

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АНАБОЛИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Ю. Н. ШАМБЕРЕВ, В. И. ГАВРИЩУК, Ю. И. НЕТЕСА, В. В. БАЕВ

(Лаборатория гормональных исследований
и Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина)

К настоящему времени установлено, что в гипоталамусе млекопитающих и человека вырабатываются гормоны, которые освобождают или ингибируют секрецию тропных гормонов гипофиза [15]. По своей структуре это пептиды, включающие от 3 до 14 аминокислотных остатков; изучено строение и осуществлены синтезы тиролиберина, люлиберина и соматостатина [3, 16]. Строение соматолиберина — гормона, освобождающего соматотропин, все еще не установлено, хотя есть данные о его существовании в гипоталамических экстрактах [17]. Попытки выделить соматолиберин и определить его строение были предприняты в США группой Шелли (из свиных гипоталамусов был выделен сначала пентадекапептид [12], а затем декапептид Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-Glu-Lys-Glu-Ala [13]) и в СССР Юдаевым с сотрудниками (из бычьих гипоталамусов выделен трипептид, строение которого, по мнению авторов, должно отвечать последовательности pGlu-Ser-Gly-NH₂ [9]). При дальнейших биологических исследованиях выяснилось, что декапептид, выделенный группой Шелли и названный рилизинг-гормоном, как показали сами авторы, таковым не является [11]. Не проявил активности соматолиберина и трипептид pGlu-Ser-Gly-NH₂ [14].

Цель настоящей работы — на основании теоретических представлений о строении и механизме действия пептидных гормонов [5] и экспериментальных данных об аминокислотном составе фракций гипоталамических экстрактов, проявивших активность соматолиберина, а также строения тиролиберина и люлиберина (двух известных ныне рилизинг-гормонов) синтезировать пептиды — потенциальные аналоги соматолиберина — и изучить их влияние на секрецию соматотропина, анаболические процессы и рост животных.

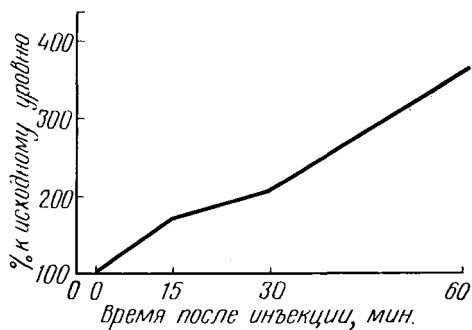
Исходя из имеющихся данных о строении тиролиберина, люлиберина и аминокислотном составе декапептида [13] и трипептида [9] можно предположить, что потенциальные аналоги соматолиберина имеют N-концевую пироглутаминовую кислоту, а в центре молекулы — аминокислоты основного характера, окруженные алифатическими аминокислотными остатками [5]. Нами были выбраны две основные последовательности аминокислот:

pGlu-Ser-His-Arg-Leu-Val (I),

pGlu-Ser-Gly-Arg-Leu-Val (II).

Поскольку в рилизинг-гормонах C-концевые остатки присутствуют в виде амидов, были получены также соответствующие амиды.

Гексапептиды синтезировали твердофазным методом на автоматическом пептидном синтезаторе «Beckman 990» на хлорметилованном полимерном носителе по стандартной методике [4], применяя программу, описанную ранее [1]. Аминогруппы L-аминокислот блокировали трет-бутилоксикарбонильной (Boc) группой, боковые функциональные группы остатков аргинина и гистидина — тозилным (Tos) остатком; пироглутаминовую кислоту вводили в виде бензилоксикарбонильного производного (Z-L-pGlu). Отщепление пептидов от полимерной матрицы осуществляли в случае амидов обработкой аммиаком в абсолют-



Влияние гексапептида (I) на концентрацию соматотропина в крови телок (доза 50 мг на животное).

ходы конечных пептидов не превышали 30 %. Выход (1) = 28 %, $[\alpha]_{25}^{D_550}$ (с — 1,0, 1 % AcOH); $C_{31}H_{51}N_{11}O_9 \cdot 2CH_3COOH$.

При биологических испытаниях синтезированных соединений в плазме и сыворотке крови телок определяли содержание соматотропина, СБИ, 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) и ряд показателей обмена веществ [2, 6]. Наибольшей биологической активностью обладает гексапептид (I), названный нами анаболлиберин [8]. При подкожной инъекции этого пептида в количестве 50, 100, 150 и 200 мг в физиологическом растворе на одно животное (телки холмогорской породы, живая масса 200—250 кг) содержание соматотропина в крови через 60 мин возрастало до 370 % к исходному уровню. Более закономерные результаты получены при введении меньшей его дозы (рисунок).

