

К. В. Шевченко, А. В. Труфанова, И. Ю. Нагаев

УСТОЙЧИВОСТЬ В ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ЛОШАДИ PGP, DNA-PGP И GPGPGR — ПЕПТИДОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОЯЗВЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия,
E-mail: ATRegister@mail.ru

Показано, что пептиды PGP и GPGPGR стабильны при инкубировании в желудочном соке лошади, а также под действием соляной кислоты или пепсина, что позволяет им, практически не подвергаясь воздействию агрессивной среды, успешно реализовывать свой лекарственный потенциал — защиту слизистой желудка от разнообразных язвобразующих воздействий, включающих практически все известные модели язвобразования. При исследовании взаимодействия N-ацилированного докозагексаеновой кислотой PGP (DNA-PGP) с желудочным соком лошади оказалось, что уже через 5 мин примерно 90 % данного соединения расщепляется на PGP и DNA. Этот факт объясняет, почему при экспериментах *in vivo*, как следует из литературных данных, противовоспалительные эффекты DNA-PGP и PGP, в случае стрессорной модели, практически совпадают. В то же время при использовании этаноловой модели, когда деацилирование DNA-PGP замедляется за счет адсорбции DNA-PGP на клеточной стенке желудка, DNA-PGP оказывается на 20 % эффективнее PGP.

Ключевые слова: желудочный сок, пепсин, глипролины, противовоспалительный эффект.

Около 10 % взрослого населения России страдает заболеваниями органов пищеварения, в том числе и язвенной болезнью. Среди заболеваний внутренних органов язвенная болезнь является наиболее распространенной, и страдают ей люди в основном от 40 до 60 лет, то есть наиболее активные в социально-экономическом плане [1]. В настоящее время существует большое количество противовоспалительных препаратов, которые делятся на 3 группы: антисекреторные, антацидные и обволакивающие [2]. Для лечения язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pylori*, применяют комплексную терапию, обычно состоящую из препаратов висмута и антибиотиков [3]. Однако полного излечения достигают только от 60 до 90 % больных; кроме того, велик процент повторного появления язв.

В настоящее время в качестве противовоспалительных препаратов предложено семейство глипролинсодержащих пептидов [4]. Наиболее изученными в этом отношении являются ProGly, GlyPro, GlyProGlyProGlyPro (GPGPGR) и ProGlyPro (PGP), из которых 2 последних обладают наибольшим противовоспалительным эффектом. Также в литературе имеются данные по противовоспалительному действию N-ацилированного докозагексаеновой кислотой PGP (DNA-PGP) [5].

Целью данной работы является изучение устойчивости N-ацилированного докозагексаеновой кислотой PGP (DNA-PGP), GPGPGR и PGP в желудочном соке лошади, а также их устойчивости под действием присутствующих в желудочном соке соляной кислоты и пепсина.

Экспериментальная часть

Реагенты, катализаторы, растворители — коммерческие препараты. Желудочный сок фирмы “Эквин” (НПО “Микроген”), пепсин фирмы “Sigma” (3829 ед./мг). PGP и GPGPGR были синтезированы в секторе регуляторных пептидов ИМГ РАН. DNA-PGP

был получен в ИБХ им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Анализ и очистку немеченых и меченых препаратов проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson (Франция). Для определения наличия или отсутствия продуктов деградации PGP и GPGPGR в желудочном соке использовали масс-спектрометр LCQ Advantage MAX (Термоэлектрон, США). Чувствительность для PGP составляет 10 нг.

Анализ проб желудочного сока, содержащего PGP, GPGPGR и DNA-PGP, проводили на хроматографе Милихром А-02, на колонке ProntoSIL-120-5-C₁₈ AQ DB-2003 (2 × 75 мм, 5 мкм), градиент элюента В (метанол) в А (0,2 М LiClO₄ + 0,005 М HClO₄). Градиент проводили, увеличивая концентрацию метанола с 5 до 100 % в элюенте А в течение 12 мин. Скорость подачи элюента — 200 мкл/мин. Чувствительность УФ-детектора данного прибора составляет 0,0001 о. е. Времена удерживания Pro — 1,23 мин, Gly — 0,98 мин, PG — 1,71 мин, GP — 1,98 мин, PGP — 4,00 мин, GPG — 6,90 мин, PGPGR — 3,72 мин, GPGPGR — 4,32 мин, GPGPGR — 4,67 мин, GPGPGR — 4,87 мин, DNA-PGP — 10,35 мин, DNA — 11,70 мин.

