим самым подтверждается, что при нанесении пептида разреженным монослоем на углеродные материалы реализуется электрофильный механизм реакции изотопного обмена, что связано с взаимодействием поступающих на мишень атомов с материалом подложки. В работе [23] высказано предположение, что присутствие значительного количества кислорода на поверхности активированного угля приводит или к поляризации атома трития, либо к образованию протона на поверхности активированного угля, за счет чего возрастает вероятность протекания реакции замещения по электрофильному механизму. То же самое можно сказать о поверхности оксида графена и восстановленного оксида графена. При попадании атома трития на углеродную поверхность происходит реакция с кислородными группами поверхности с образованием кислотных центров Бренстеда ($-\text{O}^3\text{H}$) [32], на которых возможен изотопный обмен по электрофильному замещению в ароматических аминокислотных остатках пептида. Таким образом, углеродная подложка, адсорбируя активированный тритий, влияет на механизм изотопного обмена. При образовании плотного слоя пептида на стекле реакция протека-

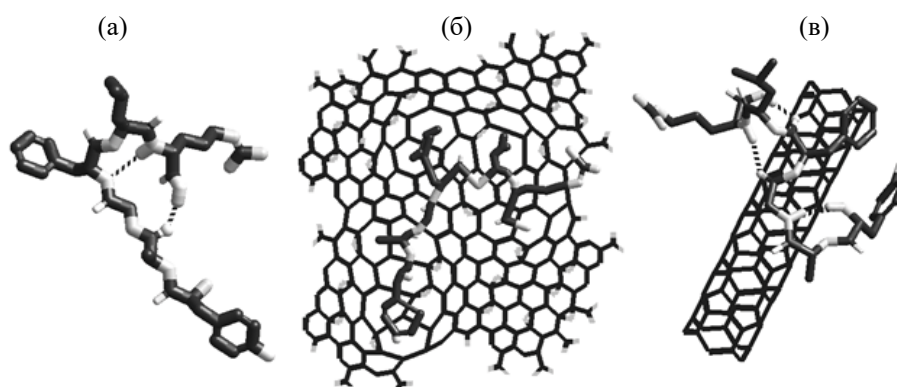


Рис. 2. Структура даларгина (а), и даларгина на углеродной поверхности: (б) оксид графена; (в) углеродные нанотрубки.

ет по радикальному механизму. Если стекло при температуре жидкого азота адсорбирует водород посредством образования химических или Ван-дер-Ваальсовых связей [33], то углеродная поверхность способствует перемещению активных форм водорода [34–37].

Важно отметить, что доля трития в остатке фенилаланина мало меняется для всех рассмотренных углеродных материалов. Вместе с тем обнаружено большое различие по включению трития в остатки глицина, лейцина и тирозина. При обработке атомами трития даларгина, нанесенного на оксид графена и восстановленный оксид графена, резко снижалась радиоактивность остатков лейцина и тирозина, но возрастала радиоактивность глицина. Такое синхронное снижение радиоактивности для алифатического и ароматического остатков нельзя объяснить только изменением механизма реакции из-за изменения химического состояния вступающего в реакцию трития. Вероятно, здесь может сказываться структурная организация молекул в адсорбционном слое.

Принимая во внимание площадь поверхности, занимаемую даларгином, равную 2.93 nm^2 (PubChem CID 6917894) и удельную поверхность углеродных материалов, можно оценить плотность покрытия: оксид графена покрывается монослоем даларгина, а в случае нанотрубок образуется ненасыщенный слой. Если молекулам даларгина доступно только $100 \text{ m}^2/\text{г}$ поверхности нанотрубок, то толщина образующегося слоя близка к монослою, что видится более реалистичным для молекул с молекулярной массой 725.8 г/моль .

Для оценки расположения даларгина на поверхности углеродных материалов провели моделирование методом молекулярной механики с помощью программы HyperChem 8.0 [38] в силовом поле AMBER. Результаты расчета приведены на рис. 2. Структура молекулы даларгина без участия подложки удерживается за счет образования внутримолекулярных водородных связей между остатками аргинина и глицина, а также остатками аргинина и фенилаланина. На поверхности оксида графена внутримолекулярные водородные связи заменяются водородные связи между кислородом поверхности и NH-группами аргинина, лейцина и тирозина. за счет этого молекула даларгина плоско «лежит» на поверхности оксида графена. Так как в остатке глицина расстояние между атомами азота и углерода карбонильной группы увеличивается от 2.49 \AA (свободная молекула) до 2.68 \AA (на оксиде графена), атомы водорода в остатке глицина становятся более доступны для взаимодействия с атомами трития, как поступающим из газовой фазы, так и диффундирующим по поверхности оксида графена. Также при адсорбции даларгина на поверхности оксида графена остатки фенилаланина и лейцина испытывают достаточное сильное взаимодействие с атомами подложки, что способствует изменению механизма реакции на электрофильный. Кроме того, из-за уменьшения угла между ароматическим кольцом фенилаланина и алкильным радикалом лейцина от 107° (свободная молекула) до 93° (на оксиде графена) возможно некоторое экранирование атомов водорода в остатках лейцина.

