



УДК 577.171.55

© 1992 В.Т. Иванов, А.А. Карелин, И.И. Михалева,  
Б.В. Васьковский, В.И. Свиряев, И.В. Назимов

## ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НОВЫХ ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина РАН,  
Москва*

Проведено широкомасштабное выделение и установление аминокислотных последовательностей эндогенных пептидов из различных биологических источников (головной и костный мозг крупного рогатого скота, а также головной мозг сибирского суслика). Среди них идентифицирован ряд ранее неизвестных пептидов, обладающих способностью воздействовать на некоторые физиологические процессы *in vivo* и *in vitro*. Анализ более чем 170 выделенных структур позволил предположить гипотезы о биологическом значении пептидного "фона" организма и роли функциональных белков, в частности гемоглобина, в образовании регуляторных пептидов, а также наметить дальнейшие пути исследования эндогенного пептидного материала. Обосновано также вероятное практическое применение изучаемых веществ в диагностировании соматических заболеваний.

В середине 80-х годов нами были начаты работы по выделению и структурно-функциональному анализу новых активных пептидов из экстрактов различных тканей животных. Такого рода исследования обычно проводятся по схеме "от функции к структуре", т.е. подразумевают выбор интересующей биологической функции, отработку удобной модельной тест-системы и последующее многостадийное фракционирование исходного материала, представляющего собой сложнейшую многокомпонентную смесь, с постоянным контролем обогащения получаемых фракций активным компонентом. Цель считается достигнутой, если удастся выделить индивидуальный продукт, воспроизводящий выбранную биологическую функцию. Задача осложняется, если биологическая активность связана с интегральным действием нескольких индивидуальных соединений. В этом случае на одной из стадий очистки происходит потеря активности или разделение активной фракции на несколько фракций, обладающих пониженной или видоизмененной первоначальной активностью. При таком развитии работы целесообразно выделение и исследование как можно большего числа компонентов, присутствующих в активной фракции.

Существует и обратная постановка задачи — "от структуры к функции", когда из биологического экстракта выделяется максимально возможное число индивидуальных пептидных компонентов, что открывает дорогу для определения их структуры, синтеза и изучения спектра биологического действия любого из найденных веществ.

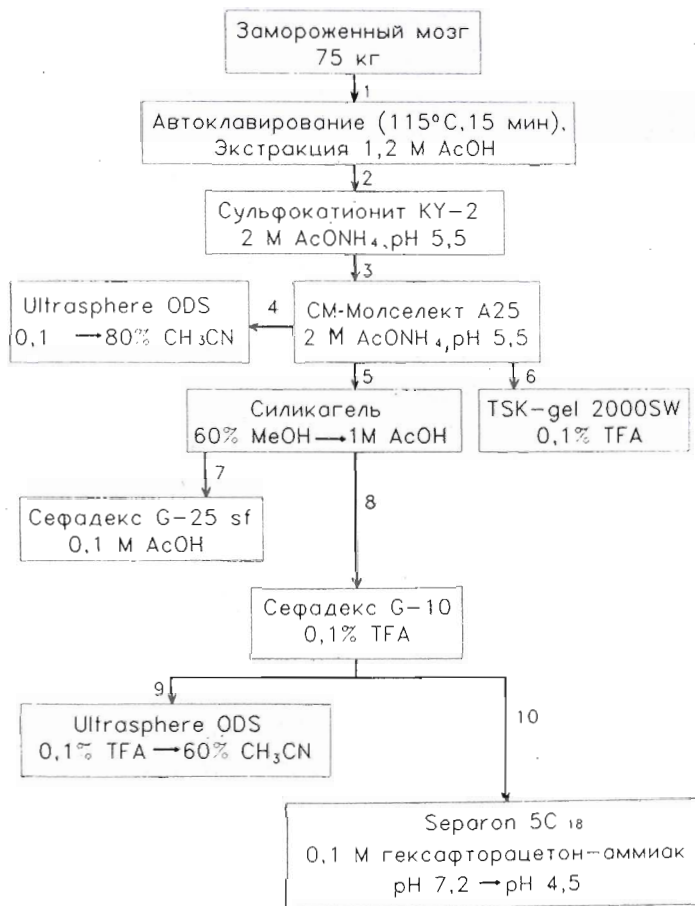


Рис. 1. Схема выделения биологически активных веществ из агрессивной фракции уксуснокислого экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота

Ниже будут кратко рассмотрены результаты исследования нескольких источников активных пептидов, в ходе которых выявились достоинства и ограничения упомянутых подходов.

### Пептиды из мозга крупного рогатого скота

На первых этапах поиска нейроактивных веществ из экстрактов мозга крупного рогатого скота (к.р.с.) был использован подход "от функции к структуре", где функцией служила способность индуцировать спонтанные агрессивные действия у крыс, а также модулировать агрессивное поведение животных в нескольких тест-системах [1, 2]. После ряда последовательных стадий очистки (1, 2, 3, 5, 7 на рис. 1) искомая активность сконцентрировалась в низкомолекулярной фракции (L на рис. 2), не содержащей, по данным масс-спектрометрии, компонентов

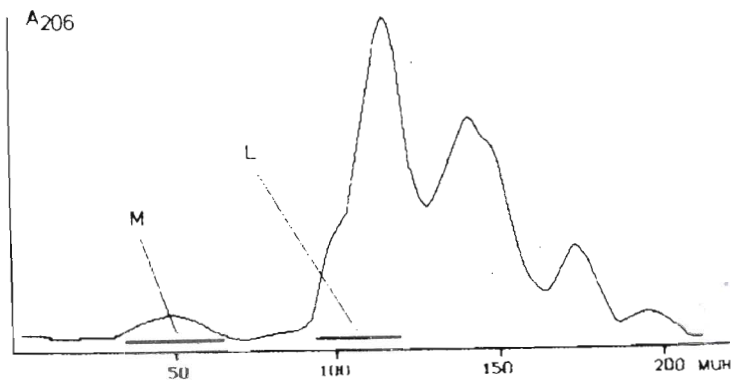


Рис. 2. Гель-хроматография агрессивной фракции на колонке (1,5×80 см) с сефадексом G-25 sf, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой (стадия 7, рис. 1)

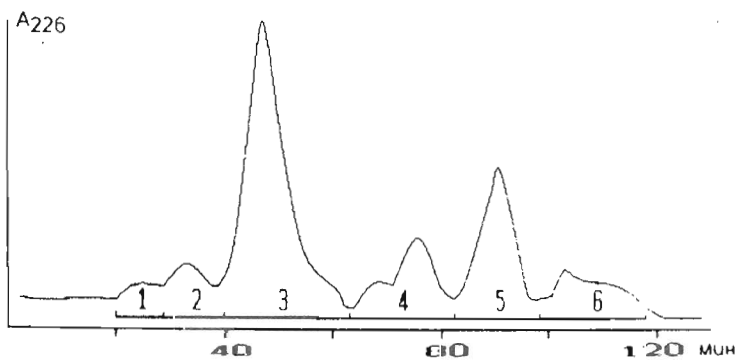


Рис. 3. Гель-хроматография агрессивной фракции на колонке (1,0×90 см) с сефадексом G-10, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой (стадия 8, рис. 1)

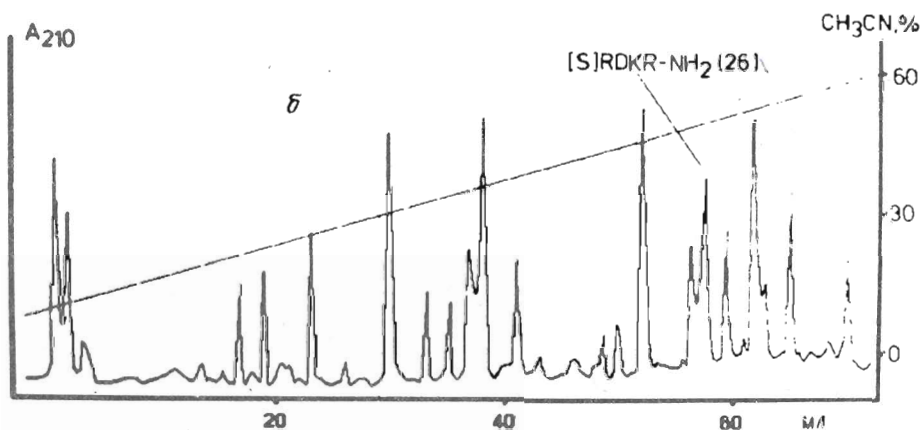
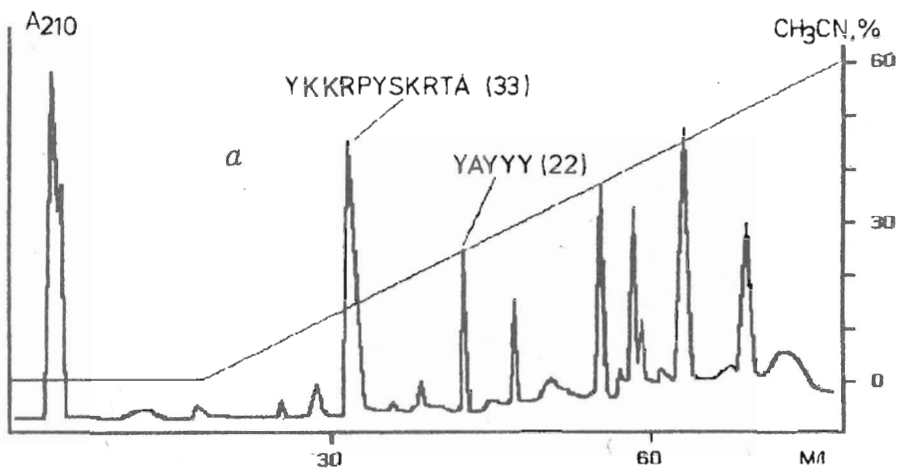


Рис. 4. Обращенно-фазовая хроматография фракций 2 (а) и 4 (б), полученных после гель-хроматографии агрессивной фракции (рис. 3), на колонке (4,6×250 мм) Ultrasphere ODS в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила (стадия 9, рис. 1)

с молекулярной массой более 200 Да. Вместе с тем пептидная фракция М (рис. 2) заметно изменяла как эффективные дозы фракции L, так и поведенческие проявления при совместном внутривентрикулярном введении. Изменение условий эксклюзионной хроматографии (стадия 8 на рис. 1) позволило одновременно провести разделение как собственно агрессивной фракции, так и фракции, модулирующей эту активность (рис. 3). Последующий анализ, включавший в себя две хроматографические стадии очистки (9 и 10 на рис. 1), показал, что действующим агрессивным началом являются комплексные соединения цинка с простыми третичными аминами (диизопропилметиламин, диметилэтиламин и др.) [2], а исследование компонентов, составляющих пептидную фракцию, модулирующую основную активность (рис. 4а, б), привело к установлению структур нескольких пептидов (22, 26 и 33, табл. 2) [3, 5].

К настоящему времени в основном закончено исследование одного из этих соединений (33) [3], которое можно отнести к группе нейротензинподобных пептидов, хотя для него и отсутствуют наиболее характерные периферические эффекты пептидов нейротениновой группы (миотропный и вазопрессорный). Тем не менее совокупность поведенческих реакций при центральном введении, способность модулировать связывание лигандов дофаминовых рецепторов как на мембранных препаратах мозга, так и на переживающих срезах гиппокампа [4], способность к активации фосфоинозитольного обмена, а также структурное подобие и способность индуцировать выброс гистамина из тучных клеток позволяют сделать вывод о значительной общности с нейротензином. Отсутствие же периферических эффектов может свидетельствовать о центральной локализации этого пептида.

Подобное исследование проведено и для пептида (22) [5]. В экспериментах по изучению поведенческой активности это вещество проявило агрессивную активность как при периферическом, так и при центральном введении. Анализ результатов этих опытов, а также исследование пептида в электрофизиологических экспериментах на изолированных нейронах улитки *Helix lucorum* позволили сделать вывод о серотонинэргической природе наблюдаемых проявлений агрессивной активности. Эти предположения получили подтверждение в экспериментах по влиянию пептида на связывание лигандов серотониновых рецепторов с мембранными препаратами мозга. Фармакологические испытания пептида позволили сделать предположение о том, что пептид (22) является функциональным антагонистом серотонинэргической системы.

Таким образом, для двух пептидов, выделенных из модулирующей агрессивное поведение фракции кислотного экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота, показано наличие широкого спектра биологической активности и предложен возможный механизм ее реализации. Другими словами, вещества, не обладающие яркой активностью в исходной системе тестирования (в данном случае индукцией спонтанной агрессивности), могут быть активными в других тест-системах. Учитывая, что состав пептидного материала мозга должен являться суммарным отражением протекающих в нем нейрохимических процессов, полученные данные свидетельствовали о целесообразности структурно-функционального исследования всех выделяемых эндогенных пептидов мозгового происхождения.

Основной проблемой первого этапа исследования стала стандартизация условий выделения пептидных фракций из уксуснокислого экстракта гомогената головного мозга крупного рогатого скота. Первоначально подобранные условия фракционирования с помощью эксклюзионной хроматографии на ссфадексе G-25 sf (рис. 5) позволили

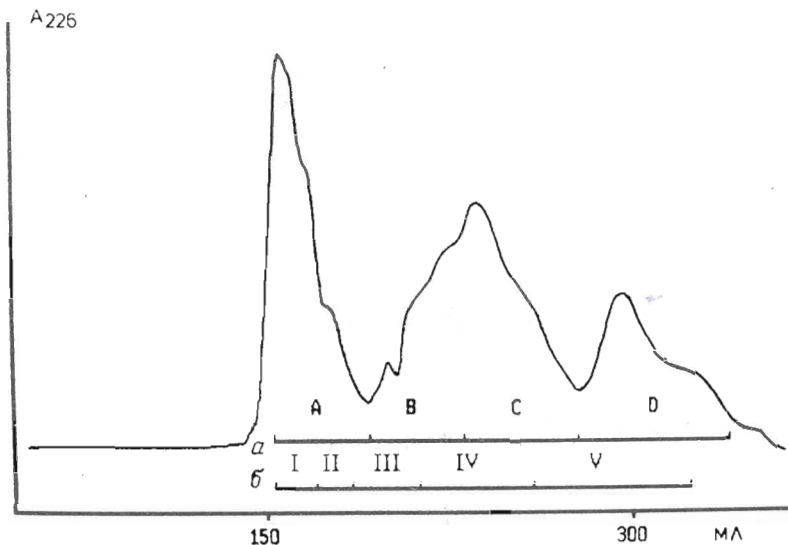


Рис. 5. Гель-хроматография кислотного экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-25 sf, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой. *a* и *b* — варианты объединения фракций

провести при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ сравнительный анализ компонентов фракции В, содержащей сравнительно короткие пептиды (3–25 аминокислотных остатков) из различных источников: кортекса, субкортекса, суммарного мозгового материала мозга крупного рогатого скота и суммарного мозгового материала мозга крысы, а также суммарного мозгового материала крупного рогатого скота, полученного при варьировании условий выделения. Соответствующие хроматограммы, приведенные на рис. 6*a–d*, свидетельствовали о относительной стабильности пептидного состава анализируемой фракции как в случае изменений условий выделения (рис. 6*в, д*), так и для пептидных компонентов из различных источников (рис. 6*a–в*) и организмов (рис. 6*в, г*). В то же время в этих условиях не удавалось добиться удовлетворительного разделения более высокомолекулярных пептидных компонентов.

