

# ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ β-АЛАНИЛ-L-ГИСТИДИНА ИЗОТОПНЫМ ОБМЕНОМ

© 2022 г. В. П. Шевченко<sup>а,\*</sup>, И. Ю. Нагаев<sup>а</sup>,  
Н. Ф. Мясоедов<sup>а</sup>, С. Л. Стволинский<sup>б,\*\*</sup>

<sup>а</sup> Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Курчатова, д. 2

<sup>б</sup> Научный центр неврологии, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, д. 80.  
e-mail: \*nagaev@img.ras.ru, \*\*slstvolinsky@mail.ru

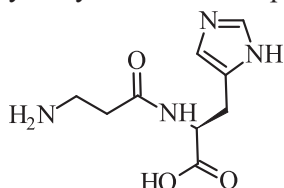
Поступила в редакцию 28.07.2022, после доработки 20.09.2022, принята к публикации 27.09.2022

Проведено сравнение эффективности изотопного обмена при использовании в качестве источника дейтерия газообразного дейтерия (без использования растворителя, твердофазный обмен) и дейтериевой воды. Установлено, что для получения меченого β-аланил-L-гистидина предпочтителен обмен с дейтериевой водой. При использовании твердофазного метода основная часть метки находится в гистидине. Распределение дейтерия при изотопном обмене с D<sub>2</sub>O получается более равномерным. Кроме того, использование дейтериевой воды позволяет уменьшить количество немеченого изотомера до 0.4% и получить препарат с выходом 40% (20 мг) и средним содержанием 3.6 атома дейтерия на молекулу карнозина. Можно предположить, что высокий выход и большее включение дейтерия связаны с предварительной обработкой реакционной смеси газообразным дейтерием.

**Ключевые слова:** β-аланил-L-гистидин (карнозин), дейтерий, синтез, меченые соединения.

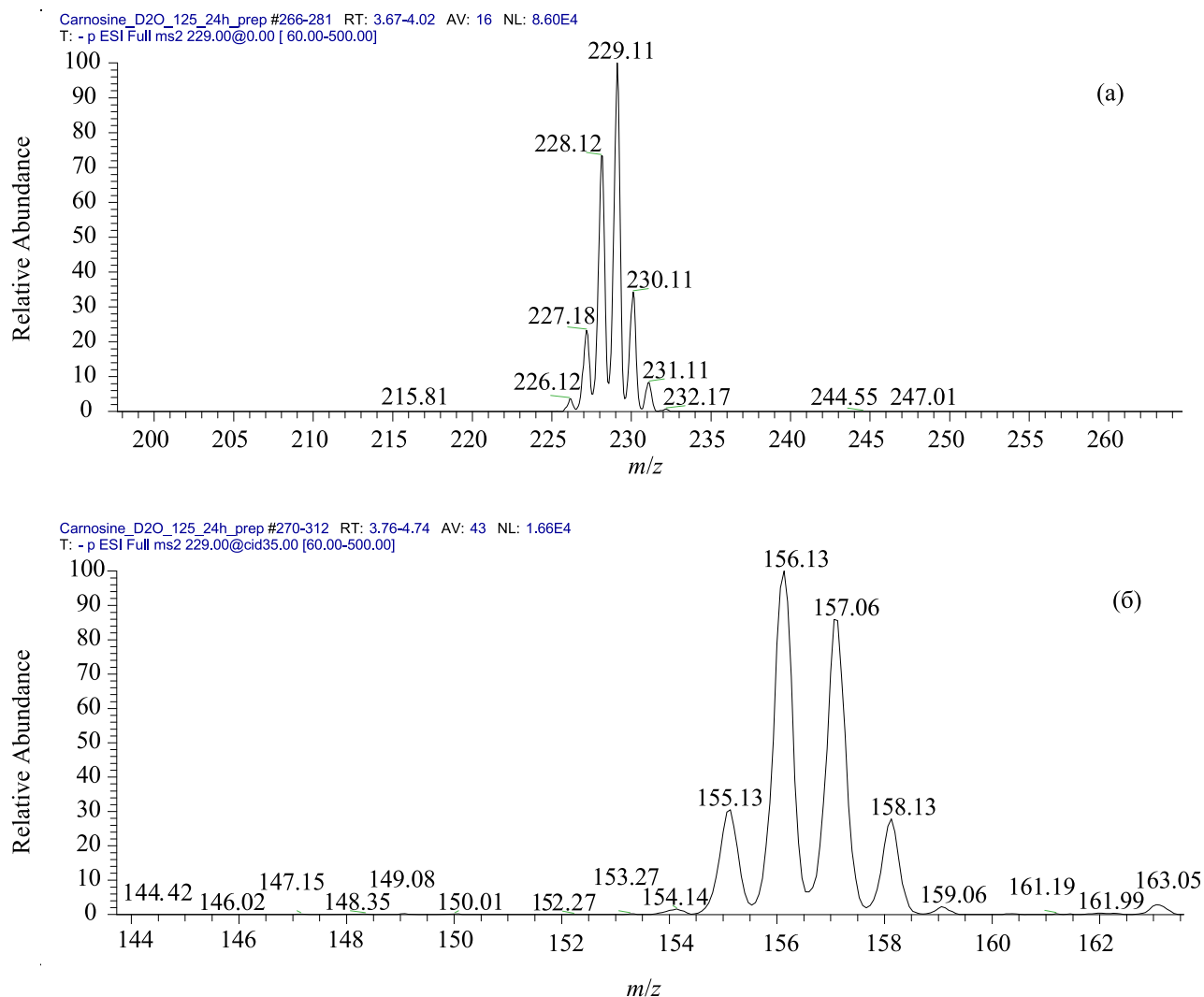
**DOI:** 10.31857/S0033831122060107, **EDN:** MGJORG

