БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 2 * №12 * 1976

УДК 547.962 : 541.69

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ДЕЙСТВИЮ ТКАНЕВЫХ КИНИНАЗ АНАЛОГОВ БРАДИКИНИНА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ В ПОЛОЖЕНИИ 8*

Попкова Г. А., Астапова М. В., Лисункин Ю. И., Равдель Г. А., Крит Н. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Проведено сравнительное изучение биологической активности и расщепляемости карбоксипептидазой В, карбоксикатепсином и суммарными кининазами крысиной матки аналогов брадикинина: [6-глицин, 8-фенилмолочная кислота]-брадикинина, [8-β-циклогексилаланин]-брадикинина, [6-глицин, 8-β-циклогексилмолочная кислота]-брадикинина и [N-метилфенилаланин]-брадикинина. У изученных аналогов обнаружена заметная дифференциация активности в отношении действия на гладкую мускулатуру, капиллярную стенку и кровяное давление. Показано, что замена пептидной связи 7—8 на сложноэфирную и фенильного радикала в фенилаланине-8 на циклогексильный снижает скорость инактивации брадикинина тканевыми кининазами.

В настоящее время уже осуществлен синтез большого числа аналогов брадикинина и сделаны определенные выводы о зависимости биологического действия от природы, чередования и числа аминокислотных остатков в полипептидной цепи [2]. Тем не менее работы по направленному синтезу аналогов брадикинина продолжаются. В частности, для целого ряда исследований, включая изучение взаимодействия брадикинина со специфическими рецепторными компонентами гладкомышечной клетки, большой интерес представляют аналоги брадикинина, обладающие достаточно высокой биологической активностью, но устойчивые к действию инактивирующих ферментов. Работами ряда авторов [3—9] установлено, что основными ферментами крови и некоторых других тканей, инактивирующими брадикинин, являются карбоксипептидаза N, близкая к ней по субстратной специфичности карбоксипептидаза В (КФ 3.4.12.3), получившие название кининазы I, и пептидилдипептидгидролаза (КФ 3.4.15.1), или кининаза II. Эти ферменты отщепляют С-концевые аргинин и фениларгинин, поэтому нам представлялось интересным провести изучение тех аналогов брадикинина, в которых произведена модификация молекулы в непосредственной близости к атакуемым группам.

В настоящем сообщении изложены результаты сравнительного изучения биологической активности и устойчивости к действию тканевых кининаз, таких, как карбоксипептидаза В, карбоксикатепсин и суммарные

*) Принятые сокращения — см. предыдущую статью этого номера журнала [1]; кроме того, Cha — β-циклогексил-*L*-аланин, Brd — брадикинин.

Таблица 1

Биологическая активность брадикинина и его аналогов *

Соединения	Сокращение рога матки крыс		Сокращение отрезка подвздошной кишки морской свинки		Повышение проницаемости капилляров кожи кролика		Снижение артериального давления	
	пороговая доза, г/мл·10^{-10}	%	пороговая доза, г/мл·10^{-9}	%	пороговая доза, г/мл·10^{-9}	%	$ЭД_{10}$, мг/кг веса животного·10^{-4}	%
(I) Brd	1	100	1	100	1	100	6,5	100
(II) [Gly^6, Phl^8]-Brd	1	100	4	25	50	2	0,055	10 000
(III) [Cha^8]-Brd	10	10	10	10	50	2	9,3	80
(VI) [Gly^6, Chl^8]-Brd	20	5	10	10	100	1	3,9	170
(V) [$MePhe^8$]-Brd	10	10	10	10			9,8	45

* В таблице приведены средние данные из 5—10 определений. Активность брадикинина принимается за 100%. За пороговую дозу принимается минимальная концентрация вещества, вызывающая одиночное сокращение гладкомышечных органов или образование голубого окрашивания кожи в зоне диаметром 7 мм. В 2 раза меньшие концентрации физиологического ответа не вызывают. $ЭД_{10}$ — доза пептида, вызывающая падение артериального давления у животных на 10% от исходного.

