

УДК 591.553

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

**О химической структуре и органотропной активности
 нового гипоталамического полипептида**

(Представлено 20/1 1977)

В начале 60-х годов мною было показано наличие в гипоталамусе органотропных (кардиотропных) нейрогормонов полипептидной природы (1). Позднее было установлено, что в магноцеллюлярных нейросекреторных ядрах гипоталамуса продуцируются не только октапептиды-вазопрессин и окситоцин, но и коронарорасширяющие нейрогормоны (КГ) (2). Из нейросекреторных гранул, продуцируемых указанными ядрами, были выделены КГ.

Из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса животных также были выделены КГ и коронаросуживающие вещества (2). По своим физико-химическим и биологическим свойствам они отличаются от Рилизинг гормонов (РГ) и от других известных соединений мозга. Нами были разработаны методы экстракции, выделения и очистки КГ и изучены их физико-химические и биологические свойства.

На примере соматостатина удалось показать, что некоторые рилизинг и ингибирующие факторы, образуемые в мелкоклеточных ядрах гипоталамуса, также могут обладать органотропной активностью, то есть оказывать влияние на функцию того или иного органа, минуя гипофиз (4).

В составе низкомолекулярных соединений гипоталамуса, выделенных по нашему методу (неопубликованные данные), были обнаружены КГ, аминокислоты и их дериваты, а также ряд пептидов, в том числе нингидринотрицательных. Профиль элюции КГ, условно названных веществами «К» и «С», и указанных пептидов на сефадексах и на ионообменниках (амберлайты) заметно отличаются. Анализ аминокислотного состава неизвестных пептидов гипоталамуса показал сходство этих соединений с фрагментами ЛРГ (Лютенизирующий Рилизинг Гормон). Данные о кардиотропной активности ЛРГ (5,6) давали основание полагать о наличии в гипоталамусе, подобно отдельным фрагментам ЛРГ, полипептидов с кардиотропной активностью. Они могут быть или продуктами ферментативного распада предшественника или de novo

синтезированными полипептидами. Для раскрытия химической структуры, биологических свойств и генеза указанных пептидов, которые находятся в гипоталамусе в исключительно малых количествах, были применены следующие методические подходы: а) Действие протеаз, выделенных из мозга свиньи на известные полипептиды гипоталамуса (в данном случае ЛРГ). При этом была изучена биологическая активность продуктов ферментативного гидролизата, и проводятся исследования по выделению пептидных фрагментов ЛРГ.

Ранее нами была показана высокая пептид и пептидил-пептид гидролазная активность в различных отделах гипоталамуса (7⁸).

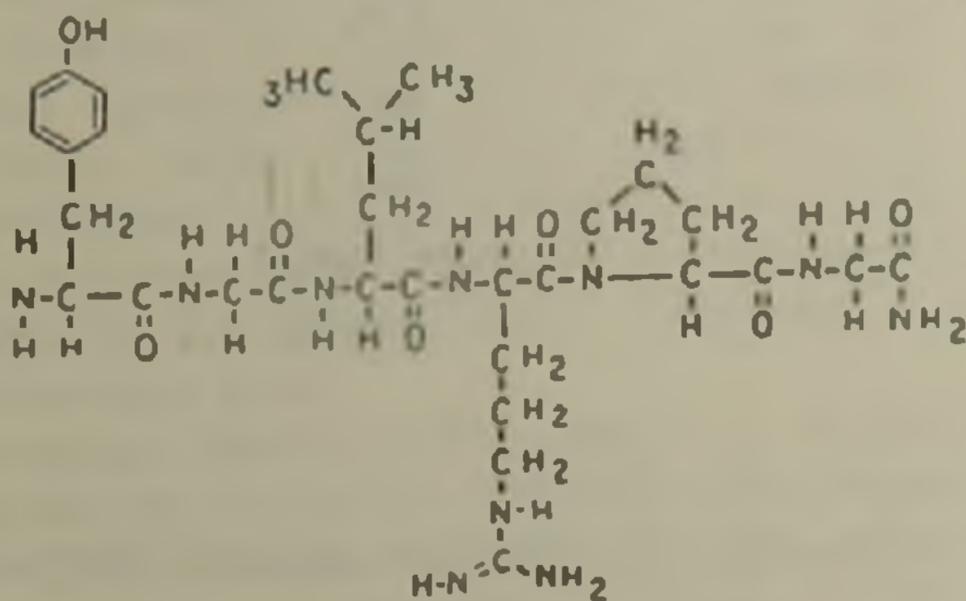
б) Изучение аминокислотного состава пептидов гипоталамуса высокочувствительными анализаторами.

