

Л. А. Метелица, Л. Л. Чарочкина, С. А. Пояркова, А. И. Луик,
С. Е. Мозилевич, В. К. Кибирев

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ СТЕРЕОИЗОМЕРНЫХ АРГИНИН-СОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев

Хорошо известно, что центральное место в регуляции и координации многих биохимических реакций и жизненно важных процессов в организме занимают вещества пептидной природы [1 – 5]. Систематически осуществляя субстратный и ингибиторный анализ тромбина и других сериновых протеаз при помощи синтетических пептидов [6 – 9], мы накопили значительное число различающихся по структуре соединений, которые обладают также различной биологической активностью [8]. Поскольку любые модификации биологически активных пептидов могут привести к появлению не только новых полезных свойств, но и весьма неожиданных побочных эффектов, крайне необходимо проводить исследование широкого спектра проявлений физиологических характеристик синтезированных пептидов.

Целью настоящей работы является изучение биологической активности некоторых пептидов, синтезированных нами ранее [6 – 9].

Материалы и методы исследования

Синтез и физико-химические характеристики исследуемых пептидов представлены в работах [8, 9].

Для оценки воздействия пептидов на миграционные свойства полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови крыс использовали тест-систему по Boyden [10]. Нестимулированную подвижность (хемотаксис) оценивали по количеству клеток, проникших в поры ацетат-целлюлозного фильтра (с диаметром пор 3 – 5 мкм). При этом в нижнюю камеру тест-системы вносили гомологичную сыворотку. При изучении стимулированной подвижности (хемотаксис) добавлялся стандартный хемоаттрактант — трипептид формил-метионил-лейцил-фенилаланин в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М/л. В верхнюю камеру тест-системы в обоих случаях вносили взвесь клеток, предварительно инкубированных с исследуемыми соединениями в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М/л в течение 30 мин.

Миотропные свойства изучали на изолированных электростимулируемых фрагментах мочеточника морской свинки [11]. Использовали методику регистрации сократительной активности, предполагающую непрерывную подачу отмывающего раствора Кребса в малую камеру (объем 0,1 мл). Исследования вели в изометрическом режиме сокращений с использованием механотрона 6 МХ 1 С. Регистрацию сократительных ответов проводили в течение 10 мин на самописце ТЛ 4620 (ЧССР). Электрические импульсы имели амплитуду 1,5 В, их длительность составляла 1 с. Концентрация исследуемых соединений составляла $1 \cdot 10^{-4}$ М/л.

Влияние на скорость индуцированной тромбином агрегации тромбоцитов периферической крови крыс оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток [12]. Инкубацию вели при температуре 37° С и перемешивании со скоростью 1100 мин⁻¹. Концентрация клеток в суспензии находилась в пределах $(1,2 - 1,5) \cdot 10^5$ кл/мл, что соответствовало оптической плотности 0,45 – 0,60 при длине волны 590 нм. Проведенная калибровка показала, что при избранной концентрации клеток оптическая плотность суспензии тромбоцитов линейно снижается по мере уменьшения концентрации клеток. Концентрация исследуемых соединений составляла $1 \cdot 10^{-4}$ М/л.

Влияние на функциональную активность Т-лимфоцитов селезенки белых мышей оценивали в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана [13], которые использовали в виде 1 % суспензии в среде Игла. Предварительную инкубацию суспензии проводили в течение 40 мин. Конечная концентрация всех исследуемых соединений составляла $1 \cdot 10^{-5}$ М/л.

С каждым соединением (по каждому тесту) было поставлено 3 – 4 опыта.

Полученные результаты обработаны статистически [14].

Результаты и их обсуждение

Установлено, что исследованные вещества в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М/л не влияют на электростимулированные сокращения изолированных мочеточников морской свинки. Результаты изучения воздействия пептидов на хемотаксис и хемотаксис лейкоцитов, розеткообразование лимфоцитов и агрегацию тромбоцитов приведены в таблице.

Установлено, что все соединения в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М/л весьма слабо влияют на подвижность лейкоцитов, стимулированную стандартным хемоаттрактантом — формил-метионил-лейцил-фенилаланином. В то же время пептид II стимулирует, а пептиды VII и VIII угнетают хемотаксис.