Уменьшение объединяемых фракций при сохранении хроматографических параметров (рис. 5*б*) позволило значительно упростить получаемые при обращенно-фазовой хроматографии профили элюции. Были получены фракции I–III, в основном содержащие пептиды с длиной последовательности свыше 40 аминокислотных остатков (рис. 7), пептиды, состоящие из 20–40 аминокислотных остатков (рис. 8), и пептиды с аминокислотной последовательностью в 3–20 остатков (рис. 9) соответственно.

Выделенные в индивидуальном состоянии вещества пептидной природы анализировали с использованием газофазного секвенатора. К настоящему моменту установлены структуры около 90 пептидов из головного мозга крупного рогатого скота, что, по нашей оценке, составляет около 90 % пептидов, содержащихся во фракциях II и III (рис. 5) в количествах свыше 0,1 нмоль/г мозгового материала. Полученные результаты суммированы в табл. 1–3.



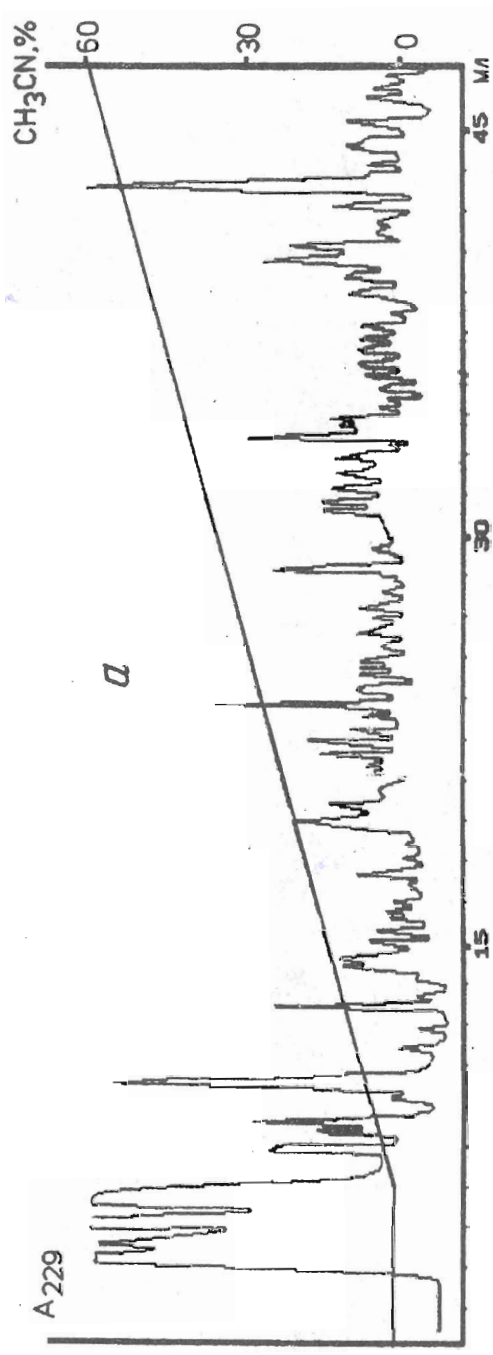


Рис. 6а

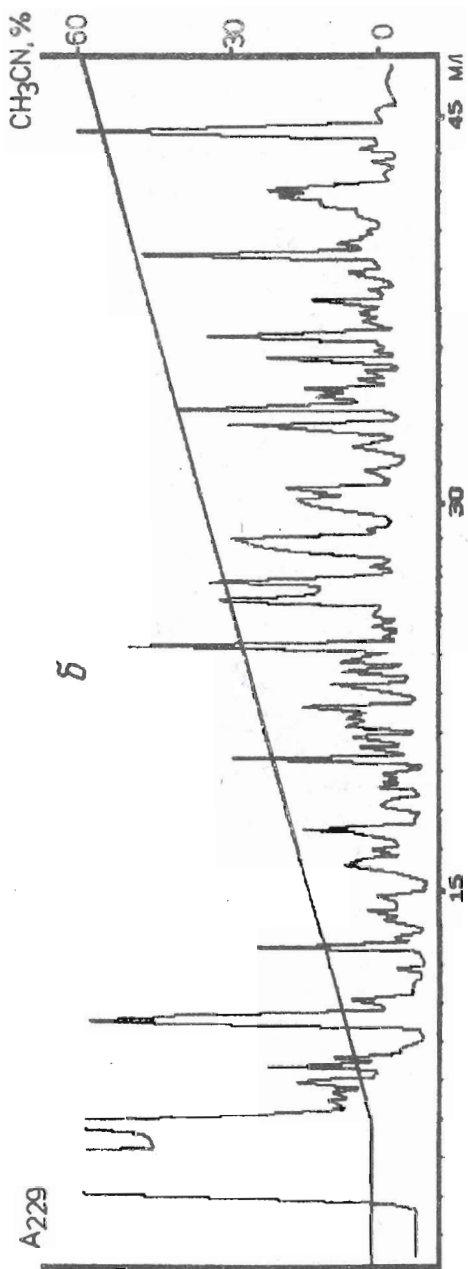


Рис. 66



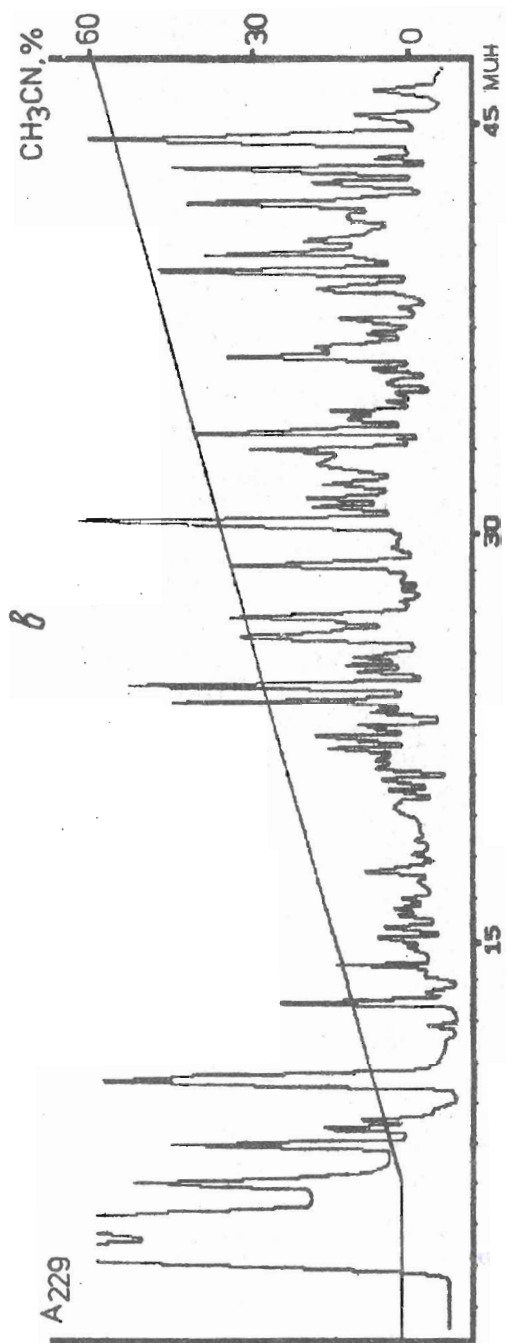


Рис. 66

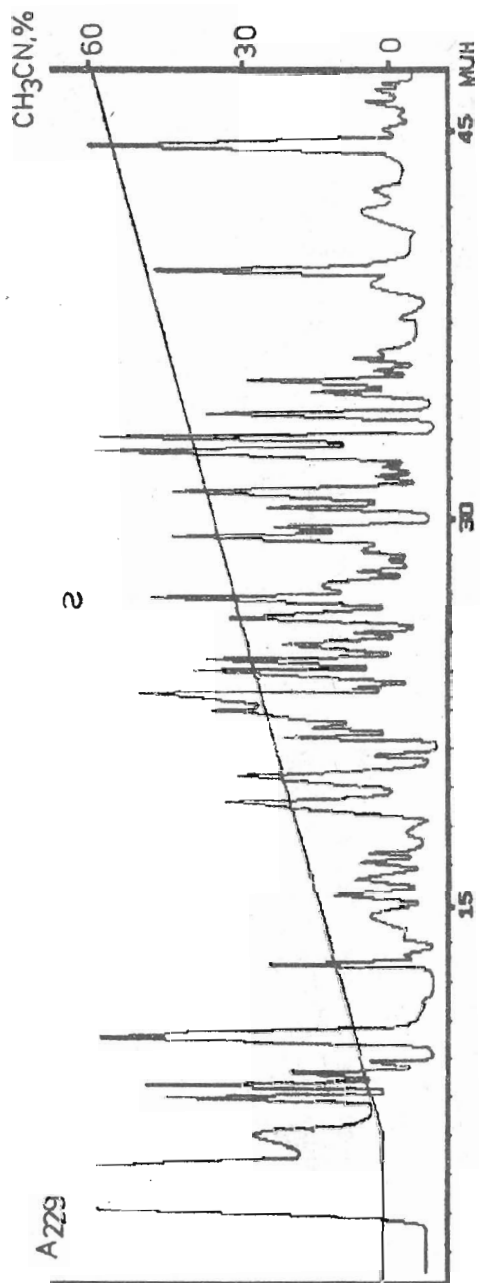


Рис. 62

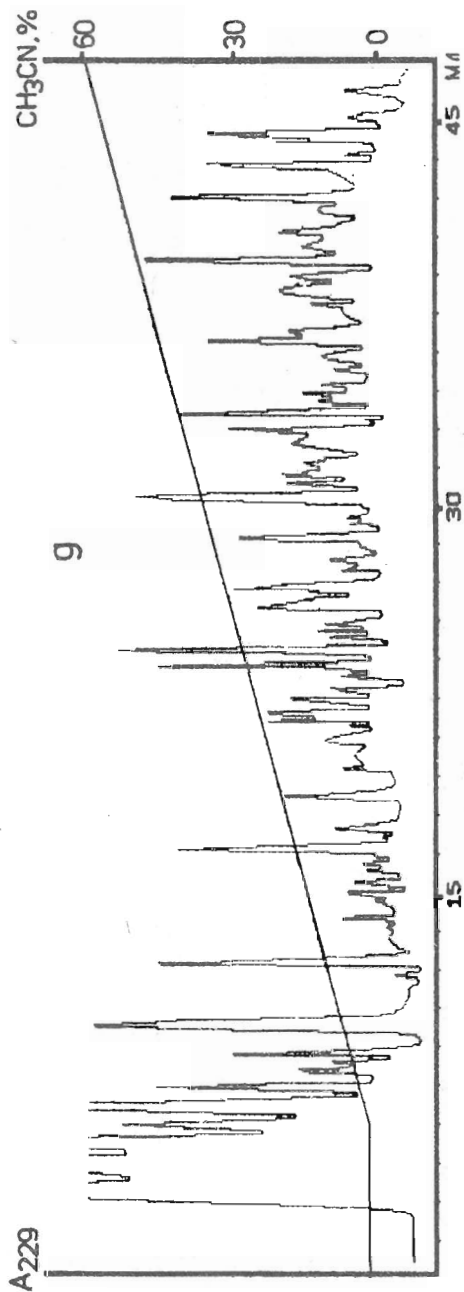


Рис. 6. Обращенно-фазовая хроматография фракции В (рис. 5а), полученной из различных источников на колонке (4,6x250 мм) Nucleosil 7С<sub>8</sub> в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила: а — кортекс крупного рогатого скота, б — субкортекс крупного рогатого скота, в — суммарный мозг крупного рогатого скота, г — суммарный мозг крысы, д — суммарный мозг крупного рогатого скота при изменении условий выделения в сравнении с рис. 6б

Таблица 1

Пептидные фрагменты функциональных белков, выделенные из уксуснокислого экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота

Номер	Структура	Белок-предшественник	Позиция	Содержание, нмоль/г ткани
1	AAAAKIQASFRGHMARKKIKSG- ERGRKGGPGGPGGAGR	Нейрогранин (p17)	24-62	< 0,1
2	FGSDRGAPK	Основной белок миелина	43-51	0,1-1,0
3	FGSDRGAPKRGSGK	Основной белок миелина	43-56	1,0-3,0
4	NKVP	Цитохром-с-оксидаза VIIA	12-15	0,1-1,0
5	IEWNPSVGRVTRKEWREQ	Цитохром-с-оксидаза VIIВ	70-88	< 0,1
6	IEWNPS	Цитохром-с-оксидаза VIIВ	70-75	< 0,1
7	SHYEEGPGKNIPFSVENKWRL	Цитохром-с-оксидаза VIIA	1-21	0,1-1,0
8	FGSGFAAPF	Цитохром-с-оксидаза VIIA	29-37	< 0,1
9	LLPSGWVLSHMENYKCR	Цитохром-с-оксидаза IX	52-68	0,1-1,0
10	SSGANGEEGSARMWKA	Цитохром-с-оксидаза SSG	1-16	< 0,1
11	MLQSLIKKVVWIPMKPYUQAY	6,8 К протеолипид	1-21	0,1-1,0
12	SLIKKVVWIPMKPYUT	6,8 К протеолипид	4-18	< 0,1
13	FIVH	Белок, активирующий GTP-азу	304-307	0,1-1,0
14	MQIFVKLTGKTTTL	Убиквитин	1-15	0,1-1,0

Таблица 4  
Пептиды, выделенные из уксуснокислого экстракта костного мозга крупного рогатого скота (гемалина)