в) Синтез различных фрагментов ЛРГ и изучение их свойства.

Было установлено, что в составе гипоталамических низкомолекулярных соединений имеются пептиды, по аминокислотному составу весьма сходные с отдельными фрагментами ЛРГ. После воздействия протеазами мозга из ЛРГ выделяется ряд пептидов, один из них обладает выраженным коронарорасширяющим свойством. Этот фрагмент совершенно не оказывает коронаросуживающего влияния, свойственного ЛРГ при его внутривенном введении животным (3 и больше микрограмм на целое животное).

Вместе с тем образование этого активного начала под влиянием протеаз мозга происходит в весьма малых количествах. По нашим наблюдениям подобных пептидов в гипоталамусе намного меньше чем КГ и РГ.

В результате всесторонних исследований различных синтетических фрагментов ЛРГ удалось раскрыть химическую структуру кардиотропного полипептида. На рис. 1 показана структурная формула гексапептида, обладающего выраженным коронарорасширяющим свойством.



ТИР-ГЛИ-ЛЕЙ-АРГ-ПРО-ГЛИ-NH₂

Рис. 1. Химическая структура кардиотропного гексапептида гипоталамуса

Как видно из строения гексапептида N-концевая аминокислота является тирозин. С-концевой аминокислотой является глицинамид. Аминокислотная последовательность в гексапептиде следующая:

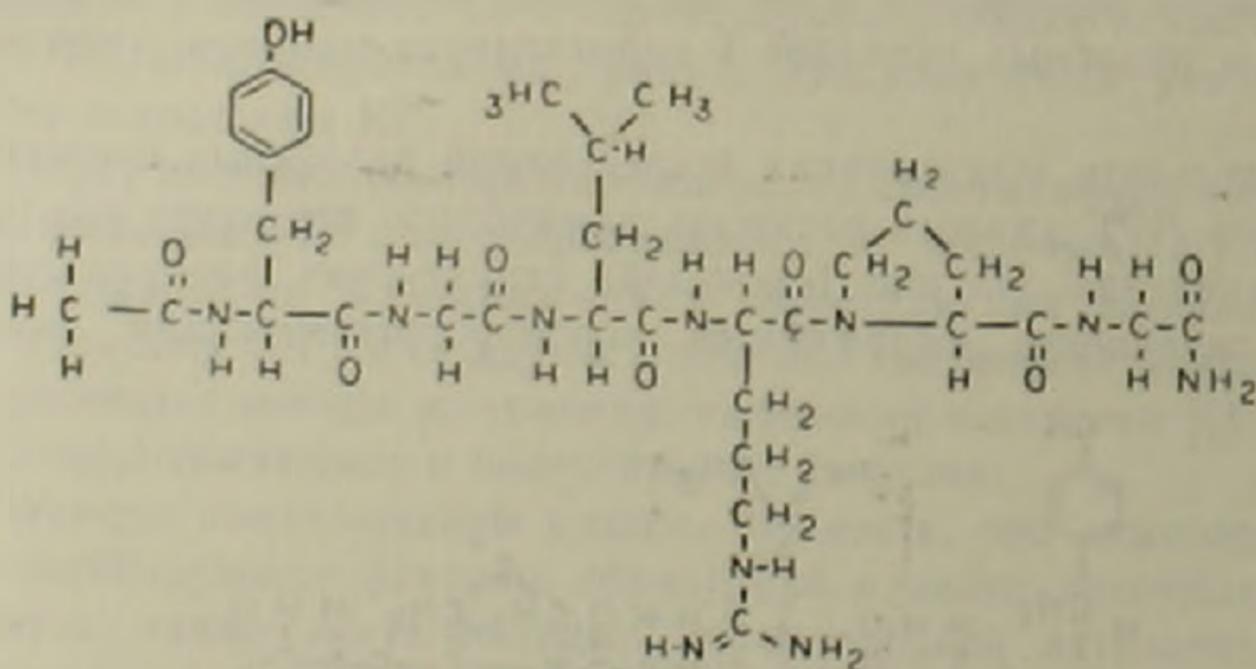


Молекулярный вес гексапептида—659. Меченный йодом гексапептид, как показали наши опыты, проведенные вместе с А. К. Антоном на крысах, легко проникает через гемато-энцефалический барьер из мозга в общую циркуляцию и в наибольшем количестве (по удельной активности) накапливается в сердечной мышце.

Как было сказано нами выше, в составе низкомолекулярных соединений гипоталамуса имеются не только ингибрирующие пептиды, но и замаскированные, ингибрирующие, что свидетельствует, по-видимому, о наличии ацетилированных и др. пептидов.