Эти данные свидетельствуют о значительной специфичности препарата. В ранее проведенных опытах с внутривенной инфузией животным высоких доз (30—60 г) отдельных аминокислот (аргинина или лизина) уровень соматотропина повышался лишь до 150 % [7].

Препарат не оказывал влияния на температуру тела и пульс; отмечено лишь незначительное учащение дыхания через 1 ч после введения. Под влиянием анаболлиберина в крови снижалось содержание сахара, неэтерифицированных жирных кислот, остаточного азота и липидов, что характерно для инсулиновой фазы действия соматотропина.

Способность препарата (I) стимулировать секрецию соматотропина и анаболические процессы подтвердилась и в опытах на бычках при имплантации препарата. Опыты проводили в учхозе «Михайловское» на 15 бычках голландской породы, которые по принципу аналогов были распределены на 3 группы: 1-я — контроль, 2-я и 3-я — имплантация бычкам гранул препарата соответственно в количестве 50 и 100 мг. В начале опыта, а также на 2, 16 и 31-й день после имплантации у всех животных брали кровь для анализов. Через каждые 15 дней бычков взвешивали. За период опыта животные всех групп получали одинаковый рацион: кукурузный силос — 5 кг, сенаж — 5, смесь концентратов — 3 кг. Бычки содержались на привязи. О влиянии гексапептида (I) на живую массу животных можно судить по данным табл. 1.

При имплантации 100 мг пептида среднесуточный прирост живой массы в первый месяц повысился на 75 г, за первые две недели — на 94 г. Учитывая высокий уровень прироста (в контроле 988 г), можно полагать, что этот результат представляет практический интерес при интенсивном выращивании молодняка, когда физиологические возможности роста животных уже почти полностью исчерпаны (1206 г в

ном метаноле и хлороформе, а для пептидов со свободной карбоксильной группой — обработкой безводным фтористым водородом при 0° с одновременным удалением всех защитных групп [10]. Очистку конечных продуктов проводили гель-фильтрацией на сефадексе G-15 и ионнообменной хроматографией на СМ-целлюлозе аналогично описанной ранее [1]. Чистоту полученных соединений контролировали тонкослойной хроматографией на пластинках с силикагелем, электрофорезом на бумаге, элементным и аминокислотным анализами. Вы-

Таблица 1

Влияние гексапептида (I) на рост животных

| Группа | Живая масса в начале опыта, г | Среднесуточный прирост | | | |
|--------|-------------------------------|------------------------|-------|----------|-------|
| | | за первые 2 недели | | за 1 мес | |
| | | г | % | г | % |
| 1 | 215,6±26 | 988 | 100 | 1131 | 100 |
| 2 | 216,2±23 | 988 | 100 | 1100 | 97,3 |
| 3 | 216,0±25 | 1082 | 109,5 | 1206 | 106,6 |

Таблица 2

Изменение уровня соматотропина в сыворотке крови животных под влиянием гексапептида (I) (мкг %)

| Группа | До опыта | Интервалы после имплантации, дни | | | Среднее за опыт |
|--------|----------|----------------------------------|--------|-------|-----------------|
| | | 2 | 16 | 21 | |
| 1 | 20,58 | 11,79 | 22,24 | 15,60 | 17,55 |
| 2 | 14,77 | 12,78 | 31,87 | 15,87 | 18,67 |
| 3 | 16,93 | 12,28 | 37,85* | 17,93 | 21,24 |

* P < 0,05

сутки за первый месяц опыта, у бычков 3-й группы) и трудно добиться увеличения прироста живой массы только улучшением кормления. Дальнейшие наблюдения показали, что в течение второго месяца после однократной имплантации пептид уже не приводил к увеличению массы животных, т. е. действие препарата было довольно кратковременным.

Уровень соматотропина в крови у подопытных животных увеличился в среднем за опыт на 6—21 %, наиболее значительное повышение отмечено на 16-й день опыта (табл. 2). При однократной имплантации препарата доза 100 мг имела преимущество перед дозой 50 мг.

Уровень связанного белкового йода (СБИ), а следовательно и тироидных гормонов, у бычков 2-й и 3-й групп повышался на 2-й день опыта (табл. 3), что свидетельствует о повышении активности щитовидной железы, однако в последующие дни этот показатель резко снижался и затем приближался к исходному. Возможно, анаболлиберин несколько стимулирует секрецию тиротропина или же действие пептида на щитовидную железу опосредовано через соматотропин.