Номер	Структура	Белок, содержащий в структуре гомологичный участок	Источник	Позиция	Гомология, %	Содержание, нмоль/г ткани
1	XLLPGFFDL	Рецептор прогестерона	Курица	587-595	67	0,01-0,1
2	LPQPPQEKA	$\alpha$ 1(1)-цепь коллагена	к.р.с.	763-771	67	0,01-0,1
3	IKGFKADV				< 50	0,01-0,1

## Пептидные фрагменты неизвестных белков, выделенные из уксуснокислого экстракта гомогената мозга крупного рогатого скота

Номер	Структура	Белок, содержащий в структуре гомологичный участок	Источник	Позиция	Гомология, %	Содержание, нмоль/г ткани
15	FLPQH	Аспарагинсинтетаза	Человек	180-184	100	0,1-1,0
16	LNETGDPEFFQYKN	Глутаминсинтетаза	Человек	361-373	100	0,1-1,0
17	LNETGDPEFFQYK	Глутаминсинтетаза	Человек	361-372	100	0,1-1,0
18	LNETGDPEFFQ	Глутаминсинтетаза	Человек	361-370	100	0,1-1,0
19	ISWYDNEFGYSNRV	Gra3P-дегидрогеназа	Человек	335-349	100	0,1-1,0
20	LMYP	Предшественник коллагеназы	Человек	233-236	100	0,1-1,0
21	EGEPNL	Секреторный компонент	Мышь	440-446	100	0,1-1,0
22	YAYYY	Белок множественной устойчивости к лекарственным	Мышь	113-117	100	< 0,1
23	PLFP	Му斯卡риновый ацетилхолиновый рецептор	Свинья	11-14	100	0,1-1,0
24	TFSYGRALQA	Фруктоза-дифосфат-альдолаза A	Мышь	299-308	100	< 0,1
25	FISNHAY	Фруктоза-дифосфат-альдолаза A	Мышь	358-366	100	0,1-1,0
26	[S]RDKR-NH <sub>2</sub>	IgG (ε-цель)	Мышь	337-341	100	< 0,1
27	FPNEPM	Цитохром P450	Мышь	401-406	100	0,1-1,0
28	VVGQV	Кератин 47K, тип I	Мышь	121-125	100	0,1-1,0
29	VLGQV	Фактор C5 комплемента	Человек	1049-1053	100	0,1-1,0
30	EEPGKNIPIFSVENKQR	Цитохром-с-оксидаза VIIIa	к.р.с.	4-20	95	< 0,1
31	INLFFIVL	Белок натриевого канала	Крыса	1576-1582	75	< 0,1
32	TQLPAEIEI	Предшественник вещества P	к.р.с.	15-22	85	< 0,1
33	YKKRPYSKRTA	Предшественник нейротензина	Собака	156-165	50 **	< 0,1
34	IQVFAEPKVLVYVTRL	Белок адгезии нейронов	к.р.с.	562-576	30 **	< 0,1
35	INNPFIL	Пептид LANT-6	Курица	1-6	65 **	< 0,1
36	YEQLSCK	Цитохром-с-оксидаза VIIIa	к.р.с.	3-9	55	0,1-1,0
37	IEG	Пептид является фрагментом множества различных белков				0,1-1,0
38	AYYF	Пептид является фрагментом множества различных белков				0,1-1,0

Таблица 2 (окончание)

39	PVDNSSP	-	-	< 70	0,1-1,0
40	PYVGEIIGKRGIIIGY	-	-	< 28	0,1-1,0
41	VYVYFG	-	-	< 66	< 0,1
42	XXXAEXEXEQTSAPMV	-	-	< 40	< 0,1
43	FEWQLSMLSL	-	-	< 80	0,1-1,0
44	LVLFPFK	-	-	< 80	0,1-1,0
45	ANKFNKEQ	-	-	< 80	< 0,1
46	ALXPPKKG	-	-	< 80	< 0,1
47	GQFFE	-	-	< 80	0,1-1,0
48	LEPPP	-	-	< 80	< 0,1
49	XXPNXXXQQX	-	-	< 80	< 0,1
50	YEAVAL	-	-	< 80	0,1-1,0
51	GVFTPP	-	-	< 80	< 0,1
52	FEIFQPKVGVWNFGG	-	-	< 80	0,1-1,0
53	VILXEEKQQRMK	-	-	< 80	0,1-1,0
54	FLPYYPARKXKKM	-	-	< 80	< 0,1
55	FGFQKVP	-	-	< 80	< 0,1
56	AAKKAAI	-	-	< 80	0,1-1,0
57	IIVPKXQXF	-	-	< 80	< 0,1
58	LPPLGXV	-	-	< 80	0,1-1,0
59	DDRIRRNKVSGLNGVFN	-	-	< 80	0,1-1,0
60	YQNPAIPVPLQLXVPA	-	-	< 80	0,1-1,0
61	IQAVIPNPVSGLQGV	-	-	< 80	< 0,1
62	GENPGTQKGFQKYVPA	-	-	< 80	< 0,1
63	XVKVKV	-	-	< 80	0,1-1,0
64	AQASFPKLQQ	-	-	< 80	< 0,1
65	VGLETLGKLIK	-	-	< 80	< 0,1
66	XATPPGTFY	-	-	< 80	< 0,1
67	FGPPIHGTVLXXMXNY	-	-	< 80	< 0,1
68	VVLFXIXFXXXFXQ	-	-	< 80	< 0,1

\* Скобка обозначает модификацию N-концевого остатка серина.

\*\* Значение гомологии получено с учетом возможности замены функционально близких аминокислот (Lys-Arg, Phe-Tyr, Ile-Val-Leu, Glu-Asp).

Таблица 3

Фрагменты гемоглобина, выделенные из мозга крупного рогатого скота

Номер	Структура	Глобин	Позиция	Содержание, нмоль/г ткани
69	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	$\alpha$	1-32	0,1-1,0
70	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALE	$\alpha$	1-30	1,0-3,0
71	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEY	$\alpha$	1-24	1,0-3,0
72	DKGNV	$\alpha$	6-10	0,1-1,0
73	LSHSL	$\alpha$	101-105	0,1-1,0
74	ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANV	$\alpha$	110-132	1,0-3,0
75	ASHLPSDFTPAVHASLDK	$\alpha$	110-127	0,1-1,0
76	FLANVSTVL	$\alpha$	128-136	0,1-1,0
77	MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	$\beta$	1-30	0,1-1,0
78	MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALG	$\beta$	1-28	0,1-1,0
79	MLTAEKAAVTAFA	$\beta$	1-28	0,1-1,0
80	MLTAEKA	$\beta$	1-8	0,1-1,0
81	MLT	$\beta$	1-3	0,1-1,0
82	WGKVKVDEVGGEA	$\beta$	14-26	0,1-1,0
83	WGKVKVDEVG	$\beta$	14-23	0,1-1,0
84	EVGGEALG	$\beta$	21-28	0,1-1,0
85	EVGGEAL	$\beta$	21-27	<0,1
86	GGE	$\beta$	23-25	0,1-1,0
87	LVVYPWTQRF	$\beta$	31-40	1,0-3,0
88	LVVYPWTQ	$\beta$	31-38	1,0-3,0
89	LVVYPWT	$\beta$	31-37	0,1-1,0
90	LVVYP	$\beta$	31-35	0,1-1,0
91	VVYPWTQRF	$\beta$	32-40	1,0-3,0
92	VVYPWTQ	$\beta$	32-38	0,1-1,0
93	VVVLARNFGEFTPVVLQADFQKVAVAGVAN-?	$\beta$	110-138-?	0,1-1,0
94	VVVLARNFGEFTPVVLQ	$\beta$	110-128	0,1-1,0
95	VVVL	$\beta$	110-113	0,1-1,0
96	ARNFGGEFTPVVLQ	$\beta$	114-126	0,1-1,0
97	VLQ	$\beta$	124-126	0,1-1,0
98	FQKVAVAGVANALAHRYH	$\beta$	129-145	0,1-1,0

При анализе приведенных в таблицах данных возникает вопрос: существуют ли идентифицированные пептиды *in vivo*, или они образуются в результате ферментативного протеолиза в ходе выделения? Для однозначного ответа на этот вопрос необходимы дополнительные эксперименты, однако имеется ряд косвенных данных, свидетельствующих об эндогенной природе выделяемых пептидов:

а) сравнение хроматографических профилей разделения экстрактов гомогената мозга, полученных в экспериментах, различающихся по времени обработки мозгового материала (1 и 6 ч от момента забоя животных до глубокого охлаждения биологического материала (рис. 6в,г), соответственно продолжительность процесса экстракции 10% уксусной кислотой 0,5 и 4 ч), показало, что количество основных составляющих пептидных компонентов сравнимо в обоих случаях;

б) сравнительный анализ пептидных фракций коры и субкортекса, полученных при идентичных условиях выделения, показал существенные различия. В случае хаотического протеолиза можно было бы ожидать более усредненной картины;



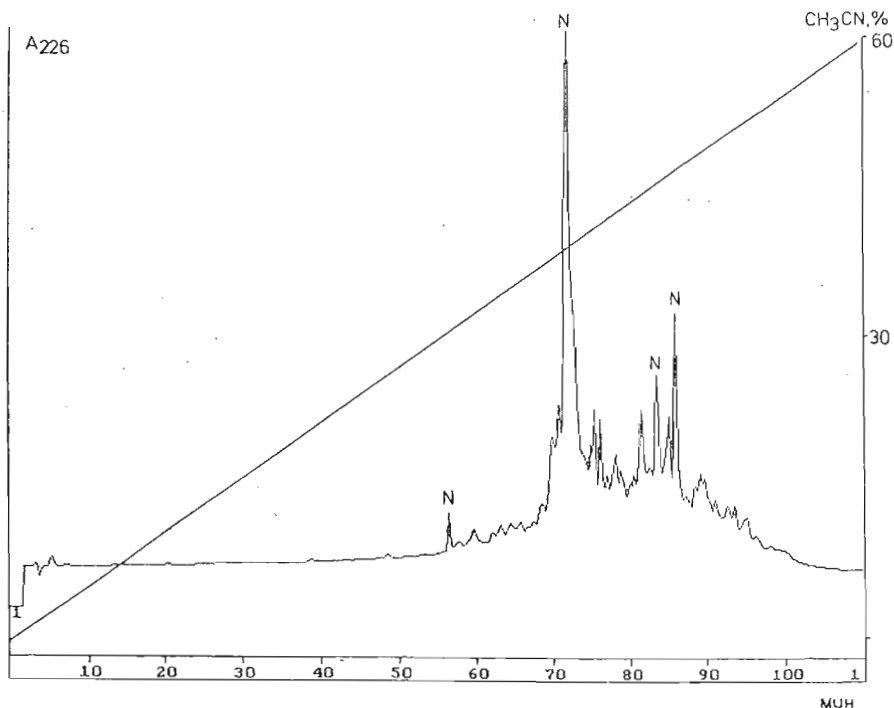


Рис. 7. Обращенно-фазовая хроматография фракции I (рис. 5б) на колонке (10×250 мм) Nucleosil 7C<sub>8</sub> в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила (0—60%). Скорость элюции 2,5 мл/мин. N — пики, соответствующие веществам, не поддающимся секвенированию

в) среди выделенных пептидов присутствуют чрезвычайно лабильные ((2) и (3) — табл. 1). Нами было показано, что пептид (2) разрушается по связи Asp-Arg на 5—10% при хранении лиофилизованного препарата при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение недели. Его присутствие в выделяемых фракциях в значительных количествах свидетельствует о сравнительно мягких условиях выделения, не способствующих химической дегградации выделяемых пептидов;

г) в ряде работ по выделению и установлению структуры эндогенных пептидов как из целого мозга, так и из различных его структур (гипоталамус [6], средний мозг [7]) были идентифицированы фрагменты гемоглобина, аналогичные или весьма близкие тем, которые описываются в настоящей работе;

д) из почти 100 пептидов, структура которых установлена к настоящему моменту, не найдено ни одного фрагмента сывороточных белков, содержание которых сравнимо с содержанием гемоглобина (альбуминов, иммуноглобулинов и т.д.). В то же время выделены пептиды — фрагменты нейроспецифических белков, в частности предшественника вещества P, которые присутствуют в заведомо меньших количествах, чем тканенеспецифические белки.