Для выяснения этих вопросов нами был синтезирован N-ацетил гексапептид на основе уже имеющегося гексапептида. Синтез N-ацетил гексапептида осуществляли в системе пиридин-уксусный ангидрид-ледяная уксусная кислота по известному методу (9).

Опыты показали, что активность N-ацетил гексапептида повышается больше 10 раз по сравнению с не ацетилированным гексапептидом. Молекулярный вес гексапептида—701 (рис. 2).



N-АЦЕТИЛ-ТИР-ГЛИ-ЛЕЙ-АРГ-ПРО-ГЛИ-NH₂

Рис. 2. Химическая структура кардиотропного N-ацетил-гексапептида

Оказывая весьма разительное и долго продолжающееся коронаро-расширяющее влияние, этот гексапептид вызывает появление характерных для этого вещества гиперемических пятен вдоль магистральных сосудов миокарда.

Эти данные наводят на мысль, что в отличие от ранее описанных нами нейрогормонов («К» и «С») этот гексапептид действует весьма сильно и на капиллярную проницаемость сердца. Подобное явление нам не удалось обнаружить в мозгу, печени и других органах.

Вопрос о наличии ацетилированного пептида требует специальных исследований. Нами проводятся исследования по механизмам биосинтеза гексапептида путем ацетилирования трансацетилазами. Если окажется правдоподобным этот механизм, можно допустить, что N-ацетил-гексапептид и ЛРГ образуются в мозгу из одного общего генетического начала.

Наши эксперименты показали, что деамидированная форма полипептида проявляет намного меньшую активность, чем сам гексапептид или N-ацетил-гексапептид.

Таким образом, и на примере кардиотропных нейрогормонов проявляется важный факт о том, что маскировка N-концевой аминокислоты циклизацией (подобно образованию пирроглютаминовой кислоты, когда глютаминная кислота занимает N-концевое положение в пептидах или ацетилированием N-концевой аминокислоты), а также амидирование C-концевой карбоксильной группы резко повышает биологическую активность нейропептидов.

В табл. I приводятся некоторые данные о физико-химических и биологических свойствах кардиотропного гексапептида и нейрогормона «С».

Как видно из этой таблицы коронарорасширяющая доза нейрогормона «С» составляет около 2×10^{-12} М на целое животное (кошку). Гексапептид и N-ацетилгексапептид проявляют эффект на сердечное кровообращение в концентрациях $1,5 \times 10^{-11}$ и $2,8 \times 10^{-12}$ М соответственно.

Таким образом, активность гексапептидов, особенно N-ацетилгексапептида и нейрогормона «С» проявляется почти при одинаковых концентрациях. Эти концентрации могут быть физиологическими.

Можно полагать, что значительно меньшие количества пептидов вызывают уже метаболические или функциональные сдвиги в сердце. Иначе говоря, сердце является исключительно чувствительным органом к указанным пептидам. Следовательно, появление в крови незначительных количеств этих пептидов при различных патологических условиях (вероятно и в физиологических условиях) может играть важную функциональную роль.

Из приведенных данных можно прийти к заключению, что по механизму действия на коронарное кровообращение гексапептиды заметно отличаются от нейрогормона «С». Так, например, гексапептид и N-ацетил-гексапептид почти не оказывают влияния на активность фосфодиэстеразы 3', 5'-циклического аденозинмонофосфата как и на фосфодиэстеразу 3', 5'-циклического гуанозинмонофосфата в гомогенатах сердца и мозга, так и на уровне изолированного фермента сердца (неопубликованные данные). Нейрогормон «С», однако, в пикомолях почти полностью ингибирует вышеуказанные ферменты в гомогенатах

сердца и мозга (¹⁰). Как показали наши опыты, проведенные с Б. Я. Гурвиц, нейрогормон «С» оказывает полное ингибирующее влияние на активность фосфодиэстеразы 3', 5'-циклической аденозинмонофосфорной кислоты, выделенной из сердца быка.