Препарат не оказывал существенного влияния на уровень глюкокортикоидов в крови, тенденция к увеличению их содержания у животных 3-й группы на второй день опыта, по-видимому, также опосредована через соматотропин.

Анализ изменений белкового обмена в крови дает основание полагать, что гексапептид (I), особенно в повышенных дозах, стимулирует анаболические процессы в обмене веществ животных, что подтверждается лучшим использованием аминного азота и уменьшением содержания в крови одного из конечных продуктов белкового обмена — мочевины.

Содержание сахара в крови подопытных животных снижалось на 2-й день опыта и существенно возросло на 16-й день, что характеризует разные фазы действия соматотропина. При введении анаболлиберина содержание липидов в сыворотке крови животных достоверно повышалось на 2-й день опыта по сравнению с контролем, причем более значительно при большей дозе. Липолиз в жировой ткани и выход

Изменение состава крови у животных под влиянием гексапептида (I)

| Группа | До опыта | Сроки проведения анализа крови, дни | | | В среднем за опыт |
|-----------------------|------------|-------------------------------------|------------|-------------|-------------------|
| | | 2 | 16 | 31 | |
| СБИ, мкг % | | | | | |
| 1 | 7,33±0,48 | 6,92±0,18 | 6,79±0,31 | 7,24±0,47 | 6,99 |
| 2 | 6,76±0,39 | 7,14±0,21 | 5,73±0,10* | 6,46±0,35 | 6,44 |
| 3 | 7,00±0,45 | 7,65±0,22* | 6,08±0,51 | 7,22±0,50 | 6,98 |
| 11-ОКС, мкг % | | | | | |
| 1 | 3,29±0,59 | 4,10±0,53 | 3,67±0,24 | 4,48±0,48 | 3,88 |
| 2 | 3,66±0,66 | 4,09±0,37 | 3,84±0,17 | 3,97±0,55 | 3,89 |
| 3 | 3,11±0,78 | 4,16±0,48 | 3,57±0,42 | 3,61±0,99 | 3,61 |
| Белок, г % | | | | | |
| 1 | 9,52±0,28 | 9,68±0,11 | 9,31±0,14 | 9,23±0,17 | 9,43 |
| 2 | 9,81±0,38 | 9,74±0,16 | 9,29±0,16 | 9,53±0,07 | 9,59 |
| 3 | 10,05±0,35 | 10,02±0,16 | 9,04±0,24 | 9,57±0,25 | 9,67 |
| Остаточный азот, мг % | | | | | |
| 1 | 23,83±0,51 | 23,43±0,74 | 27,55±1,78 | 24,11±0,75 | 25,03 |
| 2 | 22,22±0,56 | 22,86±0,95 | 29,01±0,58 | 22,52±0,33 | 24,80 |
| 3 | 22,44±0,69 | 22,46±1,81 | 26,44±0,67 | 22,53±0,33 | 23,81 |
| Аминный азот, мг % | | | | | |
| 1 | 2,90±0,09 | 3,14±0,17 | 2,83±0,04 | 2,95±0,10 | 2,97 |
| 2 | 2,95±0,08 | 3,33±0,40 | 2,80±0,05 | 2,66±0,06* | 2,93 |
| 3 | 2,93±0,20 | 2,72±0,15 | 3,02±0,25 | 2,58±0,07** | 2,77 |
| Мочевина, мг % | | | | | |
| 1 | 10,52±1,20 | 10,76±1,13 | 10,91±0,63 | 8,76±0,53 | 10,14 |
| 2 | 10,94±1,38 | 9,64±0,74 | 10,91±0,66 | 7,85±0,31 | 9,47 |
| 3 | 11,01±0,79 | 8,77±0,40 | 10,47±0,96 | 7,42±0,34 | 8,89 |
| Сахар, мг % | | | | | |
| 1 | 76,4±1,6 | 73,8±3,7 | 77,4±3,4 | 64,4±2,4 | 71,9 |
| 2 | 76,4±2,6 | 64,4±4,0 | 77,2±3,4 | 67,2±5,2 | 69,6 |
| 3 | 76,6±3,7 | 65,6±3,7 | 81,8±1,4 | 65,0±3,2 | 70,8 |
| Липиды, мг % | | | | | |
| 1 | 396±6,0 | 266±8,0 | 338±15,0 | 342±20,0 | 315 |
| 2 | 393±31,0 | 304±8,0** | 321±21,0 | 308±8,0 | 312 |
| 3 | 414±19,0 | 318±9,0** | 343±8,0 | 381±15,0 | 348* |

* P<0,05; **P<0,01.

