

51. Snyder S. H. Amer. J. Psychiatry, 130, 1, 61—67, 1973.
52. Snyder S. H., Bauerjee S. P., Yamamura H. I., Greynberg D. Science, 184, 4143—4148, 1974.
53. Taylor K. M., Snyder S. H. Science, 168, 3938, 1499, 1970.
54. Taylor K. M., Snyder S. H. Brain Res., 24, 2, 295—309, 1971.
55. Taylor M., Goudie A. J., Mortimore Sh., Wheeler T. J. Psychopharmacologia, 40, 219—258, 1974.
56. Tong S. Psychopharmacologia, 38, 2, 181—186, 1974.
57. Trulson M. E., Stark A. D., Jacobs B. L. J. Pharm. Pharmacol., 20, 6, 382—384, 1974.
58. Trulson M. E., Jacobs B. L. Science, 205, 4412, 1295—1297, 1979.
59. Trulson M. E., Jacobs B. L. J. Pharmacol. Exp. Ther., 211, 2, 375—384, 1979.
60. Weiss B., Laties V. G. Pharmacol. Rev., 14, 1, 1—36, 1962.
61. Weissman A., Koe B. K., Lenen S. S. J. Pharmacol. Exp. Ther., 151, 3, 339—352, 1966.

«Биол. ж. Арменцы», т. XXXVIII, № 9, 1985

УДК 577.174-577.164.13

ПИРИДОКСАЛЬ-5'-ФОСФАТНЫЕ АНАЛОГИ ВЕЩЕСТВА P И ЕГО С-КОНЦЕВОГО ПЕНТАПЕПТИДА

Т. Н. АКОПЯН, А. М. АРЗУМАНЯН, А. Г. АГАДЖАНЯН,
А. А. АРМТЮНЯН, А. Х. ХАНАЗАДЯН

Два флуоресцентных аналога вещества P (SP) и одно производное С-концевого пентапептида вещества P (SP₇₋₁₁) получены путем химической модификации нативных пептидов пиридоксаль-5'-фосфатом (ПДФ). Анализ аминокислотного состава полученных аналогов показал, что в одном из производных вещества P ε-аминогруппа лизинового остатка замещена ПДФом [ε-(P-pxy)-SP], тогда как в другом — замещение происходит как по ε-, так и по N-концевой аминогруппам пептида [α, ε-di-(P-pxy)-SP]. В молекуле SP₇₋₁₁ ПДФом модифицируется N-концевая аминокислота [α-(P-pxy)-SP₇₋₁₁]. Полученные аналоги SP обладают сократительной активностью, сопоставимой с активностью нативного пептида. Модификация пентапептидного фрагмента приводит к двадцатикратному повышению сократительной активности по сравнению с нативным SP₇₋₁₁. Флуоресценция фосфопиридоксальных остатков позволяет детектировать 1 пмоль модифицированных пептидов в 1 мл раствора. ПДФ-аналоги SP расщепляются под действием плазмы человека в 1,6 раз медленнее, чем нативный пептид.

Ключевые слова: вещество P, С-концевой пентапептид вещества P, флуоресцентные аналоги.

Ундекапептид—вещество P—оказывает сократительное действие на гладкую мускулатуру, понижает кровяное давление, стимулирует секреторную активность некоторых желез [8]. Установлено также, что оно может играть роль нейротрансмиттера или нейромодулятора в центральной нервной системе [9]. Биологическая инактивация вещества P обусловлена протеолизом пептида [3, 6, 7]. Связывание нативного пептида с химическими модификантами является одним из возможных пу-

тей получения метаболически более стабильных (в отношении протеолиза) аналогов.

В настоящей работе сообщается о получении пиридоксаль-5'-фосфатных производных вещества Р его С-концевого пентапептида и приводятся сведения о некоторых их свойствах.