кининазы крысиной матки следующих аналогов брадикинина (I): [6-глицин, 8-фенилмолочная кислота]-брадикинина (II), [8-циклогексилаланин]-брадикинин (III), [6-глицин, 8-циклогексилмолочная кислота]-брадикинин (IV) и [8-N-метилфенилаланин]-брадикинин (V).

В статье приводятся также некоторые данные, характеризующие кининазную систему матки крыс.

Из приведенных в табл. 1 результатов изучения биологической активности видно, что замена амидной связи на сложноэфирную в положении 7—8 не изменяет контрактильной активности брадикинина в опытах на изолированном роге матки крыс и незначительно снижает способность пептида вызывать сокращение изолированного отрезка подвздошной кишки морской свинки. Можно только отметить, что [Gly^6, Phl^8]-брадикинин (II) вызывает более длительное и высокое по амплитуде сокращение изолированного рога матки крыс, чем равные дозы брадикинина. Максимальный ответ получен для брадикинина на дозу $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл, а для его депсипептидного аналога — на дозу $2 \cdot 10^{-7}$ г/мл.

Замена ароматического радикала циклогексильным на порядок снижает контрактильную активность брадикинина по обоим тестам. Замена пептидной связи 7—8 в [Cha^8]-брадикинине (IV) на сложноэфирную, как и аналогичная замена в самом брадикинине (аналог (II)), не влияет на контрактильную активность пептида по значению пороговой дозы.

Введение метильной группы в амидный азот остатка фенилаланина-8 (аналог (V)) на порядок уменьшает способность пептида вызывать сокращение гладкомышечных органов.

Депсипептидный (II) и циклогексильный (III) аналоги брадикинина на 1,5 порядка менее активны, чем брадикинин, по способности увеличивать проницаемость капилляров кожи кролика. Одновременная замена амидной связи 7—8 на сложноэфирную и ароматического радикала на циклогексильный (аналог (IV)) приводит к дальнейшему уменьшению активности пептида по этому тесту.

В отличие от влияния на контрактильную активность замена фенильного радикала фенилаланина-8 на циклогексильный значительно меньше отражается на гипотензивной активности брадикинина. Так, циклогексильный аналог (III) лишь на 20% уступает брадикинину по способности снижать артериальное давление у децеребрированных кошек (табл. 1). Более существенно изменяет гипотензивную активность брадикинина замена

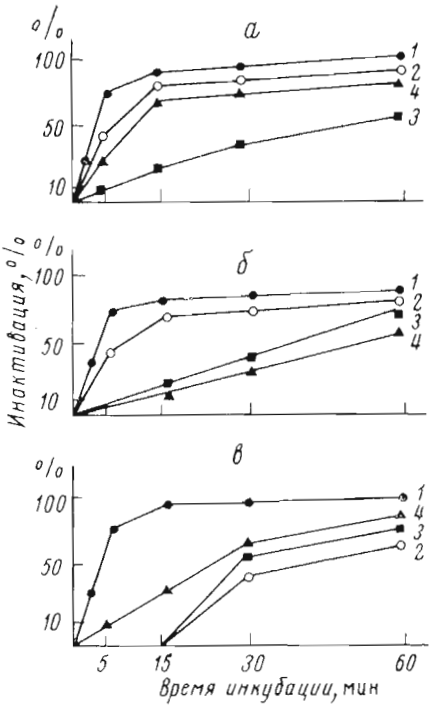

Рис. 1. Инактивация брадикинина и его аналогов карбоксипептидазой В (*а*), карбоксикатепсином (*б*), суммарным кининазным препаратом (*в*): *1* — Brd, *2* — [Gly^5, Phl^8]-Brd (II), *3* — [Cha^8]-Brd (III), *4* — [Gly^6, Chl]-Brd (IV)

пептидной связи 7—8 на сложноэфирную. Депсипептидный аналог (II) на 2 порядка активнее брадикинина по этому тесту. Более выраженное и продолжительное действие его на кровяное давление у крыс и кроликов отмечалось и раньше [5], однако на децеребрированных кошках этот эффект выражен значительно сильнее.