Структуры пептидов, приведенные в табл. 1 и 2, сравнивались с аминокислотными последовательностями, содержащимися в белково-

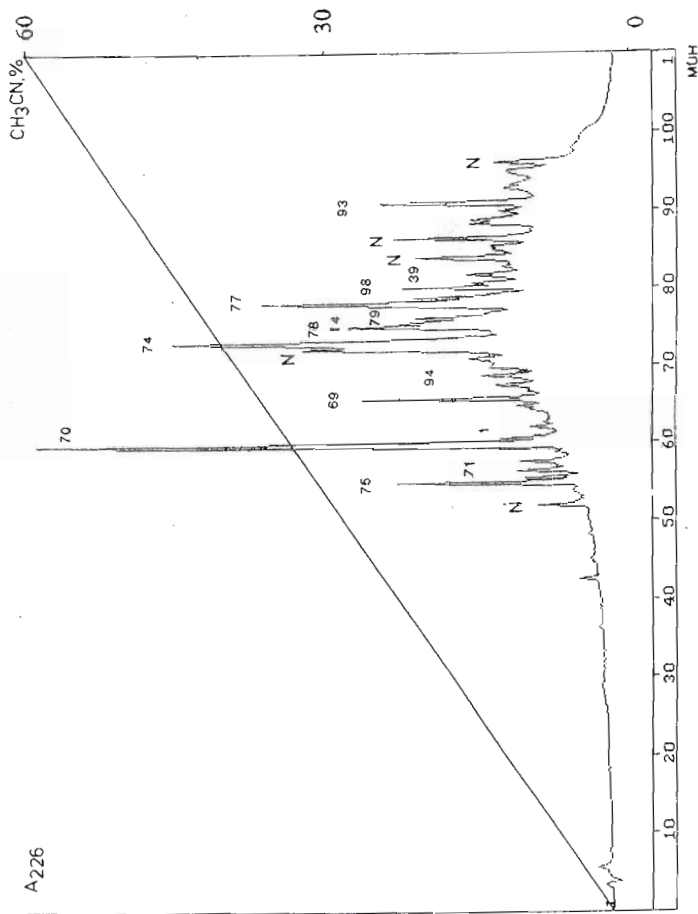


Рис. 8. Обращенно-фазовая хроматография фракции II (рис. 5б) (условия как на рис. 7). Числа здесь и на рис. 9 отвечают номерам структур, приведенных в табл. 1 и 2; положение чисел соответствует пикам или областям, из которых выделен секвенированный пептид

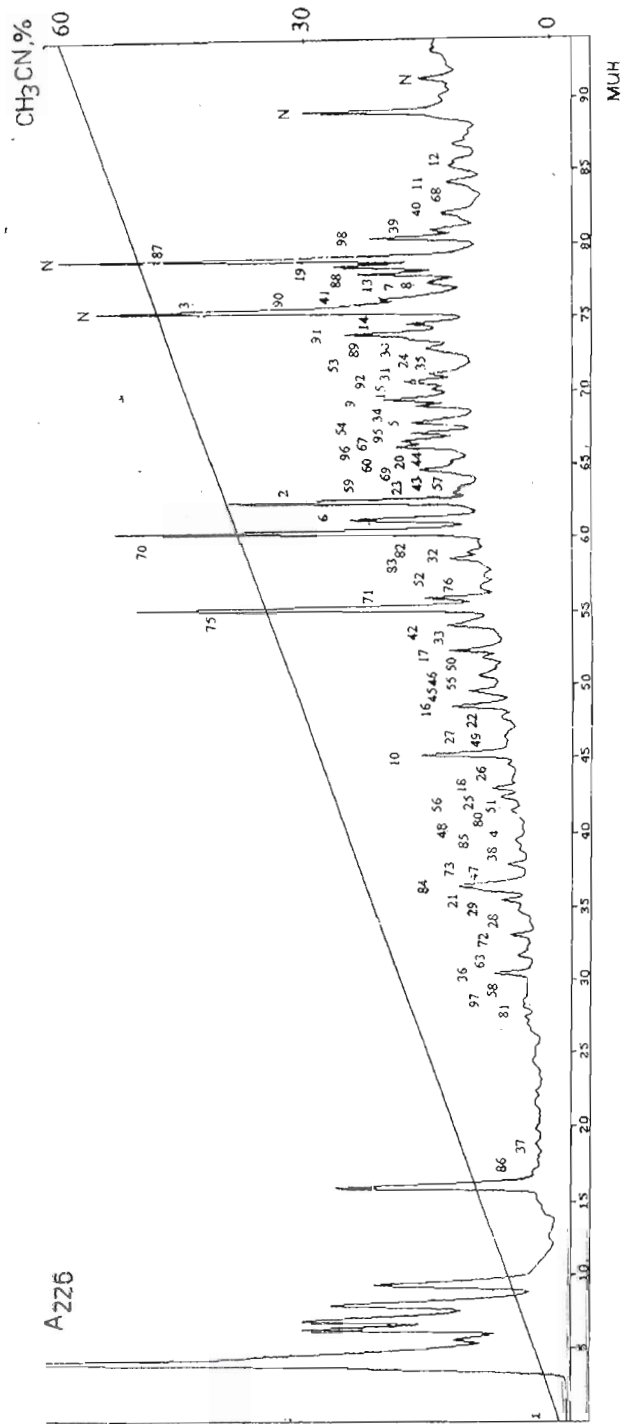


Рис. 9. Обращенно-фазовая хроматография фракции III (рис. 5б) (условия как на рис. 7)

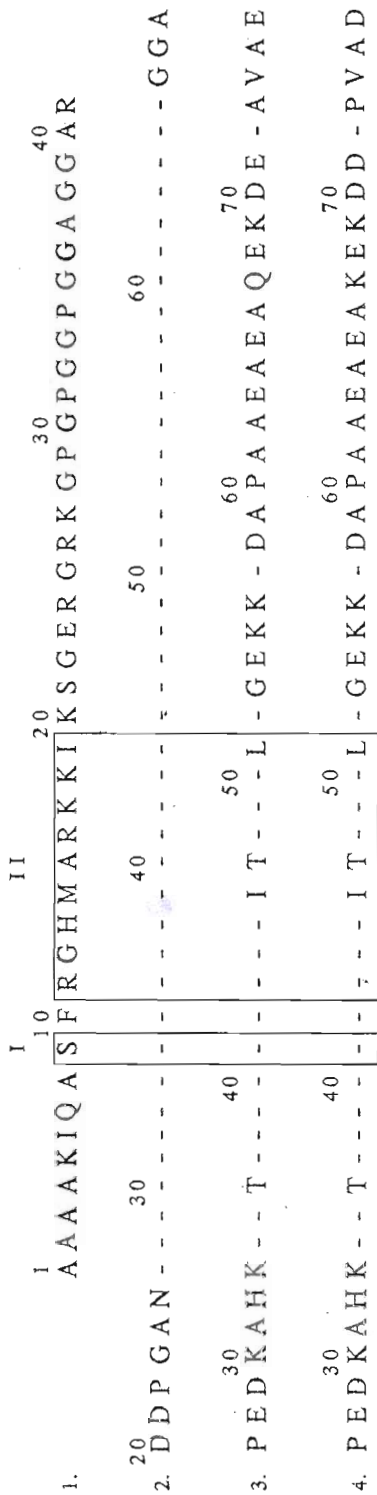


Рис. 10. Сравнение активного участка нейроспецифических кальмодулинсвязывающих субстратов протеинкиназы С: 1 — пептид В-30 (к.р.с.), 2 — нейрогранин (p17) (к.р.с.), 3 — RC3 (крыса), 4 — нейромодулин (p57) (к.р.с.), 5 — GАР-43 (В-50) (крыса). Прочерк означает остаток, идентичный остатку верхней строки. В рамки взяты фосфорилируемый остаток серина (I) и участок связывания кальмодулина (II)

пептидном банке PIR (версия 29.0, октябрь 1991 г.). Для этого использовалась разработанная в ИБХ РАН программа определения локального сходства, в основу которой положен алгоритм быстрого поиска [8]. Было показано, что часть идентифицированных пептидов (1)–(15) и (69)–(98) – это фрагменты известных белков крупного рогатого скота как нейроспецифических (нейрогранин (1), основной белок миелина (2, 3)), так и тканеспецифических (цитохром-с-оксидаза (4)–(10), убиквитин (15)). Для пептидов (16)–(29) также найдены идентичные участки в последовательностях известных полипептидов из различных организмов, однако для крупного рогатого скота структуры белков, родственных таким полипептидам, не определены. Установить происхождение идентифицированных коротких пептидов (37, 38) не представляется возможным, поскольку аналогичные фрагменты присутствуют в большом количестве самых разнообразных белков.

Сложнее определить происхождение пептидов (30)–(36) и (39)–(68). При их сравнении со структурами, содержащимися в банке PIR, в различных белках было показано наличие участков, которые в фиксированных позициях включают определенное количество остатков, идентичных остаткам пептида. В случае пептида (31), для которого в белке натриевого канала крысы найден фрагмент со степенью подобия 75%, вероятно, можно говорить о происхождении из аналогичного белка крупного рогатого скота. Предшественниками пептидов (30), (32)–(36) и (36)–(68) являются неизвестные белковые молекулы. Для определения вероятного предшественника этих пептидов проводилось сравнение идентифицированных структур с последовательностями, содержащимися в банке PIR, в условиях, допускающих фиксированный процент различающихся остатков в произвольных позициях (процент гомологии). В случае пептидов (30), (32) и (36) указанные в табл. 2 белки содержали в своей последовательности участки с максимальным из всех проверенных белков количеством идентичных остатков, что говорит о возможном происхождении пептидов из пока неизвестных, но родственных этим белкам молекул. Для пептидов (39)–(42) белки, содержащие гомологичные структуры, не были обнаружены, что не позволяет в настоящее время определить их возможное происхождение или может говорить о принципиально новых предшественниках. Для пептидов (43)–(68) в структурах белков, представленных в банке PIR, не найдены участки аминокислотных последовательностей, идентичных на 80% и более. Возможность присутствия белков с более низкой степенью гомологии для этих пептидов находится на этапе установления.

За исключением уже упомянутых пептидов (22) и (33), свойства открытых нами компонентов мозга еще слабо изучены. Тем не менее многие из них несомненно могут проявлять биологическую активность в адекватно выбранных условиях. Например, пептид (1) (табл. 1), названный В-30, представляющий собой фрагмент недавно описанного нейроспецифического белка нейрогранина [9], является кальмодулинсвязывающим субстратом протеинкиназы С. Аминокислотная последовательность этого пептида включает в себя фосфорилируемый остаток серина и участок связывания кальмодулина. К этой же группе кальмодулинсвязывающих субстратов протеинкиназы С относится и хорошо известное семейство белков В-50 (F-1, GAP-43, нейромодулин), содержащих в своей последовательности активный участок, высоко гомологичный (до 75%) соответствующему фрагменту пептида В-30 (рис. 10). Основная функция этой группы белков, как полагают, заключается в регуляции роста и дифференцировки нервных клеток через воздействие на механизмы кальциевого обмена.

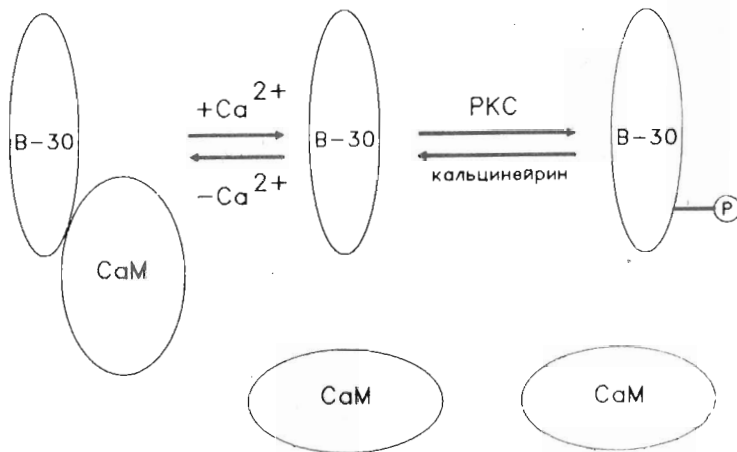


Рис. 11. Схема регуляции кальциевого обмена кальмодулинсвязывающими субстратами протеинкиназы С (РКС) на примере пептида В-30. CaM — кальмодулин, P — фосфатная группа

Полученный нами синтетический аналог выделенного пептида В-30 (1–25) воспроизводит все свойства нейрогранина, а именно: связывает кальмодулин, фосфорилируется протеинкиназой С в присутствии  $Ca^{2+}$  и дефосфорилируется кальцинейрином (рис. 11) [10]. Естественно предположить для эндогенного пептида *in vivo* роль, аналогичную нейрогранину, хотя биологические функции В-30 и его предшественника могут в чем-то существенно различаться — например, вследствие того что нейрогранин — кислый белок ( $pI$  5,4–5,6), а идентифицированный нами пептид — сильноосновный ( $pI > 9,0$ ).

Пептиды (87)–(92) (табл. 2) содержат в последовательности фрагмент 34–37  $\beta$ -цепи гемоглобина крупного рогатого скота, идентифицированный ранее в катепсин-пепсиновом гидролизате гемоглобина, названный геморфином-4 и обладающий опиоидной активностью [11, 12]. Фрагмент гемоглобина 32–40, также включающий в свою структуру участок последовательности, соответствующей геморфину-4, был недавно выделен из мозга человека; для него было показано наличие опиоидных свойств, в частности способность ингибировать связывание радиоактивных лигандов с  $\mu$ - и  $\sigma$ -опиоидными рецепторами [7]. Обращает на себя внимание высокое содержание пептидов (87), (88) и (91) в мозговом материале (1–3 нмоль/г мозговой ткани).

Внутрижелудочковое введение пептидов (2) и (3) крысам в дозах 0,1–0,5 мг/кг вызывает седативный эффект [13]. Аналогичное введение пептидов (88) и (92) в дозе 2,0 мг/кг мышам вызывает у подопытных животных кратковременные, но ярко выраженные судороги на протяжении 10–16 мин. Через 30 мин после инъекции животные по всему спектру снимаемых показателей не отличались от контрольной группы, что говорит об отсутствии грубых неспецифических нарушений поведения после инъекции, а также об отсутствии общетоксического действия, оказываемого вводимыми пептидами [14].

Наконец, отметим, что пептид (19), представляющий собой фрагмент 335–449 глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, выщепляется из области, которая, по данным рентгеноструктурного анализа [15],

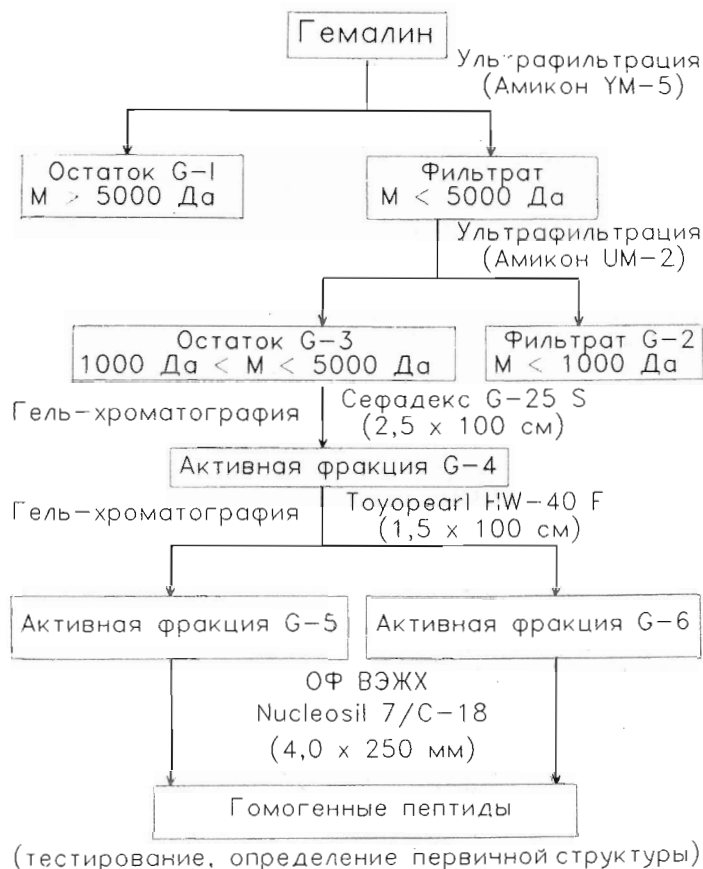


Рис. 12. Схема разделения уксуснокислого экстракта костного мозга крупного рогатого скота (гемалина)

включает в себя остаток тирозина активного центра фермента и область контакта его субъединиц. Не исключено, что этот пептид участвует в регуляции активности фермента, аналогично тому как фрагменты 68–77 и 304–313 этого же белка ингибируют активность ангиотензинконвертазы [16].