Материал и методика. В работе использовали SP и SP₁₋₁₁ (Peninsula Lab., США). Плазму человека получали из гепаринизированной кроли восьми здоровых доноров и хранили при -10° . Флуоресцентные аналоги получали при смешивании пептидов ($3,5 \cdot 10^{-3}$ М) с пятикратным избытком ПЛФ в боратном буфере, pH 9,7. Через 10 мин к реакционной смеси постепенно добавляли NaBH₄ до исчезновения желтого цвета раствора. Разделение модифицированных пептидов проводили с помощью электрофореза на бумаге Ватман 3 ММ (60 В/см, пиридин-ацетатный буфер, pH 5,5, 40 мин). Контролями служили пробы, содержащие пептиды и ПЛФ, инкубированные отдельно и обработанные NaBH₄. Положение пептидных аналогов на бумаге определялось по их ярко-голубой флуоресценции в ультрафиолетовом свете. Контрольные полоски бумаги окрашивали нингидриновым реагентом. Пятна, соответствующие модифицированным пептидам, элюировали 0,1 М раствором уксусной кислоты. После сушки полученные пептиды растворяли в фосфатном буфере, pH 7,6, и хранили при -10° . Гомогенность пептидов проверяли с помощью электрофореза на бумаге Ватман 3 ММ в формат-ацетатном буфере, pH 1,9. Определение N-концевой аминокислоты и аминокислотного состава пептидов проводили, как описано [1]. Р-ху-лизин был приготовлен по методу [10]. Сократительную активность пептидов и их производные проверяли на препарате изолированной кишки морской свинки [12]. Для сравнения биологической активности нативных пептидов с активностью их аналогов были сняты кривые зависимости доза-эффект. Для определения деградации SP и его аналогов пептиды ($2 \cdot 10^{-5}$ М) инкубировали с плазмой крови человека (40 мкл) при 37° , разное время в 65 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6. Содержание пептидов оценивали по остаточной сократительной активности на изолированной кишке морской свинки.

Результаты и обсуждение. В ряде работ было показано, что в процессе расщепления вещества Р в разных тканях свой вклад вносят также и трипсиноподобные ферменты [3, 6, 7]. Естественно было предположить, что замещение ПЛФом ϵ -аминогруппы лизинового остатка в молекуле SP может привести к повышению резистентности пептида к протеолитическому расщеплению. Кроме того, высокая флуоресценция и хорошая водорастворимость ПЛФ-аналогов позволяют использовать ПЛФ-производные SP для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий. При pH 9,7 SP образует с ПЛФ шиффовы основания, регистрируемые по длинноволновому сдвигу максимума поглощения ПЛФ (от 330 нм до 415 нм). После обработки реакционной среды NaBH₄ электрофорез продуктов реакции выявил наличие двух новых флуоресцентных пятен. При окрашивании нингидриновым реагентом оказалось, что только один из аналогов SP является нингидрин-положительным. Определение аминокислотного состава показало наличие всех составляющих SP аминокислот в молярном соотношении со следующими исключениями: лизиновый остаток не детектировался в обоих производных, аргининовый остаток не был обнаружен в нингидрин-отрицательном пятне. Аргинин был идентифицирован в качестве N-концевой аминокислоты в нингидрин-положительном пятне, в то время как ни одна аминокислота не идентифицируется как N-концевая в нингидрин-отрицательном пятне. Наличие лизина, модифицированного по ϵ -амино-

сократительной активности, веноконстрикторного и сосудорасширяющего действия оказалось, что окта-, гепта- и гексапептиды обладают активностью, равной (а в некоторых случаях превышающей) активности нативного пептида [4, 5]. С-концевой же пептапептид проявляет

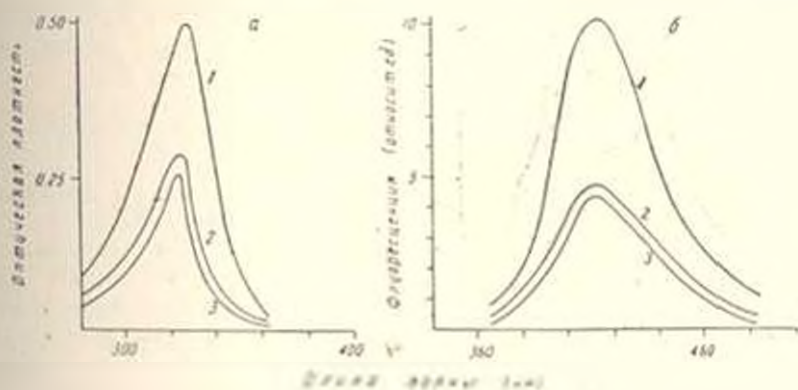


Рис. 2 Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,6: 1— α - ϵ -di-(P-pxy)-SP, 2— ϵ -(P-pxy)-SP, 3— α -(P-pxy)-P₇₋₁₁. Концентрация пептидов— $3 \cdot 10^{-3}$ М (а) и $5 \cdot 10^{-3}$ М (б).