Природный дипептид β-аланил-L-гистидин (карнозин) содержится в больших количествах в скелетных мышцах позвоночных животных и в малом количестве присутствует в мозге и сердце.



В возбудимых тканях животных карнозин является хелатором ионов металлов, рН-буфером, а в условиях окислительного стресса выполняет функции гидрофильного антиоксиданта – перехватчика радикалов, а также индуктора эндогенных антиоксидантных систем, проявляет способность защищать ткани от образования конечных продуктов перекисного окисления липидов, карбонилирования нуклеиновых кислот и гликирования белков [1].

Кроме того, карнозин ингибирует рост амилоидных фибрилл, которые образуются, например, при болезни Альцгеймера. Также считается, что этот пептид обладает некоторыми функциями молекулярного шаперона, а известно, что главная функция этой системы состоит в восстановлении правильной нативной третичной или четвертичной структуры белка, а также образовании и диссоциации белковых комплексов [2]. Нейропротекторное действие карнозина охарактеризовано в различных *in vitro* и *in vivo* моделях патологий центральной нервной системы [3, 4]. Однако, несмотря на многочисленные убедительные экспериментальные данные, а также ряд успешных проектов, связанных с применением карнозина при некоторых хронических заболеваниях, широкого выхода в практическую медицину лекарственные формы на основе карнозина не получили [4, 5]. Одним из основных препятствий применения карнозина в качестве фармакологического



**Рис. 1.** Масс-спектры меченного дейтерием карнозина. (а) – спектр в отрицательных ионах (соответствующий молекулярному пику  $[M-H]^-$ ); фрагмент спектра с  $m/z$  226–232 соответствует изотопмерам карнозина; (б) – спектр фрагментации молекулярного пика  $[M-H]^-$  @35 эВ. Фрагмент с  $m/z$  154–159 соответствует изотопмерам гистидина.

средства является необходимость использования высоких доз препарата из-за его быстрого гидролиза присутствующим в крови высокоспецифичным ферментом – сывороточной карнозиной. При этом оценка биодоступности экзогенного карнозина затруднена наличием в тканях фермента карнозинсинтетазы, восстанавливающего дипептид из пула  $\beta$ -аланина и *L*-гистидина. В связи с этим для оценки поступления экзогенного карнозина в орган-мишень представляет интерес внесение метки в аминокислоты в составе молекулы дипептида, что может способствовать оценке вклада в наблюдаемое терапевтическое (профилактическое) действие ресинтезированного карнозина.