липидов и жирных кислот в кровь стимулируются тиротропином и соматотропином, повышенным содержанием которых, по-видимому, и следует объяснить динамику липидов в проведенном опыте. У подопытных животных также увеличилось содержание кальция и снизилась концентрация фосфора в крови.

Таким образом, инъекция, а также имплантация животным гексапептида (I) повышают уровень соматотропина в крови и приводят к изменениям в уровне белкового, углеводного, жирового и минерального обмена. В результате активизируется синтез белка, повышается прирост живой массы (в первые две недели на 9,5 %, а за месяц — на 6,6 %) по сравнению с контролем. Имплантация 50 мг препарата в условиях опыта была неэффективной.

Учитывая высокие абсолютные показатели прироста живой массы в 3-й группе, приближающиеся к потолку биологических возможностей этой породы животных, можно заключить, что гексапептид (I) представляет интерес как соединение, стимулирующее рост мясной продуктивности сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баев В. В., Мирошников А. И., Бакалкин Г. Я., Комиссарова Е. Н., Исаченков В. А. Синтез и биологическая активность люлиберина и его аналогов. — Биоорганическая химия, 1978, т. 4, с. 489—499. — 2. Методы определения гормонов в интактном организме с.х. животных. — Под ред. Р. Веселухина и др., 1969. — 3. Номенклатура пептидных гормонов. — Биоорганическая химия, 1976, т. 2, с. 129—132. — 4. Стюарт Дж., Янг Дж. Твердофазный синтез пептидов. М., «Мир», 1971. — 5. Чипенс Г. И., Паварс А. П., Палсуевич О. С., Романовский П. Я., Вегнер Р. Е., Ауна Э. П., Клуща В. Е. Функциональная организация и механизм действия пептидных гормонов. — В сб.: Современ. вопр. эндокринологии, 1972, вып. 4, с. 64—81. — 6. Шамберев Ю. Н., Ковальчук И. С., Атрашков В. А. Влияние пола и кастрации на гормональный профиль и обмен веществ у животных. — Докл. ТСХА, 1969, вып. 146, с. 77—84. — 7. Шамберев Ю. Н. Влияние алиментарных факторов на секрецию гормонов у молодняка крупного рогатого скота. — Изв. ТСХА, 1974, вып. 3, с. 164—175. — 8. Шамберев Ю. Н., Иванов В. Т., Жукова Г. Ф., Баев В. В. Гексапептид — стимулятор освобождения гормона роста и анаболических процессов в организме животных. — Автор. свид. № 622807 (кл. С07с), поступило 16 декабря 1976. — 9. Юдаев Н. А., Утешева З. Ф., Новикова Т. Е., Швачкин Ю. П., Смирнова А. П. Гипоталамический пептид — стимулятор освобождения ростового гормона. — Докл. АН СССР, 1973, т. 210, с. 731—732. — 10. Sakakibara S. — In: Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (Weinstein B. ed.), 1971, vol. 1, p. 51—85. — 11. Sandow J., Arimura A., Schally A. V. — Endocrinology, 1972, vol. 90, p. 1315—1320. — 12. Schally A. V., Müller E., Sawano S. — Endocrinology, vol. 82, p. 271—277. — 13. Schally A. V. e. a. — Endocrinology, 1969, vol. 84, p. 1493—1498. — 14. Schally A. V. e. a. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, vol. 55, p. 556—562. — 15. Schally A. V. e. a. — Pure Appl. Chem., 1974, vol. 37, p. 315—328. — 16. Voelter W. — In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe (Herz W. e. a., eds.), 1977, S. 439—564. — 17. Wilber J., Porter J. — Endocrinology, 1970, vol. 87, p. 807—810.

Статья поступила 21 марта 1979 г.

SUMMARY

By solid phase technique of peptide synthesis 4 hexapeptides — potential analogs of somatoliberine — are obtained and studied. One of them, named anaboliberine can stimulate secretion of somatotropine and protein biosynthesis in livestock. Probably, its action is partially brought about through thyrotropine. After implantation of anaboliberine to young bulls their average gain increased by 9,5 % during the first 2 weeks and by 6,6 % during a month as compared with the check bulls.