### Пептиды костного мозга крупного рогатого скота

В итоге многолетних исследований В.Г. Морозов и В.Х. Хавинсон показали, что экстракты различных тканей и органов крупного рогатого скота обладают выраженной биологической активностью [17, 18]. В частности, экстракт красного костного мозга, названный гемалином, обладал способностью восстанавливать кроветворные функции животных после воздействия радиации или цитостатиков [19]. В совместной работе с указанными авторами мы предприняли поиск активных компонентов гемалина [20, 21]. После ряда последовательных стадий выделения и очистки (рис. 12–15) было установлено, что гемалин



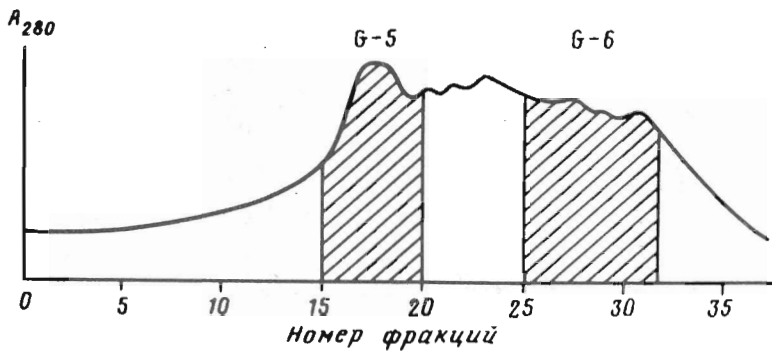


Рис. 13. Гель-хроматография фракции G-4 гемалина (рис. 12) на колонке (1,5×100 см) с TSK-Gel Toyo-Real HW-40 F, уравновешенным 0,05 М ацетатом аммония. Скорость элюции 2,5 мл/мин, объем фракций 4 мл. Заштрихованы фракции, содержащие биологически активные вещества

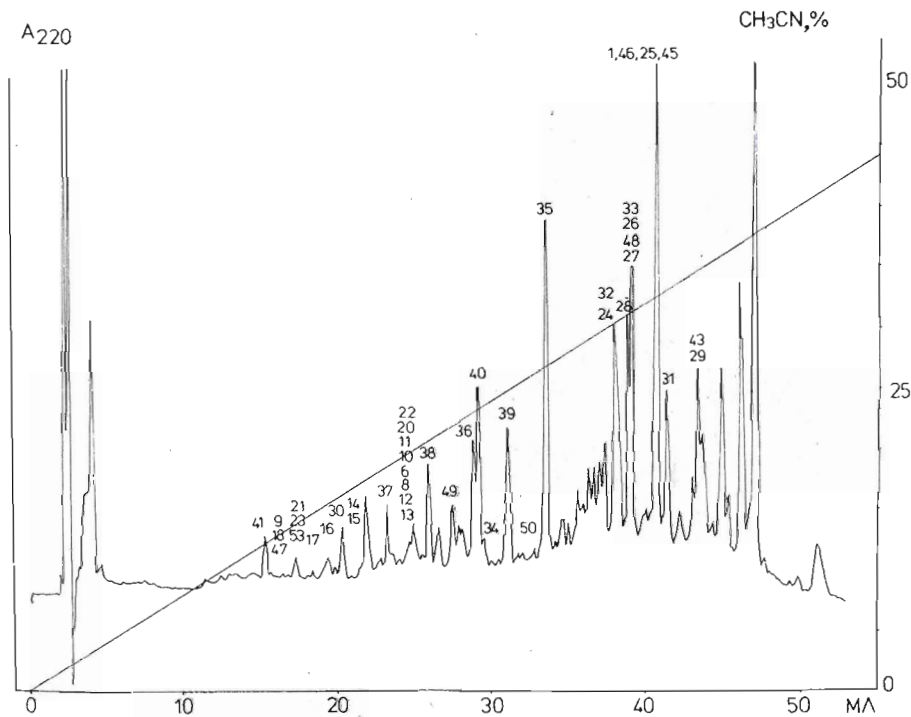


Рис. 14. Обращенно-фазовая хроматография фракции G-5 гемалина (рис. 12) на колонке (4,0×250 мм) Nucleosil 7C<sub>18</sub> в присутствии 0,03% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила. Номерами обозначены пики, соответствующие пептидам с установленной структурой (табл. 3 и 4)

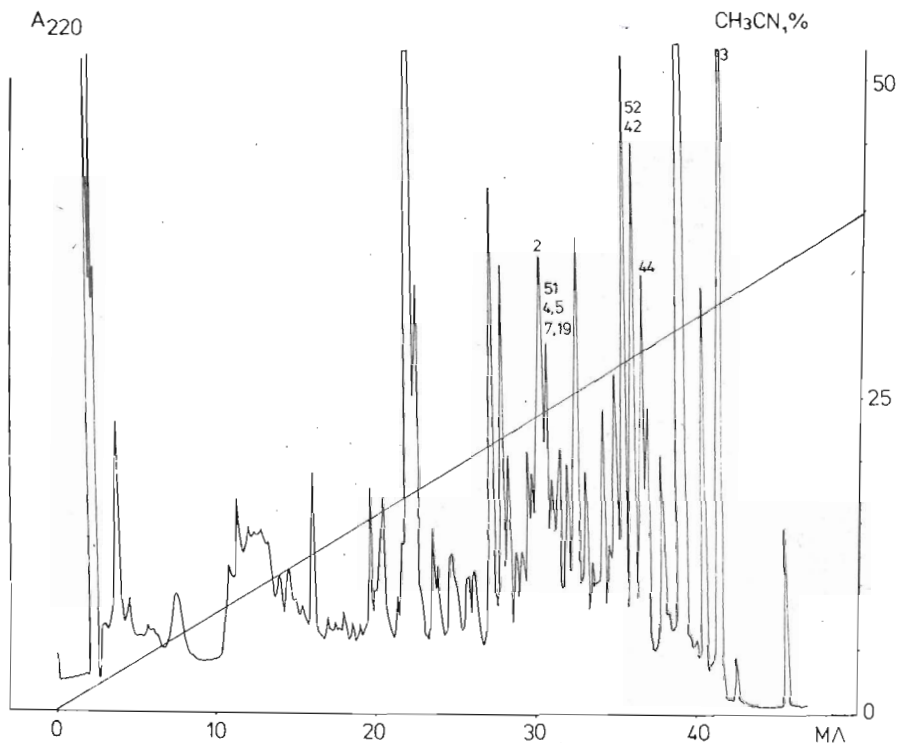


Рис. 15. Обращенно-фазовая хроматография (условия и обозначения см. рис. 14) фракции G-6 гемалина (рис. 12)

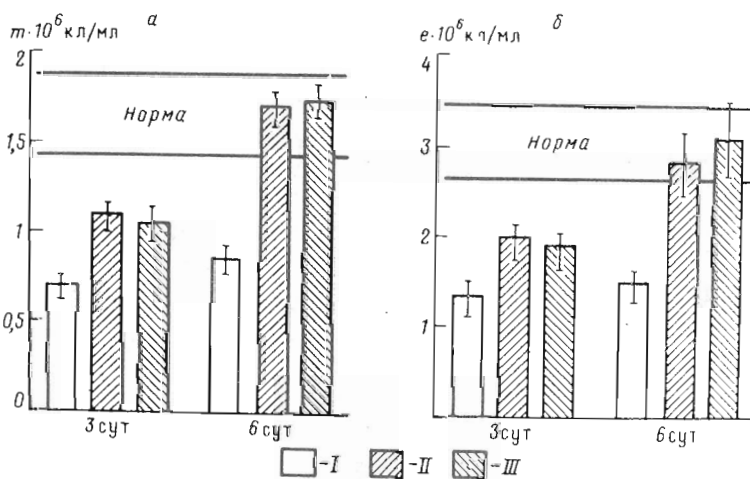


Рис. 16. Влияние биологически активной фракции G-4 (рис. 12) и синтетического октапептида (38) (табл. 4) на удельную концентрацию (число клеток/мл) миелокариоцитов ( $m$ ) (а) и содержание (число клеток/мл) лейкоцитов периферической крови ( $e$ ) (б). Данные экспериментов на мышах линии СВА, которым для подавления нормального кроветворения предварительно внутрибрюшинно вводили 170 мг/кг 5-фторурацила (I). Фракцию G-4 (рис. 12) (II) и пептид (38) (табл. 4) (III) вводили внутрибрюшинно (0,1 и 0,01 мг/кг соответственно) через 5 сут после инъекции 5-фторурацила. В контрольной группе животных соответствующие показатели восстанавливались через 25–30 сут

состоит в основном из пептидных компонентов. Для более чем 50 из них были определены первичные структуры, около 20 из них оказались биологически активными, для части пептидов активность была подтверждена подробным исследованием синтетических образцов. Соответствующие аминокислотные последовательности представлены в табл. 3 и 4, типичный результат биотестирования показан на рис. 16. Как видно из приведенных таблиц, большинство пептидов костного мозга — это фрагменты  $\alpha$ - или  $\beta$ -цепей гемоглобина.

### Пептиды мозга гибернарующих якутских сусликов

Данные, полученные в разных лабораториях к началу 80-х годов, свидетельствовали о том, что мозг и периферические ткани гибернарующих (зимнеспящих) животных содержат активные компоненты, ответственные за различные стадии зимней спячки (снижение уровня метаболизма, температуры тела и т.д.) [22—26]. Основываясь на этих данных, мы предприняли поиск соответствующих факторов в мозге якутских сусликов *Citellus undulatus*, находящихся в состоянии зимней спячки [27]. В итоге многостадийного фракционирования (рис. 17—19), сопровождавшегося определением свойств получаемых фракций в опытах *in vivo* и *in vitro*, была выделена и сквенирована серия коротких пептидов, структура которых представлена в табл. 5. Из них пептид (1) оказался идентичным С-концевому пентапептиду  $\alpha$ -цепи гемоглобина, выделенного в 1982 г. из мозга крупного рогатого скота [28], названному неокиоторфином и имеющему слабые анальгетические свойства. Нами было показано, что неокиоторфин стимулирует потенциалзависимый кальциевый ток в волокнах сердечной мышцы лягушки, повышает внутриклеточную концентрацию кальция в кардиоцитах крысы и индуцирует выход (пробуждение) сусликов из состояния зимней спячки [27, 29].

Весьма интересные свойства обнаружил дипептид Asp-Tyr (15), оказавшийся ингибитором потенциалзависимого кальциевого тока в волокнах сердечной мышцы лягушки и обратимо ингибирующий рост различных клеточных культур. Дипептид Asp-Tyr — первый эндогенный пептидный блокатор кальциевой проницаемости клеточных мембран. В настоящее время изучаются биологические свойства других пептидов, представленных в табл. 6, и продолжится поиск новых пептидов из активной фракции на рис. 18 в надежде обнаружить новые нейропептиды с гипотермической, антиметаболической и кардиотропной активностью.

### Гемоглобин как источник активных пептидов

Несмотря на то что описанные выше исследования развивались независимо и с разными целями и еще далеки от своего завершения, полученные результаты уже на этом этапе позволяют сделать некоторые заключения. Например, с полной определенностью можно сказать, что, исполняя роль переносчика кислорода, гемоглобин является в то же время и богатейшим источником эндогенных регуляторных пептидов. Действительно, активные пептиды, являющиеся фрагментами гемоглобина, были найдены во всех трех изучаемых тканях, общее их число превысило 150, и есть все основания ожидать, что дальнейшие исследования увеличат список таких пептидов и расширят спектр их биологических свойств. Кроме описанной выше гемостатической активности многочисленных фрагментов гемоглобина, выделенных нами из препаратов костно-

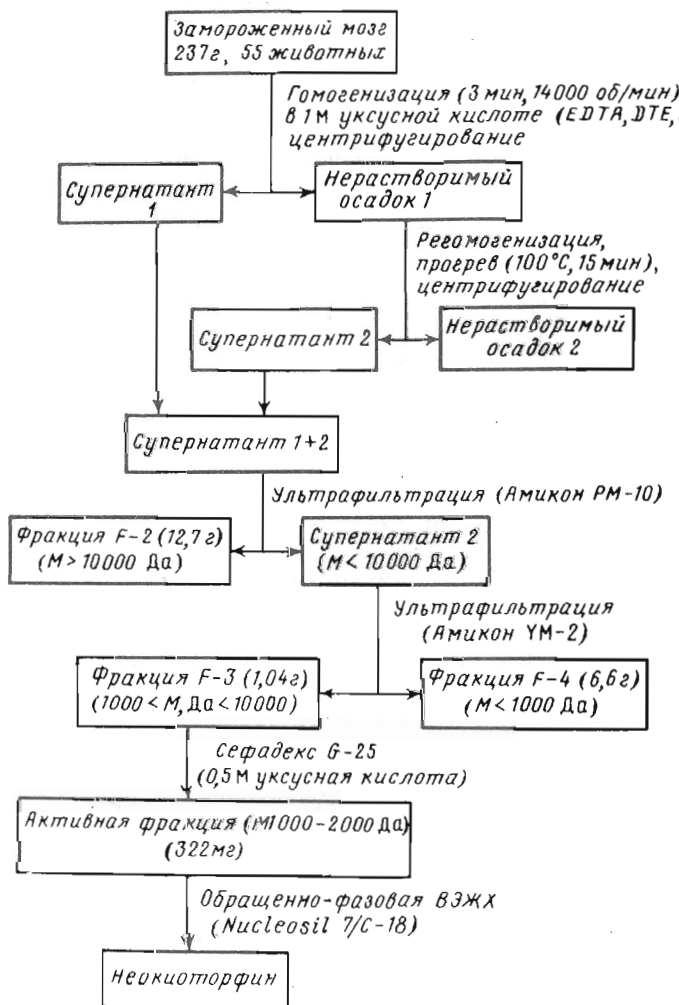


Рис. 17. Схема выделения биологически активных веществ из мозга гибернирующих сусликов

Таблица 5

Фрагменты гемоглобина, выделенные из уксуснокислого экстракта  
костного мозга крупного рогатого скота (гемалина)