Замена ароматического ядра фенилмолочной кислоты-8 в депсипептидном аналоге (II) брадикинина на циклогексильное заметно снижает его гипотензивную активность. [Gly^6, Chl^8]-брадикинин (IV) лишь на 70% активнее брадикинина в отношении действия на кровяное давление у кошек.

Введение метильной группы в амидный азот фенилаланина-8 несколько снижает активность брадикинина по этому тесту.

Таким образом, изученные аналоги брадикинина обнаруживают некоторую дифференциацию активности в отношении действия на гладкую мускулатуру, капиллярную стенку и кровяное давление. Сложноэфирная связь в положении 7—8 не изменяет контрактильной активности брадикинина, но снижает его способность повышать проницаемость капиллярной стенки и резко увеличивает гипотензивную активность. Замена фенильного радикала фенилаланина-8 на циклогексильный приводит к уменьшению биологической активности брадикинина по всем изученным тестам, хотя и в различной степени: более существенно это изменение отражается на контрактильной активности брадикинина.

В табл. 2 и на рис. 1 приведены результаты изучения инактивации брадикинина и его аналогов тканевыми пептидазами.

Как видно из сравнения начальных скоростей гидролиза, на активность карбоксипептидазы В, расщепляющей связь 8—9 в молекуле пептида, заметное влияние оказывает тип связи, соседней с гидролизуемой. Так, ско-

Таблица 2

Скорость гидролиза брадикинина и его аналогов тканевыми кининазами (нмоль инактивированного субстрата/мг белка/мин) *

Соединение	Карбоксипептидаза В	Карбоксикатепсин	Кининазы матки крыс
(I) Brd	956	340	7,5
(II) [Gly^6, Phl^8]-Brd	585	220	1,0
(III) [Cha^8]-Brd	58	110	1,4
(IV) [Gly^6, Chl^8]-Brd	400	75	1,3
(V) [MePhe^8]-Brd			7,6

* В таблице приведены средние результаты 3—5 измерений.

рость инактивации [Gly^6, Phl^8]-брадикинина (II) в 1,5 раза ниже скорости инактивации брадикинина.

Значительно больше повышают устойчивость к действию этого фермента изменения, произведенные в строении бокового радикала остатка фенилаланина-8. Скорость гидролиза [Cha^8]-брадикинина (III) в 15 раз ниже скорости гидролиза самого гормона.

Аналог (III) в 10 раз устойчивее к действию карбоксипептидазы B, чем [Gly^6, Chl^8]-брадикинин (IV). Возможно, это объясняется тем, что нарушения в комплементарности молекулы пептида к активному центру фермента, вызванные заменой ароматического ядра остатка фенилаланина на циклогексильное, как-то компенсируются одновременной заменой пептидной связи 7—8 на сложноэфирную.

Карбоксикатепсин, как было установлено раньше [7], вызывает быструю деструкцию брадикинина с освобождением С-концевых дипептидов Phe-Arg, Ser-Pro. В наших опытах 10 мкг карбоксикатепсина практически полностью инактивируют 50 мкг брадикинина в течение 15-минутной инкубации с ферментом (рис. 1, *б*).

Результаты определения скорости инактивации карбоксикатепсином [Gly^6, Phl^8]-брадикинина (II) говорят о том, что фермент наряду с пептидазной обладает заметной эстеразной активностью. Для активности карбоксикатепсина, как и для активности карбоксипептидазы B, большое значение имеет строение боковой цепи фенилаланина-8. Инактивация циклогексильных аналогов (III) и (IV) происходит со скоростью, в 3 раза меньшей скорости инактивации соответственно брадикинина и его депсипептидного аналога (II).

Кининазы крысиной матки расщепляют аналоги (II), (III) и (IV) с приблизительно одинаковой скоростью: в 5—8 раз более низкой, чем скорость инактивации брадикинина. Сложноэфирная связь в положении 7—8 (аналог (II)) и наличие циклогексильной группы в боковой цепи Phe остатка в положении 8 (аналог (III)) значительно повышают устойчивость пептида к действию кининаз крысиной матки (рис. 1, *в*). Депсипептидный (II) и циклогексильный (III) аналоги брадикинина практически не расщепляются в течение первых 15 мин инкубации.