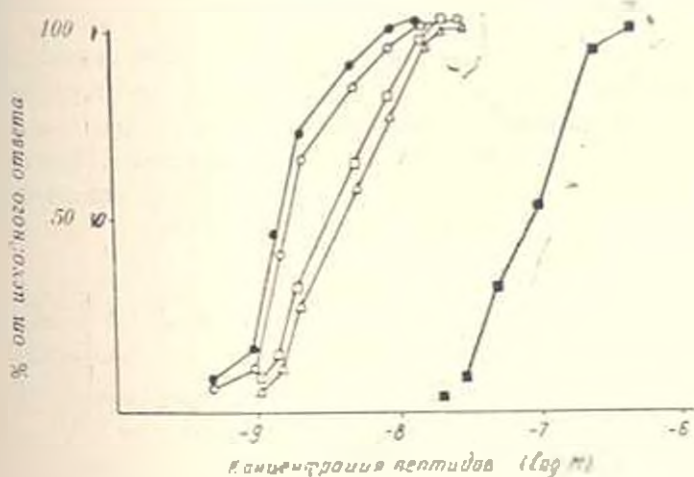


Рис. 3. Зависимость сократительной активности SP (●), ϵ -(P-pxy)-SP (○), α - ϵ -di-(P-pxy)-SP (Δ), SP₇₋₁₁ (■) и α -(P-pxy)-SP₇₋₁₁ (◻) от концентрации пептида

только 1—2% от общей активности SP [4]. Не исключено, что относительно низкая активность пептапептида связана с его быстрым расщеплением по сравнению с более длинными С-концевыми фрагментами, как это было показано ранее [2]. Модификация S²₇₋₁₁ приводит к двадцатикратному повышению сократительной активности относительно исходной активности пептапептида. Наблюдаемый скачок в активности связан, по-видимому, с повышением резистентности модифицированного пептида к протеолизу.

Поскольку кровь является основным руслом транспорта пептидных гормонов, были проведены сравнительные измерения по расщеплению

нативного SP и его ПЛФ-аналогов под действием плазмы крови человека. В условиях нашего эксперимента уменьшение контрактурной активности на 50% от исходной величины наблюдается через 70 мин инкубации плазмы с SP и через 110 мин для ПЛФ-аналогов SP (рис. 4).

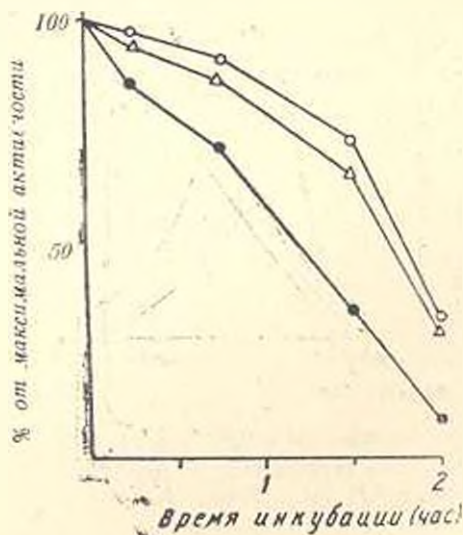


Рис. 4. Зависимость деградации SP (●), α, ϵ -di-(P-pxy)-SP (○) и α, ϵ -di-(P-pxy)-SP (Δ) от времени инкубации пептида с плазмой крови человека. Исходная биологическая активность пептида принята за 100%.

Суммируя, можно заключить, что полученные ПЛФ-аналоги SP обладают сопоставимой с нативным пептидом сократительной активностью и одновременно проявляют повышенную резистентность к протеолизу в плазме крови человека. Указанные свойства, наряду с высокой флуоресценцией ПЛФ-производных SP, позволяют применять их в дальнейшем при лиганд-рецепторных исследованиях.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 27 XI 1984 г.

ԸՆՅՈՒԹԻ ԵՎ ՆՐԱ C-ՍԱՅՐԱՅԻՆ ՊԵՆՏԱՊԵՊՏԻԴԻ ՊՐԻԴՐՕՔՍԱԼ-5'-ՑՈՍՑԱՏԱՅԻՆ ԱՆԱԼՈԳՆԵՐԸ

Թ. Ն. ՉԱԿՈՅԱՆ, Ա. Մ. ԱՐՁՈՒՄԱՆՅԱՆ, Չ. Գ. ԱՂԱԶՆՅԱՆ,
Ա. Չ. ՉԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Խ. ԽՈՒՍԹՅԱՆ