В качестве меченого аналога биологически активных соединений часто целесообразно использование изотопов водорода. Тритиевые соединения дают информацию о включении в объект исследования и об устойчивости препарата в различных биологически активных средах. Но, для каждого нового препарата необходима отработка условий включения метки и установка ее распределения между фрагментами, из которых состоит вещество. Только в этом случае можно рассчитать соотношение метаболитов в получаемых пробах. Поэтому предварительная отработка методики изотопного обмена на дейтерии может быть полезна при решении обеих этих задач.

**Таблица 1.** Условия получения меченого карнозина изотопным обменом с D<sub>2</sub> и содержание различных изотопных форм во всем пептиде и в гистидине (D<sub>2</sub>, 5% Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

Температура, °С	Время, мин	Количество смеси (пептида), мг	Выход, %	Среднее содержание дейтерия в молекуле (D <sub>ср</sub> ) и % молекул, содержащих X атомов дейтерия (D <sub>X</sub> ) в смеси изотопмеров: во всем пептиде/в гистидине								
				D <sub>ср</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>
160	20	6.0 (0.18)	45	1.3	21.1/25.5	59.7/64.2	15.1/9.6	3.3/0.6	0.8/0.1	0/0	0/0	0/0
200	10	6.5 (0.20)	30	1.62	13.2/14.5	49.1/55.4	19.1/19.4	6.4/10.5	6.4/0.2	5.0/0	0.8/0	0/0
220	10	7.0 (0.21)	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–

**Таблица 2.** Условия получения меченого карнозина изотопным обменом с D<sub>2</sub>O и содержание различных изотопных форм во всем пептиде

Температура, °С	Время, ч	Количество пептида, мг	Выход, %	Среднее содержание дейтерия в молекуле (D <sub>ср</sub> ) и % молекул изотопмера, содержащегося в пептиде								
				D <sub>ср</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>
100	3	5	72	1.02	7.3	83.0	9.8	0.1	0.05	0	0	0
120	3	5	64	1.59	3.9	46.9	38.2	9.6	1.7	0	0	0
	19	5	53	2.70	0.8	8.8	30.2	41.5	17.4	1.2	0.2	0
125	24	5	40	3.05	–	–	–	–	–	–	–	–
		50	45	2.85	–	–	–	–	–	–	–	–

Целью данной работы является отработка условий включения дейтерия в карнозин, желательнее с включением более двух атомов дейтерия, и оценка распределения дейтерия между β-аланином и L-гистидином.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, растворители, реагенты и карнозин – коммерческие препараты. Дейтерированные соединения охарактеризованы с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. ВЭЖХ проводили на колонке Reprosil pur Diol (3 × 150 мм, размер частиц 5 мкм). Температура колонки 30°C. Длина волны 220 нм. Элюент А – ацетонитрил (AcN)–10 мМ NH<sub>4</sub>OH (1 : 1), элюент Б – AcN, линейный градиент от 80 до 50% Б за 10 мин. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Время удерживания карнозина 7.98 мин.

Препаративную очистку проводили ВЭЖХ с использованием колонки Reprosil pur C18aq (20 × 150 мм, размер частиц 10 мкм). Температура колонки 25°C. Длина волны 226 нм. Элюент А – 10 мМ NH<sub>4</sub>OAc, элюент Б – метанол, программа градиента 0 мин – 0% В, 5 мин – 0% В, 15 мин – 20% В. Ско-

рость подачи элюента 20 мл/мин. Время удерживания карнозина 2.66 мин.