Брадикининазная активность гомогената крысиной матки ниже, чем многих других гладкомышечных тканей [10, 11]. Относительно низкой кининазной активностью объясняют, в частности, высокую чувствительность крысиной матки к брадикинину в опытах in vitro. Это обстоятельство наряду с доказательствами прямого действия брадикинина на гладкомышечную клетку этого органа [12] делает его наиболее удобным объектом для изучения многих сторон механизма действия брадикинина. Однако, как было показано раньше и подтверждено результатами настоящей работы, инактивация брадикинина ферментами крысиной матки протекает достаточно быстро, но пока не установлено, какие именно пептидазы этой ткани участвуют в расщеплении брадикинина. Показано только присутствие в ней кининазы II как прямым измерением активности этого фермента с гиппурил-*L*-гистидил-*L*-лейцином в качестве субстрата [13], так и путем сравнения действия разных ингибиторов на инактивацию брадикинина мембранной фракцией клеток миометрия крыс [14].

В настоящей работе мы сделали попытку охарактеризовать кининазную систему крысиной матки на основании сравнения скоростей инактивации брадикинина и его аналогов и анализа продуктов ферментативного гидролиза пептидов.

В наших опытах 50 мкг брадикинина практически полностью инактивируются в течение 15-минутной инкубации с 1 мг кининазного препарата (рис. 1, *в*).

При разделении продуктов гидролиза брадикинина в тонком слое силикагеля обнаруживаются три фрагмента (рис. 2, *2*), два из которых, совпадающие по хроматографической подвижности соответственно с ар-

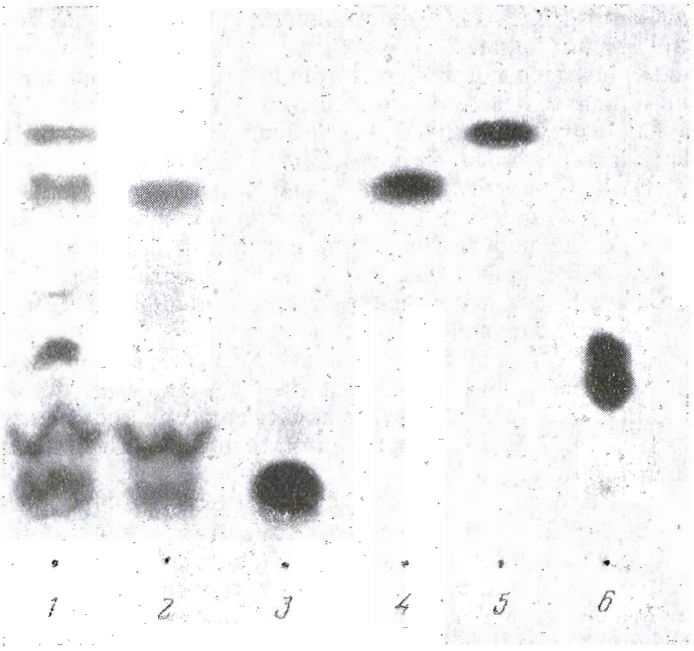

Рис. 2. Тонкослойная хроматограмма продуктов 15-минутного гидролиза Brd (*2*) и [Cha^8]-Brd (*1*); стандарты: Arg (*3*), Phe (*4*), Cha (*5*), [Cha^8]-Brd + Brd (*6*)

гинином и фенилаланином, были препаративно выделены и идентифицированы с помощью аминокислотного анализатора. Освобождение свободных фенилаланина и аргинина при гидролизе брадикинина суммарными кининазами крысиной матки свидетельствует, как нам кажется, о том, что наряду с кининазой II в инактивации брадикинина в этой ткани участвует фермент типа кининазы I.

Однако расщепление молекулы пептида ферментами крысиной матки не ограничивается С-концевым дипептидом, а затрагивает и другие связи. Как видно из представленной на рис. 2, *1* хроматограммы, при разделении продуктов гидролиза суммарными кининазами крысиной матки аналога (III) наряду с циклогексилаланином обнаруживается вещество, совпадающее по подвижности с фенилаланином, который в этом аналоге находится в положении 5.