Анализ проб желудочного сока, содержащего меченный PGP, проводили на хроматографе, состоящем из приборов фирм Gilson и Shimadzu, на колонке Supercosil ABZ+Plus (4,6 × 250 мм, 5 мкм), в градиенте элюента В (метанол) в А {(NH₄)₂PO₄ + H₃PO₄ (50 мМ, pH 2,8)}. Градиент проводили, увеличивая концентрацию метанола с 0 до 27 % в элюенте А в течение 12 мин. Скорость подачи элюента — 0,8 мл/мин. Для анализа использовали проточный радиодетектор и жидкий сцинтиллятор Ecolite (MP Bio, США). Типовое значение фона составляло 0,01 мкКи. Достоверные данные кривых по радиоактивности ProGlyPro получали при радиоактивности анализируемой пробы 0,2 – 0,3 мкКи. Времена удерживания Pro — 2,90 мин, Gly — 2,81 мин, PG — 3,09 мин, GP — 3,34 мин, PGP — 5,03 мин.

Для приема и обработки хроматографических данных использовали систему “МультиХром” (ООО “Амперсенд”, Россия) на базе IBM PC/AT. Радиоактивность измеряли на проточном сцинтилляционном счетчике, входящем в состав хроматографического комплекса.

Дансильные производные PGP и GPGPGR и их метаболиты (Pro, Gly, ProGly, GlyPro, PGP)

Получение дансильных производных PGP и GPGPGR и их метаболитов производили по модифицированной методике [6, 7]. В ходе проведенных экспериментов с использованием модельных растворов Pro, GlyPro и PGP и их смесей установлено, что оптимально проведение реакции в течение 60 мин при 37 °С. В эппендорф помещали 33 мкл 0,2 М раствора NaHCO₃, 10 мкл раствора, содержащего 10 мкг пептида и 33 мкл раствора дансилхлорида (5 мг/мл). Смесь перемешивали и выдерживали при 37 °С в течение 60 мин. Анализ Pro, GlyPro, PGP проводили на хроматографе Милихром А-02, колонка ProntoSIL-120 – 5-C₁₈ AQ DB-2003 (2 × 75 мм, 5 мкм), градиент элюента В (метанол) в А (0,2 М LiClO₄ + 0,005 М HClO₄). Градиент проводили, увеличивая концентрацию метанола с 5 до 100 % в элюенте А в течение 12 мин. Времена удерживания ProDns — 6,20 мин, GlyDns — 5,14 мин, ProGlyDns — 5,35 мин, GlyProDns — 4,57 мин, PGPDns — 5,76 мин.

Методика получения меченного тритием PGP

5,2 мг PGP растворяли в 50 мкл водного раствора RhCl₃ (100 мг/мл), смешивали с 52 мг 5 % Pd/CaCO₃ и лиофилизировали. Затем 44 мг высушенной смеси помещали в ампулу, вакуумировали до давления 0,1 Па, заполняли газообразным дейтерием или тритием до давления 400 гПа и выдерживали при температуре 185 °С в течение 15 мин. Избыточный дейтерий или тритий удаляли вакуумированием. После охлаждения продукты реакции экстрагировали 10 % водным метанолом (6 × 1 мл), катализатор отфильтровывали, а фильтраты упаривали несколько раз в виде раствора в 10 % метаноле (3 × 3 мл) для удаления лабильного дейтерия или трития. Остаток анализировали на колонке Supercosil ABZ+Plus, 5 мкм, 4,6 × 250 мм (элюент NH₄H₂PO₄ + H₃PO₄, 50 мМ, pH 2,8, скорость элюирования — 1 мл/мин, длина волны — 210 нм) и очищали (система: метанол — вода, 5:95 с 0,1 % трифторуксусной кислоты, скорость элюирования — 1 мл/мин, длина волны — 210 нм) методом ВЭЖХ. Выход меченного по тритию препарата — 7 %, молярная радиоактивность — 6 Ки/ммоль.

Для выяснения распределения трития по молекуле PGP в аналогичных условиях проводили дейтерирование PGP и снимали масс-спектр изотопомера. При этом оказалось, что при изотопном обмене обмен с водородами (если весь включенный в трипептид дейтерий принять за 100 %) в N-концевой Pro — 76 %, в Gly — 13 %, в C-концевой Pro — 11 %. Таким образом, при использовании меченного тритием PGP с молярной радиоактивностью 6 Ки/ммоль, N-концевой Pro обладает молярной радиоактивностью 4,6 Ки/ммоль, Gly — 0,8 Ки/ммоль, в C-концевой Pro — 0,7 Ки/ммоль.