Масс-спектрометрические данные получали на приборе LCQ Advantage MAX (ThermoElectron, США) с ионизацией электрораспылением, прямым вводом раствора образца с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и дальнейшей фрагментацией группы изотопмеров с *m/z* в диапазоне 226–233, соответствующих однозарядному молекулярному пику [M–H]<sup>+</sup>, в анализаторе методом ионных соударений при 35 эВ. Содержание дейтерия в гистидине определяли по фрагменту, соответствующему моноизотопному пику с *m/z* 154.1 в диапазоне массовых чисел 154–160 (рис. 1). Расчет распределения изотопмеров проводили в соответствии с методом, описанным в работе [6]. Изотопный обмен проводили по методике [7].

### МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Для работы с газообразным дейтерием раствор 50 мг карнозина в 0.5 мл воды наносили на 1500 мг Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и при перемешивании замораживали жидким азотом. Затем смесь лиофилизировали. Сухой остаток смешивали с 100 мг 5% Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

В реакцию брали аликвоту смеси, помещали в реакционную ампулу и нагревали до 160–220°C в

**Таблица 3.** Введение дейтерия в карнозин в препаративных количествах ( $D_2O$ , 125°C, 24 ч, 5% Pd/ $Al_2O_3$ ,  $Al_2O_3$ )

$\Sigma D$							
3.59				1.72			
Изотопомеры							
$D_0$	0.4*	$D_4$	40.9*	$D_0$	0.3**	$D_4$	1.9**
$D_1$	1.7	$D_5$	10.9	$D_1$	39.6	$D_5$	0
$D_2$	9.8	$D_6$	2.7	$D_2$	49.7	$D_6$	0
$D_3$	32.8	$D_7$	0.8	$D_3$	8.5	$D_7$	0

\* Содержание дейтерия в карнозине,

\*\* содержание дейтерия в гистидине.

течение 10–20 мин (табл. 1). Реакционную ампулу вакуумировали и заполняли дейтерием до давления 400 гПа. Вещество смывали с катализатора метанолом ( $3 \times 1$  мл). Фильтраты упаривали, остаток растворяли в 0.5 мл метанола. Анализ показал, что выход меченого препарата равнялся 5–45% (табл. 1). После очистки методом ВЭЖХ водный раствор карнозина лиофилизировали. Содержание изотопомеров изучали с использованием масс-спектрометрии.

При использовании  $D_2O$  раствор 150 мг карнозина в 2 мл дейтериевой воды смешивали с 150 мг  $Al_2O_3$  и 15 мг 5% Pd/ $Al_2O_3$ . В опыт брали от 5 до 50 мг карнозина, реакцию вели от 3 до 24 ч при температуре 100–125°C, выход – от 40 до 72% (табл. 2).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении реакций без растворителя оказалось, что проводить их при температурах выше 200°C нецелесообразно. При этом среднее включение дейтерия остается в районе 1.5 атомов. Известно, что при масштабировании эксперимента включение изотопа, как правило, падает [6]. Еще один недостаток этой методики в том, что остается большое количество недейтерированного вещества. Последнее обстоятельство может негативно влиять на использование  $[D]$ карнозина в качестве стандарта для масс-спектрометрии.

Также при проведении реакций без растворителя оказалось, что основная часть дейтерия включается в гистидин. При этом с повышением температуры распределение дейтерия становится более равномерным (160°C – 83%, 180°C – 78% дейтерия в гистидине).

Методика, при которой в качестве изотопного источника используется  $D_2O$ , является более перспективной, так как при ее применении дейтерий включается и в  $\beta$ -аланиновый фрагмент пептида. При этом количество изотопомера, не содержащего дейтерий, резко уменьшается.

Так как дейтерированных соединений, как правило, требуются десятки миллиграмм, увеличение выхода и/или содержания дейтерия в веществе является весьма желательным. Поэтому для дополнительного повышения содержания дейтерия в карнозине реакцию изотопного обмена с дейтериевой водой проводили после обработки сухой реакционной смеси  $D_2$  (табл. 3). Расчет состоял в том, что удастся заменить протий, содержащийся в реакционной среде, на дейтерий и уменьшить изотопное разбавление, а также можно будет использовать способность молекулярного водорода создавать кислотные центры на активных центрах катализатора  $[D^+(D_2O)_n]$ . Квантово-химические расчеты показывают обоснованность влияния  $[D^+(D_2O)_n]$  на увеличение изотопного обмена [8]. Повышение эффективности изотопного обмена между молекулами вещества и  $D_2O$  в атмосфере водорода показано в ряде публикаций [9–13].