Аминокислотный анализ мономерных продуктов 15-минутного гидролиза брадикинина суммарным кининазным препаратом показывает, что из гормона (1 моль) кроме фенилаланина (2 моль) и аргинина (1 моль) освобождаются также серин (1 моль) и пролин (1 моль).

Результаты этой работы не позволяют прямо ответить на вопрос, освобождаются ли эти аминокислоты при деградации остатка пептида после отщепления Phe — Arg, или это происходит при посредстве ферментов, принимающих участие в инактивации брадикинина наряду с кининазами I и II.

В пользу последнего предположения свидетельствуют, как нам кажется, следующие данные.

При сравнении скоростей инактивации брадикинина и его аналогов карбоксипептидазой В, карбоксикатепсином и суммарными кининазами крысиной матки обращает на себя внимание то обстоятельство, что наиболее устойчивым к действию кининаз крысиной матки является депсипептидный аналог (II). Устойчивость этого аналога к действию суммарных тканевых кининаз коррелирует с более длительным и интенсивным действием его по сравнению с брадикинином и другими аналогами на сокраще-

ние изолированного рога крысиной матки и существенным увеличением гипотензивной активности. Интенсивность и продолжительность действия брадикинина и его аналогов может в большой степени зависеть от скорости инактивации их тканевыми кининазами. Поэтому тот факт, что аналог (II) приобретает значительную устойчивость к действию суммарных кининаз крысиной матки и в то же время относительно быстро разрушается и карбоксипептидазой В и карбоксикатепсином, позволяет нам высказать предположение, что в инактивации брадикинина в крысиной матке и, возможно, кровеносном русле наряду с известными кининазами участвуют и какие-то другие ферменты, на активность которых существенным образом влияют произведенные в этом аналоге замены.

Экспериментальная часть

Брадикинин и его аналоги были синтезированы ранее [1, 15].

Карбоксикатепсин, в 1500 раз очищенный фермент из почек быка, получен в лаборатории биохимии и химической патологии белков Института медицинской химии АМН СССР.

Карбоксипептидаза В (из поджелудочной железы свиньи) — препарат фирмы Worthington Biochem. Corp., свободный от примесей химотрипсина, уд. акт. 100 МЕ/мг.

Кининазный препарат миометрия крыс был получен следующим путем: измельченную ткань гомогенизировали в 50 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5), гомогенат осаждали при 16 000 *g*, полученный супернатант диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч и лиофильно высушивали [10].

Определение биологической активности брадикинина и его аналогов основано на их способности вызывать сокращение изолированных гладкомышечных органов, повышать проницаемость капилляров кожи и снижать кровяное давление.

Изучение действия кининов на изолированный рог матки крыс проводили в растворе Желона при температуре 30°. В опыт брали крыс весом 120—150 г в период эструса.

Отрезок подвздошной кишки морской свинки помещали в аэрируемый раствор Тироде при 34°.

Изменение проницаемости капилляров кожи кролика определяли с 1% раствором трипанового синего [16].

Определение артериального давления производили в опытах на децеребрированных кошках, сравнение гипотензивной активности осуществляли с помощью ранее предложенного метода [17].

Скорость инактивации брадикинина и его аналогов тканевыми кининазами определяли биологическим методом, основанным на измерении остаточной активности пептидов в разные сроки после инкубации с ферментом [18]. Содержание кининов в инкубационной среде устанавливали по сокращению изолированного рога матки крыс. При этом для каждого определения находили кривую зависимости величины амплитуды сокращения от концентрации пептида в инкубационной бане. Ошибка измерения 5—8%.

Ферментативный гидролиз пептидов проводили в 0,5 мл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,5), содержащего 2 мМ щавелевую кислоту, 50 мкг пептида, 1 мг кининазного препарата крысиной матки (либо 7 мкг ферментного белка карбоксипептидазы В или 10 мкг карбоксикатепсина). Выбранные количества ферментных препаратов с одинаковой скоростью инактивируют 50 мкг брадикинина в течение первых 5 мин инкубации при 37°. Для определения остаточной активности через 1, 5, 15, 30 и 60 мин после начала инкубации брали пробы с таким расчетом, чтобы содержание пептида в них в начале ферментативной реакции создавало в инкубационной бане с изолированным рогом матки концентрацию $6 \cdot 10^{-8}$ М.