Նախիվ պեպտիդների ըմբիական մոդիֆիկացիան պիրիդոքսալ-5-ֆոսֆատի (ՊԼՖ) օգնությամբ հնարավորություն է տվել ստանալ P նյութի (SP) երկու ֆլուորեսցենտային անալոգներ և P նյութի (SP₇₋₁₁) C-ծայրային պենտապեպտիդի մեկ ածանցյալ՝ Ստացված անալոգների ամինաթթվային կազմի վերլուծությունը ցույց է տվել, որ P նյութի ածանցյալներից մեկում լիզինի մնացորդի E-ամինախումբը տեղակալված է ՊԼՖ-ով [E-⟨P-pxy⟩-SP], մինչդեռ մյուսում տեղակալումը կատարվում է պեպտիդի ինչպես E-այնպես էլ N-ծայրային ամինախմբերում [α, E-di-(P-pxy)-SP] SP₇₋₁₁-ի մոլեկուլում ՊԼՖ-ով մոդիֆիկացվում է N-ծայրային ամինաթթուն [α-(P-pxy)-SP₇₋₁₁]։ SP-ի ստացված անալոգները ի հայտ են

բերում կծկողական ակտիվություն, որը հատուկ է նախիվ պեպտիդին: Պենտապեպտիդի մոդիֆիկացիան առաջ է բերում կծկողական ակտիվության բարձրացում (20 անգամ) SP₇₋₁₁-ի համեմատ: Ֆոսֆոպիրիդոքսիլային մնացորդների ֆլուորեսցենցիան հնարավորություն է տալիս հայտնաբերել 1 պմոլ մոդիֆիկացված պեպտիդների քանակությունը 1 մլ լուծույթում: SP-ի ՊԼՑ-անալոգները մարդու պլազմայի ազդեցության տակ քայքայվում են 1,6 անգամ ավելի դանդաղ, քան նախիվ պեպտիդը:

PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE DERIVATIVES OF SUBSTANCE P AND ITS C-TERMINAL PENTAPEPTIDE

T. N. AKOPYAN, A. M. ARZUMANYAN, H. G. AGHAJANYAN,
A. A. ARUTUNYAN, A. Kh. KHANAZADYAN

Two fluorescent derivatives of substance P (SP) and one for C-terminal pentapeptide (SP₇₋₁₁) have been obtained by chemical modification of native peptides by pyridoxal-5'-phosphate (PLP). One of the derivatives of SP ε-amino group of Lys residue [ε-(P-pxy)-SP] and in the other ε-amino group of Lys residue, as well as N-terminal amino group [γ, ε-di-(P-pxy)-SP] have been substituted by PLP. PLP modified N-terminal amino acid of SP₇₋₁₁. The SP analogues obtained possess spasmogenic activity commensurable with the activity of native peptide. Modification of pentapeptide fragment leads to 20-fold increase of spasmogenic activity in comparison with the native SP₇₋₁₁. The fluorescence of P-pxy residues of peptides permits to detect 1 pmol in 1 ml of solution. PLP-analogues of SP are degraded by human plasma 1,6-times slower than naturally occurring peptide.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арутунян А. А., Северин Е. С., Вартанский Я. М. Биохимия, 40, 4, 373, 1975.
2. Arzumanyan A. M., Arutunyan A. A., Lajtha A., Akopyan T. N. Neurochem. Res. in press.
3. Berger H., Fechner K., Albrecht E., Niedrich H. Biochem. Pharmacol., 28, 3773, 1979.
4. Bury R., Mashford M. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 55, 671, 1977.
5. Hanley M., Iversen L. In: "Neurotransmitter Receptors", Yamamura H., Enna J. eds., Chapman and Hall, London, 71, 1980.
6. Johnson A., Erdős E. In: "Substance P", von Euler H., Pernow B., eds., Raven Press, 253, 1977.
7. Lee Ch., Sandberg B., Hanley M., Iversen L. Eur. J. Biochem., 114, 315, 1981.
8. Lembeck F. In: "Centrally Acting Peptides", Hughes Y., ed., MacMillan Press Ltd., London, 119, 1978.
9. Nicoll R., Schenker C., Leeman S. Annual Rev. Neurosci., 3, 227, 1980.
10. Severin E., Gulayev N., Khurs F., Khomutov R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 318, 1969.
11. Valle B., Riordan J. Annual Rev. Biochem., 38, 733, 1969.
12. Webster M., Prado E. In: "Methods in Enzymology", Perlmann G., Lorand L., eds., Academic Press, N. Y. and London, 19, 681, 1970.