Таблица 1

Некоторые физико-химические свойства гексапептидов и нейрогормона «С»

| Нейропептиды | Молекулярный вес | Активность после гидролиза 6NНCl 105 | Активная доза (в молях) <i>in vivo</i> | Действие на ФДЭ |
|--|------------------|--------------------------------------|--|-----------------|
| Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли-NH ₂ | 659 | — | 1.5×10^{-11} | Не активное |
| N-ацетил-Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли-NH ₂ | 701 | — | 2.8×10^{-12} | Не активное |
| Нейрогормон «С» | ~500 | + | 2×10^{-12} | Ингибирует |

Полученные данные свидетельствуют о том, что гипоталамус, продуцирует как линейные полипептиды, так и более сложные морфий или стероидоподобные полициклические соединения (типа нейрогормона «С»), кардиотропного назначения. Обнаружение кардиотропных гексапептидов представляет принципиальную важность для понимания функционального значения ЛРГ. Дело в том, что любая модификация ЛРГ путем сокращения с N-конца или C-конца или расщепления пирроглютаминового кольца полностью инактивирует нейрогормон (^{11,12}). Таким образом, совершенно исключается то, что ЛРГ, химическая структура которого расшифрована в лабораториях Р. Гиймена и А. Шелли (^{13,14}), может быть прогормоном других ЛРГ начал. Эти данные показывают, что ЛРГ может быть предшественником органотропных начал, хотя мы не исключаем возможность самостоятельного образования ацетилгексапептида.

Полученные данные свидетельствуют о том, что коронарорасширяющие нейрогормоны, а также вновь открытые кардиотропные гексапептиды, в исключительно малых количествах в условиях *in vivo* оказывают разительное влияние на сердечные сосуды.

Эти данные показывают, что органом-мишенью гексапептидов в основном является сердце, кроме этого они действуют на определенные триггерные системы, локализованные, по-видимому, на рецепторных зонах ганглионарных клеток сердца (типа Пейсмекеровых). Исследования в этом направлении нами продолжаются.

Выражаю глубокую благодарность А. И. Мирошникову и В. В. Баеву (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, лаборатория академика Ю. А. Овчинникова) за синтез гексапептида.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Հիպոթալամուսի նոր պոլիպեպտիդի բիոհական կառուցվածքի և օրգանատրոպ ակտիվության մասին

Ցույց է տրված հիպոթալամուսի կարգիտրոպ պոլիպեպտիդի բիոհական կառուցվածքը: Հեքսապեպտիդում ամինաթթուների հերթականությունը հետևյալն է.

Քիր—Գլի—Լեյ—Արգ—Պրո—Գլի—NH₂

Մոլեկուլյար կշիռը՝ 659: Ցույց է տրված, որ N—ացետիլ հեքսապեպտիդն զգալիորեն ակտիվ է քան ոչ ացետիլացվածը:

Նշված պոլիպեպտիդներն իրենց ֆիզիկա-բիոհական հատկություններով տարբերվում են նախկինում մեր կողմից հայտնաբերված «K» և «C» նյութերից: Ենթադրվում է, որ սույն պոլիպեպտիդները և լուտեիլիպացնոզ հորմոնը իթանոզ գործիչը հիպոթալամուսում սինթեզվում են մեկ ընդհանուր գենետիկ նյութից (ancestral մոլեկուլից):

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ք Ի Թ Յ ՈՒ Ն

¹ A. A. Galoյan, DAN Арм. ССР, т. 31, № 2, 109 (1962). ² A. A. Galoյan, Ф. М. Саакян, DAN СССР, 201, 3 (1971). ³ A. A. Galoյan, Proc. IV-th American Peptide Symposium, Eds. R. Walter and J. Meinhoffer, N. Y. 651 (1975). ⁴ A. A. Galoյan, P. A. Алексанин, Биол. журн. Армении, т. 27, № 6 (1974). ⁵ A. A. Galoյan, Биол. журн. Армении, т. 28, № 12 (1975). ⁶ A. A. Galoյan, P. O. Карапетян, Биол. журн. Армении, т. 29, № 12, 1976. ⁷ A. A. Galoյan, N. Marks., A. Lajtha, IV Inter. Meeting of the Inter. Society for Neurochem., Tokyo, 165, 1973. ⁸ N. Marks, A. A. Galoյan, A. Greenbaum, A. Lajtha, J. Neurochem., 23, 735 (1974). ⁹ F. G. Mann, B. Ch. Saunders, Practical Organic Chem., 106 (1962). ¹⁰ A. A. Galoյan, Б. Я. Гурвич, Вопросы биохимии мозга, II, 1976. ¹¹ W. Vale, C. Rivier, Handbook of Psychopharmacology, V, 195, 1975. ¹² M. Saffran, Handbook of Physiology and Endocrinology, IV, 2, 563 (1974). ¹³ H. Matsuo, Y. Baba, R. M. G. Nair, A. Arimura, A. V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Comm., 43, 1334 (1971). ¹⁴ R. Gullermin, W. Vale, G. Grant, Вопросы биохимии мозга, VIII, 141, 1973.