Номер	Структура	Глобин	Позиция	Содержание, нмоль/г ткани
4	VLSAADKGNVKAAWGK	$\alpha$	1-16	<0,01
5	VLSAADKGNVKAAWG	$\alpha$	1-15	<0,01
6	VLSAADKGNVKAA	$\alpha$	1-13	0,01-0,1
7	VLSAADKGNVKA	$\alpha$	1-12	<0,01
8	LSAADKGNVKAA	$\alpha$	2-13	0,01-0,1
9	SAADKGNV	$\alpha$	3-10	<0,01
10	KVGGHAAEYGAEA	$\alpha$	16-28	0,01-0,1
11	KVGGHAAEYGAE	$\alpha$	16-27	0,01-0,1
12	KVGGHAAEYGA	$\alpha$	16-26	0,01-0,1
13	VGGHAAEYGAEA	$\alpha$	17-28	0,01-0,1
14	AEYGAE	$\alpha$	22-27	0,1-0,3
15	GAEALER	$\alpha$	25-31	0,01-0,1
16	AEALERM	$\alpha$	26-32	0,01-0,1
17	EALERM	$\alpha$	27-32	0,01-0,1
18	EALE	$\alpha$	27-30	0,01-0,1
19	LSFPTTK	$\alpha$	34-40	<0,01
20	DLSHIGSAQV	$\alpha$	47-55	0,01-0,1
21	ALTKA	$\alpha$	65-69	0,01-0,1
22	LPGALSELS	$\alpha$	76-84	0,01-0,1
23	LPGA	$\alpha$	76-79	0,01-0,1
24	LASHLPSDFTPAV	$\alpha$	109-121	0,01-0,1
25	ASHLPSDFTPAVHA	$\alpha$	110-123	0,1-0,3
26	ASHLPSDFTPAVH	$\alpha$	110-122	0,01-0,1
27	ASHLPSDFTPAV	$\alpha$	110-121	0,01-0,1
28	ASHLPSDFTPA	$\alpha$	110-120	0,01-0,1
29	ASHLPSDF	$\alpha$	110-117	0,01-0,1
30	ASHLPS	$\alpha$	110-115	0,1-0,3
31	ASHLP	$\alpha$	110-114	0,01-0,1
32	LPSDFTPAVH	$\alpha$	113-122	0,01-0,1
33	LPSDF	$\alpha$	113-117	0,1-0,3
34	LDKFLA	$\alpha$	125-130	0,01-0,1
35	MLTAEKAAVT	$\beta$	1-11	0,01-0,1
36	MLTAEKAAV	$\beta$	1-10	0,01-0,1
37	MLTAEKAA	$\beta$	1-9	0,01-0,1
38	MLTAEKA	$\beta$	1-8	0,01-0,1
39	MLTAE	$\beta$	1-5	0,01-0,1
40	LTAEKA	$\beta$	2-8	0,01-0,1
41	AEEKAA	$\beta$	4-9	0,01-0,1
42	GKVKVDEVGGEALGRL	$\beta$	15-30	0,01-0,1
43	VKVDEVGGEALGRL	$\beta$	17-30	0,01-0,1
44	DEVGGEALGR	$\beta$	20-29	0,01-0,1
45	EVGGEALGRL	$\beta$	21-30	0,1-0,3
46	EVGGEALGR	$\beta$	21-29	0,1-0,3
47	EALG	$\beta$	25-28	0,01-0,1
48	ALG	$\beta$	26-28	0,1-0,3
49	SNGMKHLLDDLK	$\beta$	71-81	0,01-0,1
50	KLHVDPE	$\beta$	94-100	0,01-0,1
51	ARNFGKEF	$\beta$	114-121	0,01-0,1
52	NFGGEFTPV	$\beta$	116-124	0,01-0,1
53	VLQA	$\beta$	124-127	0,01-0,1

Таблица 6

Эндогенные пептиды, выделенные из мозга гиперирующих сусликов

Номер	Структура	Белок- предшественник	Содержание, нмоль/г ткани
1	TSKYR	$\alpha$ -Гемоглобин-137-141	0,5-3,0
2	TSKY	$\alpha$ -Гемоглобин-137-140	0,01-0,05
3	SKYR	$\alpha$ -Гемоглобин-138-141	0,01-0,05
4	VHLSDG EKNAISTAWG	$\beta$ -Гемоглобин-1-16	0,5-3,0
5	IVIVMA	$\beta$ -Гемоглобин-110-115	0,5-3,0
6	VVAGVANA	$\beta$ -Гемоглобин-133-140	0,5-3,0
7	INDPF*	СгаЗР-дегидрогеназа-33-37	0,5-3,0
8	QSKI	**	0,01-0,05
9	AL	**	0,05-0,5
10	FK	**	0,05-0,5
11	RLL	**	0,01-0,05
12	FP	**	0,01-0,05
13	FI	**	0,01-0,05
14	VD	**	0,01-0,05
15	DY	**	0,05-0,5
16	LS	**	0,01-0,05
17	VG	**	0,01-0,05
18	IQ	**	0,01-0,05
19	LT	**	0,01-0,05
20	SM	**	0,01-0,05
21	AGG	**	0,01-0,05
22	VGG	**	0,01-0,05
23	LR	**	0,01-0,05

\* Структура пептида найдена в аминокислотной последовательности белка человека.

\*\* Ряд белков содержит фрагменты, идентичные по структуре.

го мозга крупного рогатого скота, Шалле и сотр. [30] показали, что выделенный из гипоталамуса свиньи фрагмент 33-46  $\alpha$ -цепи гемоглобина стимулирует секрецию адренокортикотропного гормона в культуре клеток гипофиза крысы; Гламста и сотр. [7] выделили из мозга человека фрагмент 32-40  $\beta$ -цепи, обладающий опиоидной активностью; установлено, что клетки костного мозга свиньи секретируют в среду фрагменты  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина (33-38 и 32-37 соответственно), обладающие антиноцицептивной и иммуномодулирующей активностью [31]. Достаточно хорошо изучены поведенческие и биохимические свойства опиоидоподобных пептидов из гемоглобина — киоторфина [32] и неокиоторфина [27-29], являющихся С-концевыми фрагментами  $\alpha$ -цепи.

Полученные нами данные по структуре гемоглобиновых пептидов суммированы на рис. 20. Известные в настоящее время области гемоглобина, служащие источником биологически активных пептидов, схематически показаны на рис. 21.



## Предлагаемая классификация эндогенных пептидов

Происхождение		Способ регуляции	Механизм действия	Специфичность		Проявление активности (время действия)
Источник	Способ образования			Константа связывания, нМ	Содержание, пмоль/г ткани	
Блок-предшественник	Дискретное выщепление (процессинг)	Секретция в синапс (направленная нейротрансдача)	Наличие собственных рецепторов на postsинаптической мембране	1-1000	0,001-1,0	Направленное проведение нервного импульса от нейрона к нейрону (мс-мин)
То же	То же	Секретция во внеклеточное пространство (ненаправленная нейрорегуляция)	Наличие собственных рецепторов на нейрональной мембране	1-10	0,001-1,0	Регуляция биохимических процессов и нейропередачи на уровне групп клеток (мин-ч)
Функциональный белок	Выщепление гомологичными группами (протеолиз) (протеолиз)	Изменение уровня содержания в зависимости от скорости протеогенеза (ненаправленная регуляция)	Взаимодействие с рецепторами гомологичных нейропептидов на теле нейрона	100-10000	10-10000	Пролонгированное изменение общего количества лиганд-рецепторных комплексов ("рецепторный тонус") (сут)



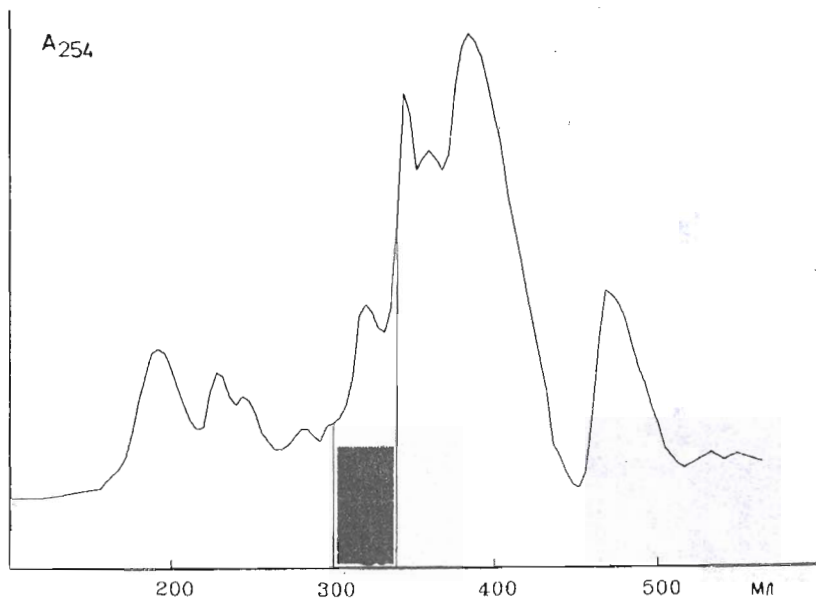


Рис. 18. Гель-хроматография фракции 1—10 кДа (рис. 17) на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,5 М уксусной кислотой. Отмечена область элюции биологически активного материала

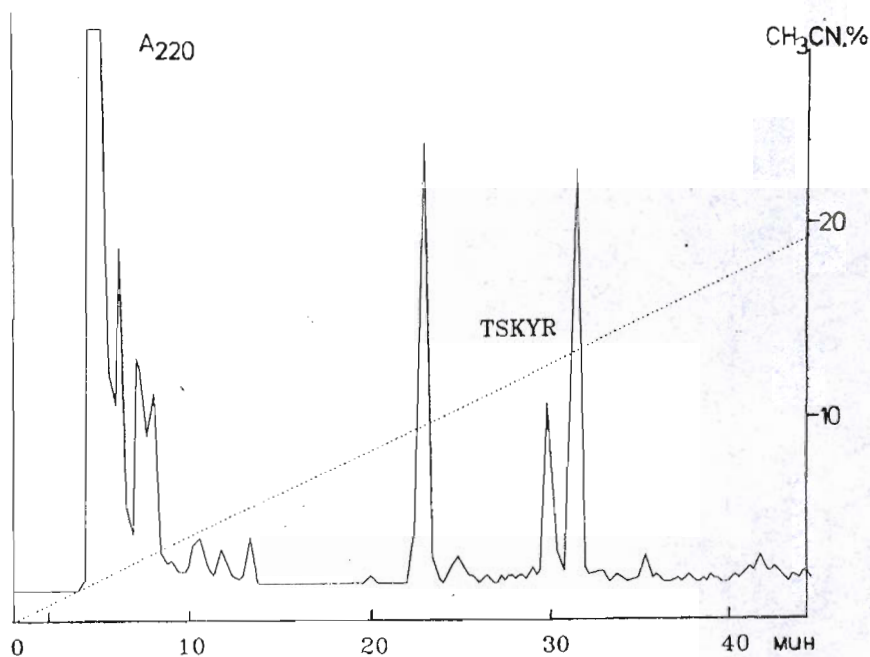


Рис. 19. Обращенно-фазовая хроматография биологически активной фракции (рис. 18) на колонке (4,0×250 мм) Nucleosil 7C8. А — 0,04% трифторуксусная кислота; Б — 60% ацетонитрил; скорость элюции 0,5 мл/мин

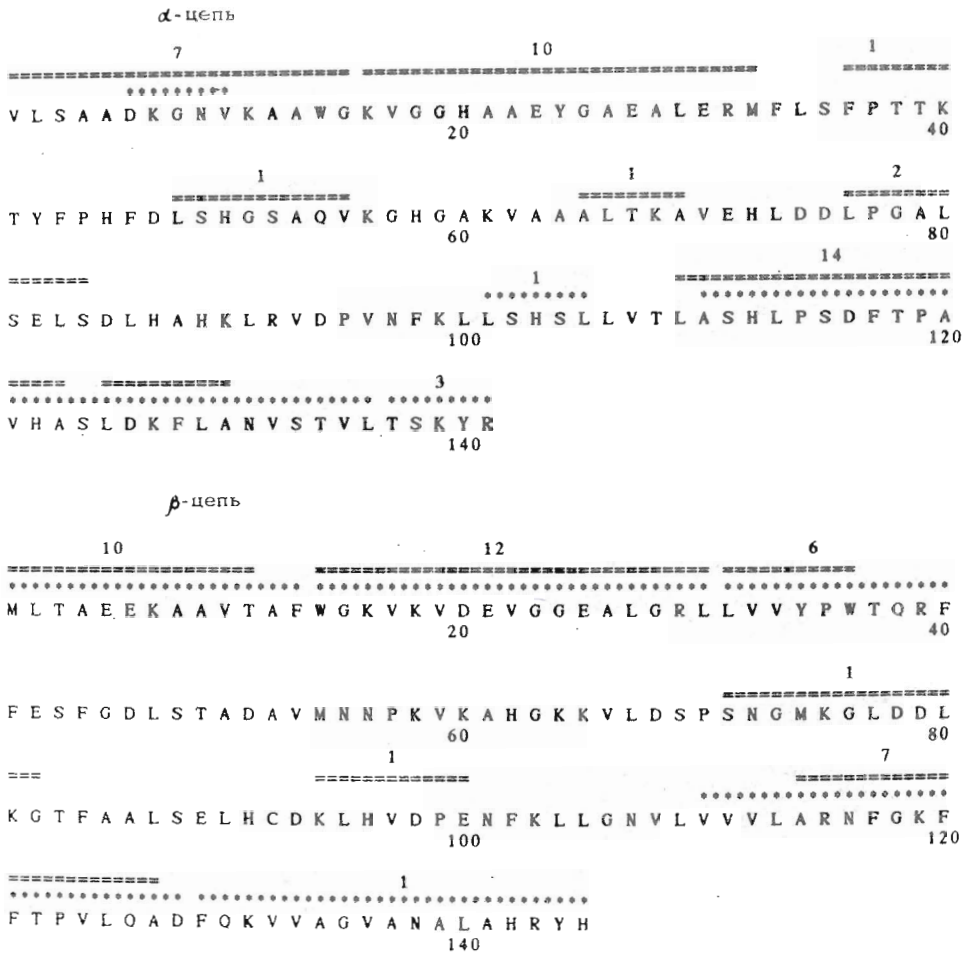


Рис. 20. Группы эндогенных фрагментов гемоглобина, выделенные из костного мозга крупного рогатого скота (двойная линия) и из мозга крупного рогатого скота и якутских сусликов. Цифрами обозначено общее количество пептидов в группах