Анализ продуктов ферментативного гидролиза. Хроматографическое разделение продуктов ферментативного гидролиза проводили в тонком слое силикагеля с использованием пластинок Kieselgel-60 (Merck, ФРГ) в системе *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (63 : 10 : 27).

Аминокислоты, освободившиеся при ферментативном гидролизе, анализировали на аминокислотном анализаторе (Durrum, США), модель D-500.

Авторы статьи выражают благодарность сотруднику лаборатории биохимии и химической патологии белков Института медицинской химии АМН СССР Ю. Е. Елисеевой за любезное предоставление препарата карбоксикатепсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крит Н. А., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1976) Биоорган. химия, 2, 1455—1463.
2. Шредер К., Любке У. (1969) в кн. Пептиды, т. 2, с. 112—172, «Мир», М.
3. Erdös E. G., Renfrew A. G., Sloane E. M., Wohler J. R. (1963) Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 222—235.
4. Erdös E. G., Wohler I. M., Levin M., Westerman M. P. (1965) Clin. chim. acta, **11**, 39—47.
5. Ravdel G. A., Filatova M. P., Shchukina L. A., Paskhina T. S., Surovikina M. S., Trapeznikova S. S., Egorova T. P. (1967) J. Med. Chem., **10**, 242-246.
6. Alabaster V. A., Pharm B., Ph. D., Bakhde J. S., Phil M. A. (1972) Circulat. Res., **31**, Suppl. 2, 72—79.
7. Elisseeva J. E., Orekhovich V. N., Pavlikhina L. V., Alexeenko L. P. (1974) Clin. chim. acta, **31**, 413—419.
8. Oshima G., Gecse A., Erdös E. G. (1974) Biochim. et biophys. acta, **350**, 26—37.
9. Dorer F. E., Ryan J. W., Steward J. M. (1975) Biochem. J., **141**, 915—917.
10. Green L. J., Camargo C. M., Krienger E. M., Stewart J. M., Ferreira S. (1972) Circulat. Res., **30—31**, Suppl. 2, 62—71.
11. Reissmann S., Paegelow I., Arold H. (1974) Acta biol. et med. Germ., **33**, 77—88.
12. Khairallah P. A., Page I. H. (1963) Ann. N. Y. Acad. Sci., **104**, 212—221.
13. Cushman D. W., Cheng H. S. (1971) Biochim. et biophys. acta, **250**, 261—265.
14. Jankova T., Paegelow I., Reissmann S., Arold H. (1975) Acta biol. et med. Germ., **34**, 9—13.
15. Филатова М. П., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1975) Биоорган. химия, 1, 437—445.
16. Menkin V. (1928) J. Exp. Med., **50**, 171—188.
17. Schild H. O. (1942) J. Physiol. (Engl.), **101**, 115—127.
18. Erdös E. G., Yand H. Y. T. (1970) in Handbok of Experimental. Pharmacol., pp. 283—323, Springer-Verlag, Berlin.

Поступила в редакцию
6.V.1976

A COMPARATIVE STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY AND RESISTANCE TO TUSSUE KININASES OF BRADYKININ ANALOGS MODIFIED IN POSITION «8»

POPKOVA G. A., ASTAPOVA M. B., LISUNKIN Yu. I.,
RAVDEL G. A., KRIT N. A.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Biological activity and enzymatic hydrolyses catalyzed by carboxypeptidase B, carboxycathepsin, or total kininases of the rat uterus have been assayed for bradykinin and its analogs: [6-glycine, 8-phenyllactic acid]-, [8-β-cyclohexylalanine]-, [6-glycine, 8-β-cyclohexyllactic acid]- and [8-N-methylphenylalanine]-bradykinins. The analogs showed appreciable differentiation in their effects on smooth muscle, capillary wall, and blood pressure. The change of peptide bond 7-8 for ester one, as well as the introduction of cyclohexyl group instead of Phe ^{8} phenyl side chain were found to result in the reduced rate of bradykinin inactivation by tissue kininases.