Для реализации этих изменений в методике эксперимента раствор 50 мг карнозина в 0.5 мл  $D_2O$  смешивали с 500 мг  $Al_2O_3$  и 5 мг 5% Pd/ $Al_2O_3$ . Смесь лиофилизировали. Сухой порошок дважды обрабатывали в течение 10 мин газообразным дейтерием (400 гПа) при 70°C для более быстрого обмена подвижного протия на дейтерий и дважды вакуумировали для удаления протий-дейтериевой газовой смеси. К смеси добавляли 0.7 мл  $D_2O$ , перемешивали и замораживали жидким азотом. При охлаждении жидким азотом из ампулы вакуумированием удаляли остаток водорода и доводили давление в ампуле до атмосферного аргоном. Ампулу запаивали и выдерживали сутки при 125°C.

Данная методика, во-первых, позволила уменьшить количество недейтерированного вещества до 0.4%. Во-вторых, содержание дейтерия в гистидине уменьшилось до 45–48%, т.е. распределение дейтерия в карнозине по аминокислотам стало практически равномерным. В-третьих, удалось с выходом 40% (20 мг) получить препарат, содержащий 3.59 атома дейтерия на молекулу, что позволило выполнить все поставленные перед работой задачи.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была проведена при поддержке темы №1021052806528-6-1.6.4;3.1.1;3.1.9;3.1.8;3.2.25 «Фундаментальные аспекты нейропластичности в рамках модели трансляционной неврологии».

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Болдырев А.А.* // Биохимия. 2012. Т. 77, № 4. С. 403–418.
2. *Bellia F., Vecchio G., Cuzzocrea S., Calabrese V., Rizzarelli E.* // Mol. Aspects Med. 2011. Vol. 32. N 4–6. P. 258–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.009>
3. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // Physiol. Rev. 2013. Vol. 93, N 4. P. 1803–1845.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>
4. *Menon K., Mousa A., de Courten B.* // BMJ Open. 2018. Vol. 8. N 3.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020623>
5. *Artioli G.G., Sale C., Jones R.L.* // Eur. J. Sport Sci. 2019. Vol. 19, N 1. P. 30–39.  
<https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1444096>
6. *Chik J.K., Vande Graaf J.L., Schriemer D.C.* // Anal. Chem. 2006. Vol. 78, N 1. P. 207–214.  
<https://doi.org/10.1021/ac0509881>
7. *Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф.* Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.
8. *Борисов Ю.А., Золотарев Ю.А.* // ЖФХ. 2002. Т. 76, № 4. С. 734–738.
9. *Esaki H., Ito N., Sakai S., Maegawa T., Monguchi Y., Sajiki H.* // Tetrahedron. 2006. Vol. 62, N 47. P. 10954–10961.  
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.088>
10. *Lockley W.J.S., Hesk D.* // J. Label. Compd. Radiopharm. 2010. Vol. 53, N 11–12. P. 704–715.  
<https://doi.org/10.1002/jlcr.1815>
11. *Maegawa T., Fujiwara Y., Inagaki Y., Esaki H., Monguchi Y., Sajiki H.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2008. Vol. 47, N 29. P. 5394–5397.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200800941>
12. *Sajiki H., Hattori K., Aoki F., Yasunaga K., Hirota K.* // Synlett. 2002. N 7. P. 1149–1151.  
<https://doi.org/10.1055/s-2002-32605>
13. *Sajiki H., Aoki F., Esaki H., Maegawa T., Hirota K.* // Org. Lett. 2004. Vol. 6, N 9. P. 1485–1487.  
<https://doi.org/10.1021/ol0496374>