

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА И ПРОНАЗЫ Е В МОДЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ

Т. И. Бондаренко¹, И. В. Мацынова¹, И. И. Михалева²

Показано ингибирующее влияние дельта-сон индуцирующего пептида в разных концентрациях на активность трипсина и проназы Е в модельных опытах.

Ключевые слова: дельта-сон индуцирующий пептид, трипсин, проназа Е

ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия ознаменовались крупными успехами медико-биологической науки в исследовании биологически активных пептидов. Установлено, что пептиды выполняют функции медиаторов и модуляторов синоптической передачи, оказывают влияние на кровоток, являются модуляторами памяти, сна, формируют систему восприятия и сопротивления боли.

Определенный интерес в этом плане представляет дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП), который был открыт как пептид, обладающий гипногенным действием [7].

ДСИП — эндогенный нано пептид с аминокислотной последовательностью Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Gly молекулярной массой 848,98 Да. ДСИП обладает множественными метаболическими эффектами, влияя на те или иные регуляторные системы организма [2, 5].

Ключевую роль в клеточном метаболизме играет протеолиз, как составная часть обмена белков. Именно наличие внутриклеточного протеолиза делает возможным регуляцию содержания, а значит и активности ферментов в клетке, а также содержания некоторых биологически активных соединений — гормонов, пептидов. Протеолиз играет решающую роль в регуляции большинства физиологических процессов, происходящих в организме.

Прямое воздействие на энзиматический аппарат клетки открывает большие перспективы для лечения многих заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, свертываемости крови, а также патологических процессов, вызванных активацией протеолиза.

Вызывает интерес выявленное Г. И. Чипенс [4] структурное сходство между отдельными группами ингибиторов протеиназ и некоторыми биологически активными пептидами.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния ДСИП на активность трипсина и проназы Е в модельных опытах. Трипсин и проназа Е являются протеолитическими ферментами широкого спектра действия.

Трипсин (КФ 3.4.4.4) — панкреатическая эндопептидаза, проназа Е — протеолитический фермент микробного происхождения, лишенный амидазной активности и обладает как эндо- так и экзопептидной активностью.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовано влияние ДСИП в разных концентрациях на активность трипсина и проназы Е в модельных опытах. Использован ДСИП в концентрации 0,36, 0,5, 1,5, 10, 20 мкг, так как известно, что метаболические эффекты ДСИП зависят от дозы [3].

Инкубационная смесь для определения активности трипсина содержала 100 мг белка (сывороточного альбумина быка), 1 мг трипсина и ДСИП в 2 мл 0,1 М трис HCl буфера (рН 8).

Инкубационная смесь для определения активности проназы Е содержала 10 мг белка (сывороточного альбумина быка), 50 мкг проназы Е и ДСИП в 2 мл фосфатного буфера рН 7,4.

В обоих случаях пробы инкубировали в водяной бане при 37° С в течение 60 мин, постоянно помешивая. Реакцию останавливали добавлением раствора ТХУ в конечной концентрации 6 %. Надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин, затем нейтрализовали добавлением 20 % раствора NaOH.

Об интенсивности протеолиза судили по приросту кислото-растворимых фолин-положительных продуктов, определяемых методом [6] в модификации [9] и по увеличению количества аминного азота [8] в надосадочной жидкости.

Контролем служили пробы без фермента. Результаты выражали в мг тирозина на 1 мг фермента в час или в мг аминного азота на 1 мг фермента в час.

В исследовании использовали ДСИП, синтезированный в институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из таблицы видно, что добавление в инкубационную смесь 0,36 мкг ДСИП (соответствует концентрации ДСИП, используемой в опытах *in vivo* на животных) приводит к ингибированию прироста фолинположительных продуктов (ФПП) по сравнению с контролем на 37 %. При внесении в инкубационную смесь 0,5, 1 и 10 мкг ДСИП изменения прироста ФПП по сравнению с контролем не происходит. При добавлении ДСИП в концентрации 5 и 20 мкг наблюдается снижение ферментативной активности трипсина по сравнению с контролем на 42 и 54 % соответственно.

ДСИП в концентрациях 0,36, 5, 10 и 20 мкг приводит к ингибированию эндопептидазной активности проназы Е соответственно на 17, 18, 27 и 61 % по сравнению с конт-

¹ Кафедра биохимии и микробиологии Ростовского государственного университета, Ростов-на-Дону, 344006, ул. Б. Садовая, 105.