Методика проведения экспериментов с желудочным соком лошади и пепсином

Для проведения эксперимента использовали водный раствор PGP (1 мг/мл), водный раствор GPGPGR (1 мг/мл), водный раствор [³H]PGP (2,8 мКи/мл), водно-этанольный раствор DHA-PGP (10 мг/мл) и раствор пепсина (3,06, 0,306 и 0,0306 мг/мл) в 0,25 % соляной кислоте.

К 9 мл желудочного сока лошади добавляли рассчитанное количество водного раствора PGP (0,01, 0,02, 0,037 и 0,37 мкмоль на 1 мл желудочного сока или на 1 мл раствора пепсина), GPGPGR (0,01, 0,02, 0,037 и 0,37 мкмоль на 1 мл желудочного сока или на 1 мл раствора пепсина) или водно-этанольного раствора DHA-PGP (0,01, 0,02, 0,037 и 0,37 мкмоль на 1 мл желудочного сока) при температуре 37 °С.

Через определенные промежутки времени (0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20 и 40 мин) отбирали аликвоту (1 мл) и обрабатывали ее 1 М раствором KOH до pH 7. Полученные пробы упаривали, растворяли в 200 мкл смеси метанол — вода (1:1), наносили на патрон, содержащий 50 мг обращенной фазы LiChrosorb C₁₈, которая предварительно была промыта 1 мл метанола и уравновешена 1 мл смеси метанол — вода (1:1). Пептиды элюировали с патрона 2 мл смеси метанол — вода (1:1). Затем экстракты упаривали, растворяли в 200 мкл смеси метанол — вода (10:90) и анализировали методом ВЭЖХ. При работе с DHA-PGP элюирование проводили 2 мл метанола. Перед анализом методом ВЭЖХ пробы растворяли в 200 мкл метанола.

Результаты и их обсуждение

Как уже отмечалось во введении, PGP проявляет выраженную противоязвенную активность [8–13], что, по-видимому, не в последнюю очередь связано с его устойчивостью к протеолизу [14].

Для проверки этого предположения PGP и GPGPGR обрабатывали желудочным соком при температуре 37 °С в течение 0,5, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5, 15, 20 и 40 мин. В результате экспериментов обнаружено, что никаких продуктов деградации PGP и GPGPGR нет. Так как отсутствие деградации PGP и GPGPGR было основным вопросом данного исследования, полученные данные были проверены еще несколькими методами. Во-первых, продукты деградации PGP и GPGPGR искали с помощью ВЭЖХ после обработки аликвоты реакционной смеси в стандартных условиях дансилхлоридом. При этом оказалось, что на хроматограммах отсутствуют пики соединений, которые имели время удерживания, совпадающее со временем удерживания соответствующих дансильированных стандартов (ProDns, GlyDns, ProGlyDns, GlyProDns). Во-вторых, для этой цели был использован меченый по всем аминокислотным остаткам [³H]PGP. С целью выяснения распределения изотопной метки в молекуле PGP, в тех же условиях был проведен изотопный обмен с дейтерием, что позволило рассчитать содержание метки в каждом аминокислотном остатке. Это в свою очередь позволило количественно рассчитать концентрацию каждого метаболита PGP, если деградация PGP в проводимых экспериментах имела место. Но и этим методом при использовании счетчиков и де-

текторов по радиоактивности обнаружить метаболиты PGP не удалось. С использованием меченого PGP также был составлен подробный баланс по радиоактивности, где учитывались возможные потери при проведении реакции, выделении пептида и его анализе. Из полученных данных однозначно следует, что потери пептидов во всей этой технологической цепочке исключены. В-третьих, по данным масс-спектрометрического анализа содержания PGP или GP GP GP в желудочном соке до и после выдерживания их при 37 °С в течение 40 мин показало, что молекулярные пики, свидетельствующие о появлении метаболитов исходных пептидов, также не обнаруживаются.

Известно, что в желудочном соке присутствуют соляная кислота и пепсин. Поэтому параллельно были проведены исследования устойчивости PGP и GP GP GP в приведенных выше условиях в присутствии раствора соляной кислоты и пепсина. Полученные данные однозначно показали, что в этих условиях деградация PGP и GP GP GP не происходит.

Таким образом, из проведенного исследования следует, что высокая стабильность PGP и GP GP GP позволяет им, практически не подвергаясь воздействию агрессивной среды, реализовывать свой лекарственный потенциал.