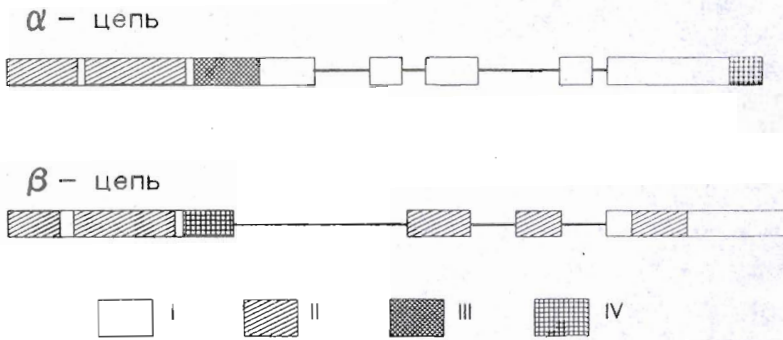


Рис. 21. Биологически активные эндогенные фрагменты гемоглобина: I — области белка, из которых образуются эндогенные фрагменты с неизученной активностью; II — пептиды, обладающие гемопоэтической активностью; III — гормонвысвобождающий пептид; IV — опиоидные пептиды и группа кноторфина



Рис. 22. Гипотетическая схема действия различных групп регуляторных пептидов (см. табл. 6). Время действия нейротрансмиттеров — минуты и секунды, нейрогормонов — минуты и часы, протеолитических фрагментов функциональных белков — сутки и недели; 1 — синаптическая щель

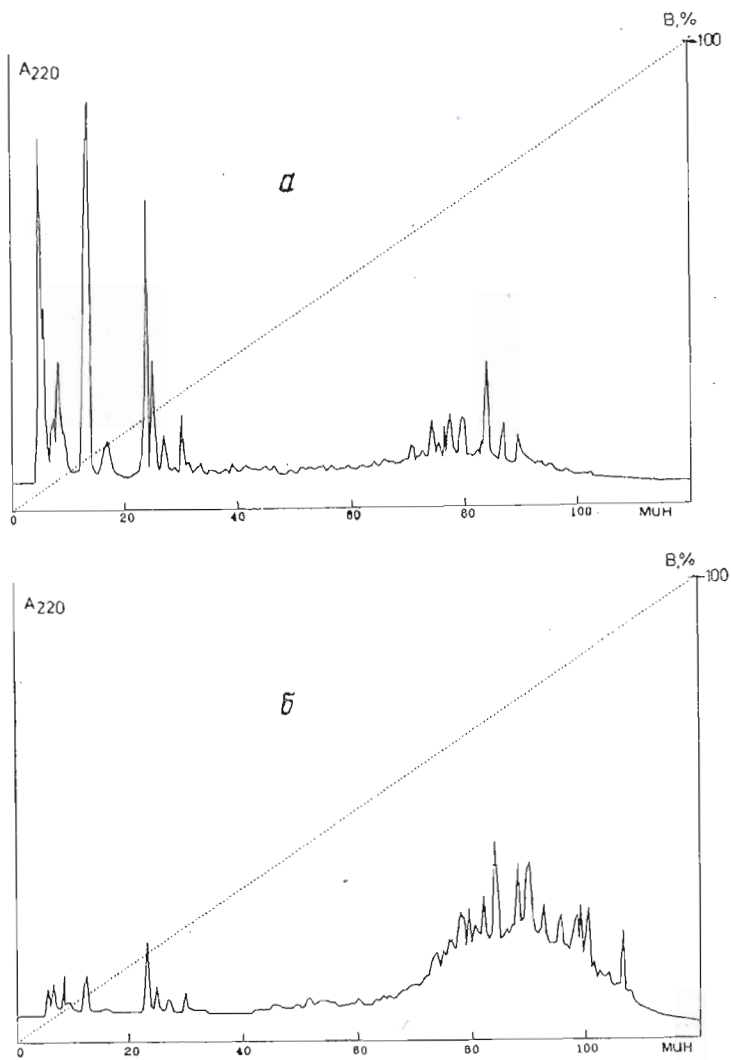


Рис. 23. Обращенно-фазовая хроматография фракции 1—10 кДа (рис. 17) из мозга якутских бодрствующих (а) и гибернирующих (б) сусликов на колонке (4×250 мм) Nucleosil 7C<sub>8</sub> в присутствии 0,04% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила. Б — 60% ацетонитрил, скорость элюции 0,5 мл/мин

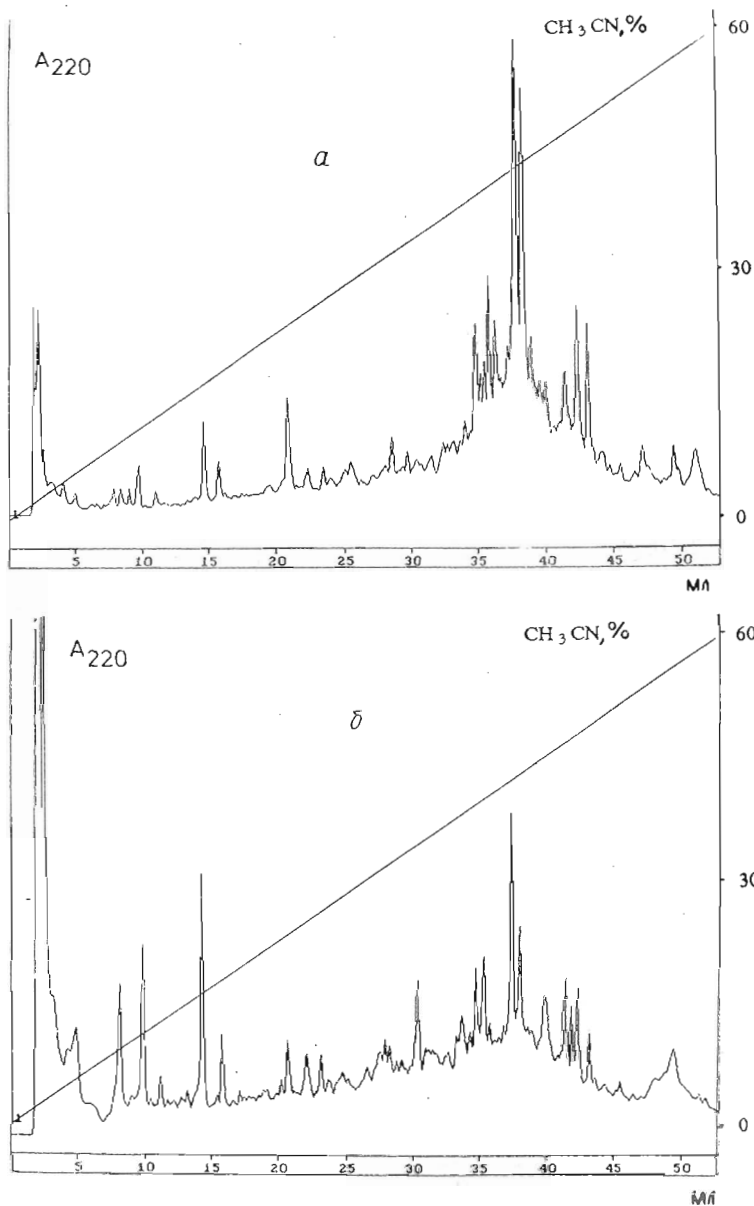


Рис. 24. Обращено-фазовая хроматография фракции 0,5—3 кДа из мозга крысы (соответствует фракции III, рис. 5б, из мозга крупного рогатого скота) на колонке (4,6×250 мм) Nucleosil 7C<sub>8</sub> в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты в градиенте концентрации ацетонитрила. *a* — фракция из мозга контрольных животных; *б* — фракция из мозга животных, лишенных сна в течение 36 ч

## Пептидный фон как отражение физиологического состояния организма

Из изложенного следует, что в различных тканях организма присутствуют значительные количества пептидов, образующиеся из разнообразных белковых предшественников, выполняющих определенную биологическую функцию. По крайней мере существенная часть этих пептидов также обладает собственной биологической активностью. Факты, подтверждающие высказанное утверждение, можно разделить на три группы.

К первой группе относятся данные о выделении и установлении структуры эндогенных биологически активных фрагментов функциональных белков. Наиболее примечательные из них — доказательства образования так называемых тканевых гормонов, общеизвестных ангиотензина II и брадикинина из сывороточных белков-предшественников. Сюда же можно отнести и выделение из гастроинтестинальной ткани ряда нейротензинподобных пептидов [33, 34]. Слабую нейротензинподобную активность можно ожидать и от пептида (35) (табл. 2), выделенного из мозга крупного рогатого скота. Что касается опиоидных пептидов, то два из идентифицированных нами геморфинсодержащих пептидов были ранее обнаружены в гипоталамусе свиньи [6], а еще один подобный по структуре пептид выделен из мозга человека [7]. Представители другой группы опиоидных пептидов, так называемых казоморфинов, образующихся при переваривании казеина молока в желудке [35–38], были обнаружены в моче, плазме и спинномозговой жидкости человека [39–42]. Таким образом, для представителей по крайней мере трех групп классических регуляторных пептидов — кининов, тензинов и опиоидных пептидов — показано происхождение из функциональных белков. Можно также упомянуть описанные выше опиоидоподобные фрагменты гемоглобина — киоторфин [32] и неокиоторфин [28], а также N-концевой амидированный фрагмент неокиоторфина Thr-Ser-Lys-NH<sub>2</sub>, выделенный из гипофиза крупного рогатого скота и проявляющий антигонадотропную активность [43].

Вторую группу литературных данных составляют результаты работ по анализу биологической активности продуктов ферментативной обработки *in vitro* широко распространенных функциональных белков. Можно упомянуть опиоидные пептиды геморфины [11, 12] и цитохрофины [44], выделенные из катепсин-пепсиновых гидролизатов соответственно гемоглобина и цитохрома *b*. Антагонистическую активность по отношению к опиатным рецепторам проявляли пептиды, выделенные в результате пепсинового гидролиза лактоферрина, так называемые лактоферроксины [45]. Обработка пепсином плазмы крови приводит к образованию в значительных концентрациях (до 1–5 мкМ) нейротензинподобного иммунореактивного материала пептидной природы, обладающего характерными для нейротензина биологическими свойствами; аналогичные вещества были идентифицированы при протеолизе *in vitro* препаратов кишечника [46–48]. Результаты этих исследований позволяют оценить потенциальную способность многих функциональных белков к продуцированию в определенных условиях (возможно, связанных с патологическими изменениями в организме [49]) набора биологически активных фрагментов.

И наконец, анализ банков белковых последовательностей показывает, что нейропептидподобные структуры присутствуют и, следовательно, могут выщепляться из многих других белков, в том числе таких компонентов сыворотки крови, как белки системы комплемента [49], альбумин [46] и т.д.

Мы считаем, что протеолитическое расщепление компонентов белкового пула мозга создает пептидный "фон" или "буфер", действующий



щий на широкий круг рецепторов и модулирующий действие обычных, высокоспецифичных нейроактивных веществ.

Табл. 7 и рис. 22 суммируют наши представления о взаимодействии различных групп регуляторных пептидов, присутствующих в мозге. Если пептидные нейротрансмиттеры и нейрогормоны специфически выщепляются из узкого круга конкретных предшественников, наличие собственной биологической активности для которых не показано, то пептиды "фона" могут образовываться из любых белков. Нейротрансмиттеры, как показано, например, для люлиберина [51] или  $[\text{Arg}^1]$ вазопрессина [52, 53], могут направленно секретироваться нейроном-индуктором в синаптическую щель, имеют достаточно высокие константы связывания с рецепторами и короткие времена действия (до нескольких минут [54]). Пептидные гормоны (например, меланостатин или вазоинтестинальный пептид) секретируются клетками в окружающую среду и доставляются к месту действия кровотоком (классическая гормональная регуляция) или действуют непосредственно на близлежащие клетки (парагормональная регуляция), где с очень высокой эффективностью связываются с рецептором; длительность их непосредственного действия обычно не превышает нескольких часов [55–58]. Необходимо отметить, что одни и те же нейроактивные пептиды могут, в зависимости от направленности секреции, выполнять роль как нейротрансмиттера, так и нейрогормона.

Пептиды же фона не имеют столь специфических адресов рождения и действия. Часто они могут иметь сравнительно низкую аффинность к своим мишеням, компенсируемую высокой концентрацией или одновременным присутствием семейства родственных пептидов со сходным действием. Примерами могут служить выделенные нами фрагменты  $\beta$ -гемоглобина крупного рогатого скота (31–40, 31–38, 31–37, 32–40, 32–38), присутствующие в концентрациях до 3 нмоль/г ткани (табл. 3), но, судя по фрагменту  $\beta$ -цепи гемоглобина человека 32–40 [7], уступающие  $[\text{Leu}]$ энкефалину по эффективности связывания с  $\mu$ -опиатным рецептором более чем на 2 порядка ( $K_d = 270$  [7] и 1 нМ [59] соответственно).

Поскольку интенсивность протеолитических процессов в тканях, приводящих к формированию пептидного фона, зависит от такого сравнительно устойчивого параметра, как общее состояние метаболизма, мы предполагаем, что состав фона регулирует долговременные состояния организма — сон, циркадные или сезонные ритмы.

Действительно, первые опыты по сравнению пептидного фона мозга животных выявили весьма существенные различия в группах, различающихся физиологическим состоянием (рис. 23 и 24) при высокой воспроизводимости общей картины у животных, находящихся в одинаковых условиях. Более того, мы считаем, что детальное изучение изменений пептидного состава тканей животных, находящихся в различных состояниях, может дать ценную информацию о биохимических процессах, вовлеченных в соответствующие физиологические изменения. С точки зрения практического применения полученные результаты могут послужить основой для диагностики различных соматических заболеваний и прогнозирования их возникновения и развития.

#### Эндогенные фрагменты основного белка миелина в постнатальной диагностике поражений центральной нервной системы

Иллюстрацией возможности использования количественного анализа эндогенных белковых фрагментов для диагностики может служить



результат, недавно полученный в работе Грудень и Шерстнева [60]. Авторами было высказано предположение, что уровень содержания эндогенного пептида — фрагмента 43—51 основного белка миеллина может коррелировать с изменением скорости метаболизма этого белка, с демиелинизацией нервных волокон и со степенью поражения ЦНС. Для проверки этого положения были получены антитела на синтезированные твердофазным методом пептиды (2) и (3) (табл. 1). На их основе создан стандартный иммуноферментный диагностикум и определен уровень содержания пептидоподобного иммунореактивного материала в ликворе группы новорожденных детей с поражениями ЦНС, диагностированными по данным ультрасонографии. Было установлено, что тяжесть поражения ЦНС действительно хорошо коррелирует с уровнем содержания в спинномозговой жидкости пептида (точнее, пептидоподобного иммунореактивного материала), причем традиционная ультразвуковая диагностика, основывавшаяся на оценке морфологических изменений в ЦНС, в 60% случаев подвергалась коррекции после применения пептидного диагностикума (рис. 25).