² Лаборатория химии пептидов ИБОХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, 117871, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Влияние ДСИП на активность трипсина (в мг тирозина/1 мг фермента/час) и проназы E

Условия эксперимента	Активность трипсина	Активность проназы E	
		в мг тирозина/1 мг фермента/ч	в мг аминокислота/1 мг фермента/ч
Контроль	43,41 ± 2,67	44,88 ± 0,62	29,62 ± 6,64
0,36 мкг ДСИП	27,10 ± 3,36*	36,90 ± 1,10*	5,29 ± 1,26*
0,5 мкг ДСИП	41,58 ± 1,03	63,32 ± 2,27*	10,71 ± 1,42*
1 мкг ДСИП	40,32 ± 1,93	52,50 ± 3,42*	32,97 ± 1,66
5 мкг ДСИП	25,08 ± 1,68*	36,64 ± 3,33*	7,47 ± 1,18*
10 мкг ДСИП	32,11 ± 5,24	32,45 ± 4,49*	7,01 ± 2,45*
20 мкг ДСИП	19,85 ± 1,20*	17,19 ± 1,69*	32,52 ± 0,42

* Различия достоверные по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

ролем. При добавлении 0,5 мкг и 1 мкг ДСИП в инкубационную пробу наблюдается прирост ФПП по сравнению с контролем на 41 и 16 %, соответственно (см. таблицу).

При добавлении ДСИП в инкубационную смесь в концентрациях 0,36, 0,5, 5 и 10 мкг наблюдается снижение экзопептидазной активности проназы E на 82, 63, 75 и 76 % соответственно. ДСИП в концентрациях 1 и 20 мкг не приводит к изменению экзопептидазной активности проназы E.

Таким образом, ДСИП в разных концентрациях обладает регулирующим эффектом на активность трипсина и проназы E, причем в основном, ингибирующим.

Влияние на амидогидролазы как природных, так и синтетических ингибиторов — весьма эффективный способ регуляции их активности. Трипсин и проназа — сериновые амидгидролазы. Протеазы животных являются, по-видимому, продуктом дивергентной эволюции, т.е. происходят от общей для них сериновой “пропротеазы”, возникшей на ранних этапах развития организмов. Микробные протеазы по отношению к протеазам животных — пример конвергентной эволюции, в ходе которой разные организмы выработали общий механизм катализа, исходя из разных белковых структур. Практически отсутствует гомология первичных структур протеаз животного и микробного происхождения. Наблюдается сохранение небольших последовательностей на определенных участках молекул ферментов у животных и некоторых микроорганизмов. Панкреатические протеазы — химотрипсин, трипсин и другие имеют сходные последовательности в области остатков Ser195, His57 и N-концевого участка с такими микробными протеазами, как проназа *Streptomyces griseus*. Несмотря на отличия в последовательности

аминокислот у протеаз животного и микробного происхождения, эти ферменты довольно сходны в отношении пространственной структуры каталитически важных участков [1]. Характерным для сериновых протеиназ является чувствительность к инактивации под действием дигипропилфторфосфата и др. фосфоорганических соединений, которые образуют фосфо-эфирную связь с единственной ОН-группой Ser195. Другой каталитически важной группой является имидазольная группа His57. Удалось найти соединения, реагирующие с His57. Ими оказались пептиды, галоидкетоны, производные ациламиноокислот [10]. Эти соединения полностью инактивировали сериновые протеазы. Последовательность аминокислот вблизи His57 также оказалась весьма консервативной для большого числа ферментов этой группы. Вероятно, ДСИП или продукты его гидролиза также могут взаимодействовать как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом. Связывание ингибиторов во многих случаях приводит к конформационным перестройкам в белке, что проявляется в изменениях их спектральных и других физико-химических свойств, в изменении рКа ионогенных групп, а также в большей устойчивости комплексов ферментов с некоторыми ингибиторами к денатурации по сравнению со свободными белками.

ВЫВОД

Дельта-сон индуцирующий пептид в разных концентрациях ингибирует активность трипсина и проназы E в модельных опытах.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. К. Антонов, *Химия протеолиза*, Наука, Москва (1983).
2. Т. И. Бондаренко, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Москва (1990).
3. В. М. Ковальзон, *Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных*, **31**, 3 – 58 (1986).
4. Г. И. Чипенс, *Биоорганическая химия*, **6**(8), 1265 – 1267 (1980).
5. Т. А. Шустанова, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Ростов-на-Дону (1999).
6. O. H. Lowry, V. I. Rosebrough, A. L. Farr, and R. I. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 275 (1951).
7. M. Monnier and G. A. Schoenenberger, *3th Eur. Congr. Sleep Res. Montpellier*, 1976, Sleep.-1976.-Basel, Karger, 257 – 263 (1977).
8. S. Moor and W. Stein, *J. Biol. Chem.*, **176**(1), 367 – 388 (1948).
9. G. R. Schachterle and R. L. Pollack, *Anal. Biochem.*, **51**(2), 654 – 655 (1973).
10. G. Schoellmann and E. Shaw, *Biochemistry*, **2**, 259 – 263 (1963).

Поступила 09.01.03

THE EFFECT OF A DELTA-SLEEP-INDUCING PEPTIDE ON THE ACTIVITY OF TRYPSIN AND PRONASE E

T. I. Bondarenko¹, I. V. Matsynova¹, and I. I. Mikhaleva²

¹ Department of Biochemistry and Microbiology, Rostov State University, ul. Bol'shaya Sadovaya 105, Rostov-on-Don, 344006 Russia

² Laboratory of Peptide Chemistry, Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

A delta-sleep-inducing peptide in various concentrations inhibits the pharmacological activity of trypsin and pronase E under experimental conditions.