Анализ воздействия пептидов на реакцию розеткообразования лимфоцитов свидетельствует о том, что все испытанные вещества, за исключением соединения IV, являются иммуностимуляторами, причем наиболее выраженной активностью обладают тетрапептиды VI, VII и VIII. Специальные эксперименты показали, что с увеличением концентрации пептидов от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М/л их влияние на реакцию розеткообразования падает. Любопытно, что подобная закономерность наблюдается также для иммуностимулятора тетрапептида тафцина [1]. Дипептид IV, первич-

Влияние изученных пептидов на некоторые показатели функциональной активности клеток крови

№	Соединение Структура	Хемокинез	Хемотаксис	Розеткообразование	Агрегация
		лейкоцитов, количество клеток, проникших в поры фильтра в 10 полях зрения микроскопа	лейкоцитов, количество клеток, проникших в поры фильтра в 10 полях зрения микроскопа	лимфоцитов, количество розеток на 2000 клеток	тромбоцитов (изменение оптической плотности за 1 мин) × 1000
	Контроль	11,3 ± 0,5	26,0 ± 1,5	4,3 ± 0,1	10,1 ± 0,2
I	NH ₂ -L-Arg-L-Tyr-OMe	12,3 ± 0,8	24,3 ± 1,6	5,0 ± 0,4	...
II	NH ₂ -D-Arg-D-Tyr-OMe	13,4 ± 0,4*	22,5 ± 1,0	4,9 ± 0,3	...
III	NH ₂ -L-Arg-D-Tyr-OH	10,8 ± 0,8	23,8 ± 2,0	5,0 ± 0,2*	...
IV	NH ₂ -D-Tyr-D-Arg-OMe	10,8 ± 0,5	24,3 ± 1,5	3,5 ± 0,2*	...
V	NH ₂ -L-Tyr-D-Arg-OMe	11,3 ± 1,2	24,9 ± 1,8	5,0 ± 0,3	4,3 ± 0,3*
VI	Tos-(pF)Phe-Arg-Pro-Arg-OMe	10,7 ± 0,7	25,0 ± 1,4	6,1 ± 0,5*	1,0 ± 0,1*
VII	Tos-(mF)Phe-Arg-Pro-Arg-OMe	8,0 ± 0,4*	25,4 ± 1,2	9,5 ± 0,4*	0*
VIII	NH ₂ -L-Pro-L-Arg-OH	8,0 ± 0,7*	23,7 ± 1,8	6,1 ± 0,4*	6,1 ± 0,4*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

ная структура которого соответствует ретро-*D*-последовательности соединения I, вместо иммуностимулирующего эффекта обнаруживает примерно такую же иммунодепрессорную активность.

Поскольку исследованные соединения угнетают активность тромбина [6, 8] — ключевого фермента системы свертывания крови, мы решили изучить их действие также на стимулированную тромбином агрегацию тромбоцитов. Установлено, что пептиды V – VIII существенно подавляют агрегацию тромбоцитов. Тетрапептиды VI и VII при концентрации, численно равной IC₅₀ их антитромбиновой активности (т.е. при $1 \cdot 10^{-4}$ М/л), практически полностью подавляют агрегацию тромбоцитов. Дипептид VIII, не обладающий антитромбиновой активностью (IC₅₀ > $1 \cdot 10^{-2}$ М/л), снижает скорость агрегации тромбоцитов почти в два раза при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М/л. Таким образом, пептиды V – VIII, являясь ингибиторами тромбина, угнетают также и агрегацию тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. И. Чипенс, Л. К. Полевая, Н. И. Веретенникова, А. Ю. Крикис, *Структура и функции низкомолекулярных пептидов*, Зинатне, Рига (1980).

2. S. Udenfriend, and J. Meienhofer (eds.), *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 6, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London ets. (1984).

3. Г. И. Чипенс (ред.), *Химия и биология иммунорегуляторов*, Зинатне, Рига (1985).

4. S. Udenfriend, J. Meienhofer, and C. W. Smith. (eds.), *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 8, Academic Press, Orlando, San Diego, New York (1987).

5. Г. И. Чипенс, Н. И. Веретенникова, Р. Э. Вегнер, и др., *Структурные основы действия пептидных и белковых иммуномодуляторов*, Зинатне, Рига (1990).

6. С. А. Пояркова, В. К. Кибирев, Д. М. Федорьяк, С. Б. Серебряный, *Биоорганическая химия*, **5**(4), 508 – 515 (1979).

7. V. K. Kibirev, A. A. Hershkovich, S. A. Poyarkova, et al., in: *Chemistry of Peptides and Proteins*, W. Voelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, and V. T. Ivanov (eds), Vol. 3, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York (1986), pp. 339 – 349.

8. С. А. Пояркова, В. А. Безменова, Т. П. Угарова и др., *Укр. биохим. ж.*, **71**(2), 14 – 19 (1999).

9. С. А. Пояркова, В. П. Кухарь, *Укр. хим. ж.*, **60**(2), 182 – 184 (1994).

10. S. Boyden, *J. Exp. Med.*, **115**, 453 – 466 (1962).

11. A. E. Brading, P. Sneddon, *Br. J. Pharmacol.*, **70**, 229 – 240 (1980).

12. J.-P. Cazenave, S. Hemmendinger, A. Beretz, *Ann. Biol. Clin.*, **41**, 167 – 179 (1983).

13. R. Laskov, *Nature*, **219**(5157), 973 – 975 (1968).

14. Д. Сепетлиев, *Статистические методы в научных медицинских исследованиях*, Медицина, Москва (1968).

Поступила 11.06.02