### Заключение

Содержание представленной работы иллюстрирует тот факт, что современное состояние методов разделения, структурного анализа и химического синтеза пептидно-белковых веществ позволяет ставить и решать задачи детального описания набора компонентов, присутствующих в тканях и биологических жидкостях живого организма на различных этапах его развития и в разных физиологических состояниях. Работы в этом направлении можно рассматривать как составную часть нового раздела современной физико-химической биологии — так называемой обратной биологии, следующей упомянутому во введении принципу "от

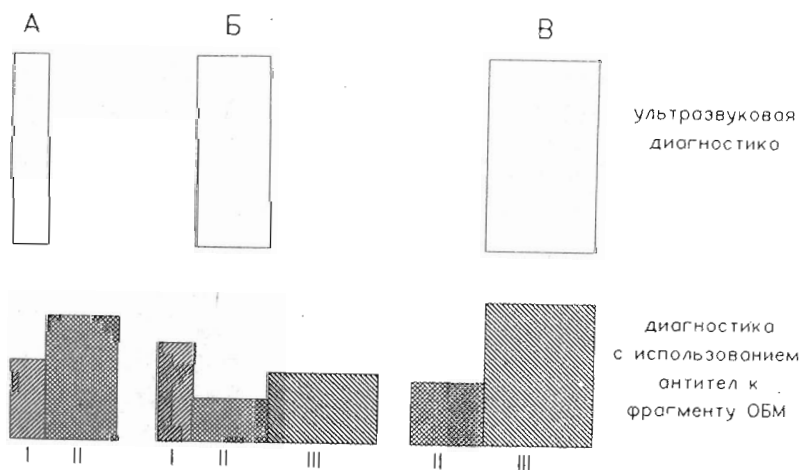


Рис. 25. Диагностика поражений ЦНС с применением ультрасонографии (верхние столбцы) и антител к фрагменту основного белка миеллина (нижние столбцы). Степени поражения, диагностируемые при помощи ультрасонографии (легкая, средняя и тяжелая), обозначены А, Б и В соответственно. I, II и III — содержание иммунореактивного материала в спинномозговой жидкости этих групп больных соответственно <25, 25—85 и >85 нг/мл. Видна низкая корреляция между двумя методами диагностики.

структуры к функции". Этот же принцип положен в основу бурно развивающихся сейчас работ по тотальному секвенированию генов различных организмов, в том числе человека. Расшифровка структур ДНК позволяет сделать вывод об участии в процессах жизнедеятельности многих до сих пор неизвестных белков и об их первичной структуре. Задача последующих этапов — изучение функции открытых белков и продуктов их метаболизма. Прямое отношение к решению последней задачи имеет настоящая работа.

Мы считаем, что систематический анализ пептидного состава различных тканей и органов живых организмов может существенно углубить наши представления о происходящих в них биохимических процессах, а исследования изменений, обусловленных различными физиологическими состояниями организма, дать представление о механизмах работы регуляторных систем. В свою очередь, получаемая при этом информация открывает принципиально новые возможности диагностики соматических заболеваний человека и животных. Наконец, высокая физиологическая активность некоторых выделяемых эндогенных пептидов позволяет приступить к созданию на их основе оригинальных лекарственных препаратов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шерстнев В.В., Рылов А.Л., Долгов О.Н., Судakov К.В., Карелин А.А., Михалева И.И., Цетлин В.И., Иванов В.Т., Мальцев К.В., Беляев С.В. Способ получения агрессивного состояния у крыс: А. с. 4626972/30-14/180227 СССР// Б.И. 1989.
2. Рылов А.Л., Пак Е.С., Карелин А.А., Уляшин В.В., Беляев С.В., Козловская М.М., Шерстнев В.В.// Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. 1990. Т. 40. С. 783—785.
3. Ivanov V.T., Karelin A.A., Dolgov O.N., Klusha V.E., Karelina E.V., Tsetlin V.I., Sudakov K.V., Ulyashin V.V., Sherstnev V.V., Severin S.E., Jr., Mikeladze D.G.// Peptides. Chemistry, Structure and Biology/ Eds Rivier E., Marshall G. Leiden: ESCOM, 1990. P.462—463.
4. Karelina E.V., Karelin A.A., Severin S.E., Jr., Popov V.A., Ulyashin V.V.// 7th International Conference of Young Scientists on Organic and Biological Chemistry. Varna, 1990. P. 94—96.
5. Karelin A.A., Karelina E.V., Ulyashin V.V., Tsetlin V.I., Alyonycheva T.N., Alexandrov A.P., Volkova T.M., Grishin E.V., Ivanov V.T., Nikitin V.P., Dolgov O.N., Pletnikov M.V., Galeva N.N., Sherstnev V.V., Spiglazov V.I., Dimitriadi N.A.// Chemistry and Biology. Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium/ Eds Smith J.A., Rivier J.E. Leiden: ESCOM, 1992. P. 157—158.
6. Chang R.C.C., Huang W.-Y., Redding T.W., Arimura A., Coy D.H., Schally A.V.// Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 685. P. 266—273.
7. Glamsta E.-L., Marklund A., Hellman U., Wernstedt Ch., Terenius L., Nyberg F.// Reg. Pept. 1991. V. 34. P. 169—179.
8. Dumas J.P., Ninio J.// Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 197—206.
9. Baudier J., Deloulme J.C., Dorsselaer A.V., Black D., Matthes H.W.D.// J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 229—237.

10. Severin S.E., Gubin A.N., Karelin A.A., Karelina E.V., Ivanov V.T.// Proc. of the Eighth USSR-FRG Peptide Symposium. Aachen, September 29 — October 3. 1991 (in press).
11. Brantl V., Gramsch Ch., Lottspeich F., Mertz R., Jaeger K.-H., Herz A.// Eur. J. Pharmacol. 1985. V. 125. P. 309-310.
12. Davis T.P., Gillespie T.J., Porreca F.// Peptides. 1989. V. 10. P. 747-751.
13. Долгов О.П. Неопубликованные данные.
14. Спиглазов В.И. Неопубликованные данные.
15. Skarzynski T., Moody P.C.E., Wonacott A.J.// J. Mol. Biol. 1987. V. 193. P. 171-187.
16. Kohama Y., Nakagawa T., Oka H., Okuno Y., Mimura T., Tsujibo H., Inamori Y., Tsurutani R., Nagata K., Tomita K.// Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. № 8. P. 2115-2119.
17. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х.// Докл. АН СССР. 1981. Т. 261. С. 235-239.
18. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х.// Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 96. Вып. 3(6). С. 339-352.
19. Vaskovsky B.V., Kishinevsky R.N., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Khavinson V.Kh., Morozov V.G., Mikhaltsov A.N., Anisimov V.N.// Proc. of the Eighth USSR-FRG Peptide Symposium. Aachen, 1991 (in press).
20. Ivanov V.T., Karelin A.A., Karelina E.V., Ulyashin V.V., Mikhaleva I.I., Vaskovsky B.V., Nazimov I.V., Grishina G.A., Khavinson V.Kh., Morozov V.G., Mikhaltsov A.N.// Peptides 1990. Proc. of the Twenty-First European Peptide Symposium/ Eds Giralt E., Andreu D. Leiden: ESCOM, 1991. P. 813-815.
21. Ivanov V.T., Karelin A.A., Karelina E.V., Ulyashin V.V., Vaskovsky B.V., Mikhaleva I.I., Nazimov I.V., Grishina G.A., Khavinson V.Kh., Morozov V.G., Mikhaltsov A.N.// Peptides. Chemistry and Biology. Proc. of the Twelfth American Peptide Symposium/ Eds Smith J.A., Rivier J.E. Leiden: ESCOM, 1992. P. 939-941.
22. Amorese D., Swan H., Bamburg R.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 6375-6379.
23. Ивануцкий Г.Р., Колаева С.Г., Пастухов Ю.Ф.// Докл. АН СССР. 1982. Т. 267. № 4. С. 978-980.
24. Swan H., Reinhard F.C., Caprio D.L., Schatte C.L.// Criobiology. 1981. V. 18. № 6. P. 598-602.
25. Swan H., Schatte C.L.// Science. 1977. V. 195. P. 84.
26. Kondo N., Kondo V.// J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 1. P. 473-478.
27. Vaskovsky B.V., Ivanov V.T., Mikhaleva I.I., Kolaeva S.G., Kokoz Yu.M., Svieryaev V.I., Ziganshin R.H., Sukhova G.S., Ignatiev D.A.// Peptides. Chemistry, Structure and Biology/ Eds Rivier J.E., Marshall G.R. Leiden: ESCOM, 1990. P. 302-304.
28. Takagi H., Shiomi H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K.// Life Sci. 1982. V. 31. P. 1733-1736.
29. Svieryaev V.I., Vaskovsky B.V., Ziganshin R.H., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Kokoz Yu.M., Povzun A.A., Alekseev A.E., Sukhova G.S.// Peptides 1990. Proc. of the Twenty-First European Peptide Symposium/ Eds Giralt E., Andreu D. Leiden: ESCOM, 1991. P. 813-815.
30. Schally A.V., Huang W.Y., Redding T.W., Arimura A., Coy D.H., Chihara K., Chang R.C.C., Raymond V., Labrie F.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 82. P. 582-588.

31. Фомина Л.А., Гурьянов С.А., Назимов И.В., Яловский О.Г., Захарова Л.А., Михайлова А.А., Петров Р.В.// Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 755—757.
32. Takagi H., Shiomu H., Ueda H., Amano H.// Nature. 1979. V. 5737. P. 410—412.
33. Carraway R., Feurle G.E.// J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 10921—10925.
34. Feurle G.E., Carraway R., Rix E., Knauf W.// J. Clin. Invest. 1985. V. 76. P. 156—162.
35. Brantl V., Teschemacher H.// Trends Pharmacol. Sci. 1983. V. 4. P. 193.
36. Brantl V., Teschemacher H., Henschen A., Lottspeich F.// Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. V. 360. P. 1211—1216.
37. Brantl V.// Eur. J. Pharmacol. 1984. V. 106. P. 213—214.
38. Henschen A., Lottspeich F., Brantl V., Teschemacher H.// Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 1979. B. 360. S. 1217—1224.
39. Koch G., Wiedemann K., Drebes E., Zimmermann W., Link G., Techemacher H.// Regul. Pept. 1988. V. 20. P. 107—117.
40. Nyberg F., Lieberman H., Lindstrom L., Lyrenas S., Koch G., Terenius L.// J. Clin. Endocrin. Metab. 1989. V. 68. P. 283—289.
41. Nyberg F., Lyrenas S., Koch G., Terenius L.// Adv. Biosci. 1989. V. 75. P. 619—622.
42. Erlandsson I., Lindstrom L., Nyberg F.// b-Casomorphins and Related Peptides/ Eds Nyberg F., Brantl V. Uppsala: Fyris-Tryck AB, 1990. P. 151—156.
43. Orts R.J., Liao T.-H., Sartin J.L., Bruot B.// Physiologist. 1978. V. 21. P. 87.
44. Brantl V., Gramsch Ch., Lottspeich F., Henschen A., Jaeger K.-H., Herz A.// Eur. J. Pharmacol. 1985. V. 125. P. 293.
45. Tani F., Iio K., Chiba H., Yoshikawa M.// Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. P. 1803—1810.
46. Carraway R., Mitra S.P., Cochrane D.E.// J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 5968—5973.
47. Mogard M.H., Kobayashi R., Chen C.F., Lee T.D., Reeve J.R., Shyvelly J.E., Walsh J.H.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 136. P. 983—988.
48. Carraway R., Mitra S.P.// Endocrinology. 1987. V. 120. P. 2101—2107.
49. Carraway R., Reinecke M.// Evolution and Tumour Pathology of the Neuroendocrine System/ Eds Falkmer S., Hakanson R., Sundler F. Amsterdam: Elsevier, 1984. P. 245—283.
50. Карелин А.А. Неопубликованные данные.
51. Jan Y.N., Jan L.Y., Kuffler S.W.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 3. P. 1501—1505.
52. Albeck D., Smock T., McMechen P., Purves D., Floyd L.// Brain Res. 1990. V. 1. P. 7—14.
53. Smock T., Albeck D., McMechen P., Purves D.// Brain Res. 1990. V. 511. P. 15—20.
54. Шеперд Г.// Нейробиология. Т. 1./ Ред. Сахаров А.Д. М.: Мир, 1987. С. 203—234.
55. Вальдман А.В., Козловская М.М., Клуша В.Е., Сви́рскис Ш.В.// Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1980. Т. 6. С. 693—696.
56. Malick J.B., Goldstein J.M.// Life Sci. 1978. V. 23. P. 835—844.
57. Zetler G.// Neuropharmacology. 1980. V. 19. P. 415—422.
58. Clark W.G., Lipton J.M., Said S.I.// Neuropharmacology. 1978. V. 17. P. 883—885.
59. Pasternak G.W.// Neurology. 1981. V. 31. P. 1311—1315.
60. Грудень М.А., Шерстнев В.В. Неопубликованные данные.

V.T. IVANOV, A.A. KARELIN, I.I. MIKHALEVA,  
B.V. VASKOVSKY, V.I. SVIRYAEV, I.V. NAZIMOV

ISOLATION, STRUCTURE AND PROPERTIES OF NOVEL ENDOGENOUS  
PEPTIDES

*M.M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian  
Academy of Sciences, Moscow*

Large scale isolation and determination of amino acid sequences of endogenous peptides from various biological sources (bovine brain and red bone marrow, siberian ground squirrel brain) were carried out. A number of earlier unknown peptides were identified, many of them showing distinct activity *in vivo* and/or *in vitro*. Analysis of more than 170 isolated peptide structures resulted in the hypothesis suggesting functional proteins, in particular hemoglobin, to serve also as a source of the peptide "background" which has its own biological significance. Further directions of investigating the endogenous peptide material are mapped. Its potential for developing diagnostics for somatic diseases is demonstrated on patients with CNS disorders.