При контакте даларгина с углеродной нанотрубкой молекула «обворачивается» вокруг трубки (рис. 2в). На поверхности нанотрубок образуются внутримолекулярные водородные связи между остатками аргинина и фенилаланина, аргинина и глицина, а также тирозина и аланина. В результате все аминокислотные остатки не испытывают стерических и других затруднений для реакции с тритием и распределение трития по остаткам становится гораздо более равномерным.

Представленные данные показывают сложность процессов изотопного обмена трития при нанесении соединений мономолекулярным слоем на подложки. В результате взаимодействия атомов трития с углеродной подложкой они приобретают свойства протонов, которые могут вступать в реакцию изотопного обмена по механизму электрофильного замещения. Во фрагментах молекулы, не контактирующих с подложкой, возможен изотопный обмен по радикальному механизму. Поэтому для объяснения результатов необходимо учитывать межмолекулярные взаимодействия и структурную организацию адсорбционного слоя.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-33-20147-мол-а-вед).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee A.J. et al. // *Amino Acids.*, 2015. Vol. 47, № 5. P. 91.
2. Saljoughian M., Williams P. // *Curr. Pharm. Des.*, 2000. Vol. 6, № 10. P. 1029.
3. Myasoedov N.F. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 1993. Vol. 33, № 5. P. 391.
4. Lockley W.J.S. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2007. Vol. 50, № 5–6. P. 256.
5. Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Myasoedov N.F. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2010. Vol. 53, № 11–12. P. 693.
6. Kopylov A.T. et al. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2016. Vol. 30, № 11. P. 128.
7. Hickey M.J. et al. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2007. Vol. 50, № 5–6. P. 286.
8. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохим.*, 2012. Vol. 54, № 1. P. 75.
9. Kozłowska M., Kanski R., Kanska M. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2005. Vol. 48, № 3. P. 23.
10. Zhang Y. // *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2017. Vol. 60, № 13. P. 608.
11. Egan J.A., Filer C.N. // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* Springer Netherlands, 2016. Vol. 307, № 1. P. 549.
12. Pajak M. et al. // *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2018. Vol. 317, № 2. P. 643.
13. Нейман Л.А., Смоляков В.С., Шишков А.В. // *Итоги науки и техники.* Москва. Москва: Москва, 1985. P. 193.
14. Girard H.A. et al. // *Chem. Commun.*, 2014. Vol. 50, № 22. P. 2916.
15. Bush G.A. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1981. Vol. 256, № 23. P. 12213.
16. Филатов Э.С., Симонов Е.Ф. *Физико-химические и ядерно-химические способы получения меченых соединений и их идентификация.* Москва: Энергоатомиздат, 1987. 348 p.
17. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. // *Radiochim. Acta.*, 2012. Vol. 100, № 6. P. 401.
18. Badun G.A. et al. // *Radiochim. Acta.*, 2016. Vol. 104, № 8, P. 593.
19. Badun G.A. et al. // *Radiochim. Acta.*, 2014. Vol. 102, № 10. P. 941.
20. Tsetlin V.I. et al. // *Eur. J. Biochem.*, 1988. Vol. 178, № 1. P. 123.
21. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 1997. Vol. 94, № 24. P. 12892.
22. Bogacheva E.N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad. Sci.*, 1998. Vol. 95, № 6. P. 2790.
23. Разживина И.А. et al. // *Радиохимия.*, 2019. Vol. 61, № 1. P. 56.
24. Plotnikov E.Y. et al. // *Toxicol. Lett. Elsevier Ireland Ltd*, 2013. Vol. 220, № 3. P. 303.
25. Schroeder U., Sommerfeld P., Sabel B.A. // *Peptides.*, 1998. Vol. 19, № 4. P. 777.
26. Tadzhibova L.T. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011. Vol. 150, № 3. P. 304.
27. Tran D.N.H., Kabiri S., Losic D. // *Carbon N. Y. Elsevier Ltd*, 2014. Vol. 76. P. 193.
28. Chernysheva M.G. et al. // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2017. Vol. 520. P. 1.
29. Степанов К.В. et al. // *Вест. Моск. унив., Серия 2. Химия*, 2005. Vol. 46, № 6. P. 395.
30. Разживина И.А. // *Дисс. кан. хим. наук*, Москва, 2019.
31. Zolotarev Y.A. et al. // *Amino Acids.*, 2003. Vol. 24, № 3. P. 325.
32. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохим.*, 2018. Vol. 60, № 2. P. 97.
33. Филатов Э.С., Симонов Е.Ф., Орлова М.А. // *Усп. химии.*, 1981. Vol. 50, № 12. P. 1134.
34. Prins R. // *Chem. Rev.*, 2012. Vol. 112, № 5. P. 2714.
35. Lipson A.G. et al. // *Int. J. Hydrogen Energy. Elsevier Ltd*, 2012. Vol. 37, № 7. P. 5676.
36. Pham V.H. et al. // *J. Mater. Chem. A.*, 2013. Vol. 1, № 4. P. 1070.
37. Silambarasan D. et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2013. Vol. 5, № 21. P. 11419–11426.
38. Pazun J.L. // *J. Chem. Inf. Model.*, 1993. Vol. 33, № 6. P. 931.