С этой точки зрения также представляло интерес исследование в вышеприведенных условиях устойчивости DHA-PGP в присутствии раствора соляной кислоты и пепсина. Полученные данные показали, что в этих условиях гидролиз DHA-PGP не происходит. В то время как образование PGP из DHA-PGP в желудочном соке лошади можно зафиксировать методом ВЭЖХ (за 40 мин образуется около 50 – 55 %). По-видимому, этот эффект можно объяснить присутствием в желудочном соке ферментов, которые катализируют миграцию жирных кислот с одной аминокислотной группы на другую. В результате происходит образование ацилированных продуктов, содержащихся в желудочном соке, и свободного PGP. Очевидно, что динамика превращения DHA-PGP в PGP в разных условиях биологических испытаний различна, что отражается и на противовоспалительной активности DHA-PGP. В одних условиях противовоспалительный эффект DHA-PGP и PGP практически совпадает (стрессорная модель), а в других противовоспалительный эффект DHA-PGP выше эффекта PGP (примерно на 20 % в случае этаноловой модели) [5]. Таким образом, можно предположить, что в одном

случае происходит быстрое деацилирование DHA-PGP, в другом образовании PGP происходит с меньшей скоростью.

Авторы выражают благодарность профессору В. В. Безуглову (Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН) за синтез DHA-PGP в количестве, необходимом для проведения данной работы.

Работа выполнена при частичной поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, Российского фонда фундаментальных исследований, гранта Научные школы НШ-3626.2005.4 и Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2375.2009.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. С. Рысс, Э. Э. Зваргау, *Фармакотерапия язвенной болезни*, Невский Диалект — Изд. Бином, С.-Петербург — Москва (1998).
2. В. А. Исаков, “Принципы лечения язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pylori*”, *Мат. 7-й сессии Российской группы по изучению Helicobacter pylori*, Нижний Новгород (1999), сс. 21 – 36.
3. H. S. Roghani, S. Massarrat, M. R. Pahlewanzadeh, and M. Dashti, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 709 – 712 (1999).
4. Г. Е. Самонина, Г. Н. Копылова, Б. А. Умарова, *Нейрохимия*, **25**(1 – 2), 128 – 131 (2008).
5. A. V. Trufanova, K. V. Shevchenko, *International Congress “Neuroscience for Medicine and Psychology”*, Sudak, Crimea, Ukraine (2008).
6. C. Gros, B. Labouesse, *Eur. J. Biochem.*, **4**(7), 463 – 470 (1969).
7. W. R. Gray, *Meth. Enz.*, **25B**, 121 – 138 (1972).
8. С. Е. Жуйкова, З. В. Бакаева, Г. Е. Самонина, *Вестн. моск. университета, сер. 16 (Биология)*, № 2, 20 – 22 (2003).
9. С. Е. Жуйкова, К. Е. Бадмаева, З. В. Бакаева, Г. Е. Самонина, *Известия РАН, сер. 16 (Биология)*, № 5, 585 – 586 (2004).
10. З. В. Бакаева, *Дис. канд. биол. наук.*, Москва (2004).
11. Г. Е. Самонина, I. P. Ashmarin, L. A. Lyapina, *Phatophysiology*, **8**, 229 – 234 (2002).
12. С. Е. Жуйкова, К. Е. Бадмаева, Г. Е. Самонина, Л. Г. Плесская, *Эксперим. клин. гастроэнтерол.*, № 4, 88 – 92 (2003).
13. Ю. А. Золотарев, С. Е. Жуйкова, И. П. Ашмарин и др., *Бюл. экп. биол. и мед.*, **135**(4), 423 – 426 (2003).
14. N. G. Levitskaya, E. A. Sebentsova, N. Yu. Glazova, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **372**, 243 – 246 (2000).

Поступила 10.09.09

DIGESTIVE STABILITY OF PGP, DHA-PGP AND GP GP GP PEPTIDES POSSESSING ANTIULCER ACTIVITY

K. V. Shevchenko*, A. V. Trufanova, and I. Yu. Nagaev

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia;

* e-mail: ATRegister@mail.ru

It is established that PGP and GP GP GP peptides are stable in horse gastric juice, hydrochloric acid, and pepsin. Such a high stability with respect to digestion process implies that these glyprolines can exhibit their medicinal potential and protect mucous membrane of the stomach from various ulcerogenic factors. The antiulcer effect was shown on almost all ulceration models. Interaction of PGP N-acylated in decosahexaenic acid (DHA-PGP) with horse gastric juice resulted in that about 90% of peptide molecules were cleaved to PGP and DHA after 5 minutes of incubation. This fact can explain some recently published data, according to which in vivo experiments showed almost identical antiulcer effects of DHA-PGP and PGP in stressor models in contrast to the ethanol model, for which the DHA-PGP antiulcer effect was 20% higher than that of PGP because of peptide complicated DHA-PGP deacylation after adsorption on gastric cellular wall.

Key words: gastric juice, pepsin, glyprolines, antiulcer effect