

АНАЛОГИ ФРАГМЕНТА HLDF КАК МОДИФИКАТОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ДЕЙСТВИЮ ХОЛОДА

Е.Н.Гончаренко¹, Л.И.Деев¹, И.А.Костанян², М.Я.Ахалая¹,
Н.Ю.Кудряшова¹, А.Г.Платонов³

¹Биологический факультет, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы, 119899, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117871, Москва, Россия

³Экологический факультет, Российский университет дружбы народов,
Подольское шоссе, 8/5, 113093, Москва, Россия

Обнаружено, что профилактическое введение синтезированного Туг-аналога пептида HLDF-6 ограничивало реакцию системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники и симпатико-адреналовой системы самцов крыс на холодовое воздействие. HLDF-6 и его Туг-аналог повышали также устойчивость (продолжительность жизни) самцов мышей к этому воздействию. В аналогичных опытах с самками животных исследованные пептиды подобной биологической активности не проявляли.

В полипептидной цепи эндогенного фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) был идентифицирован биологически активный 6-членный фрагмент TGENHR, синтезированный аналог которого (HLDF-6) проявил способность взаимодействовать с липидным компонентом мембран клеток HL-60, влиять на связывание цитокинов с клеточной поверхностью, а также оказывать противоопухолевый эффект на модели перевиваемой NSO миеломы [1]. Неспецифический характер взаимодействия HLDF-6 с биолипидами дает основания предположить, что этот пептид может изменять физико-химические свойства мембран и других клеток, отличных от HL-60, модифицировать чувствительность их липидного компонента к перекисидации, а также влиять на взаимодействие различных биологически активных соединений с биомембранами.

Не исключено, что подобным образом HLDF-6 может модулировать течение важных физиологических и адаптационных процессов как на клеточном, так и на организменном уровне. Об этом, в частности, свидетельствуют результаты исследований влияния пептида HLDF-6 на раннее доимплантационное развитие эмбрионов мышей *in vitro*. Обнаружено, что пептид благотворно влияет на зародыши, находящиеся в процессе дробления, но не оказывает никакого воздействия на их дифференцировку. На основании этих данных было высказано предположение, что HLDF-6 выполняет роль своеобразного фактора выживания [2].

Для проверки этого предположения было исследовано влияние HLDF-6 и его Туг-аналога (HLDF-Y) на стресс-реакцию, оцениваемую по ряду биохимических параметров, и жизнеспособность животных в условиях переохлаждения.

Материалы и методика. Объектом исследований служили половозрелые самцы и самки мышей линий СВА/С57Black6, СВВА и SHK (с массой тела 18-20 г) и крыс линии Вистар (180-210 г).

Синтез пептидов проводили твердофазным методом с использованием Вос/Vzl-методологии. Чистоту полученных препаратов оценивали с помощью аминокислотного и масс-спектрометрического (MALDI-спектрометрия) анали-

зов. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе Vision 2000 (Thermo Bioanalysis, Англия) [3]. Свежеприготовленные водные растворы пептидов вводили животным внутривенно.

Холодовое воздействие осуществляли, выдерживая животных в ванне с ледяной водой (0-2°C) в течение необходимого времени.

При определении уровня серотонина (5-ОТ) в селезенке крыс применяли флуорометрический метод [4]. Измерение содержания в надпочечниках катехоламинов (КА) адреналина и норадреналина проводили по [5], а 11-оксикортикостероидов (КС) — по [6].

При статистической обработке результатов достоверность различий между опытом и контролем оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты исследований. Исследование способности HLDF-6 и HLDF-Y повышать устойчивость организма к стрессорным воздействиям проводили в опытах по кратковременному переохлаждению животных, вызывавшему гибель 15-20% животных в контрольной группе. В этих экспериментах влияние HLDF-6 и HLDF-Y на стресс-реакцию организма оценивали по показателям (содержанию в надпочечниках адреналина, норадреналина и 11-кортикостероидов), характеризующим состояние системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники и симпатико-адреналовой систем после холодового воздействия. Определение этих биохимических параметров проводили в период максимальной интенсификации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме — через 40 мин. после холодового воздействия [7]. В связи с этим для оценки влияния пептидов на состояние эндогенных защитных систем, способных предотвращать интенсификацию процессов ПОЛ в организме, в селезенке животных определяли уровень серотонина, являющегося эффективным ингибитором перекисидации биоллипидов [8].

Эксперименты проводили по следующей схеме: в различные сроки после введения пептида крыс помещали на 5 мин. в ледяную воду. Одновременно кратковременному переохлаждению подвергали и крыс, которым вместо пептида вводили физиологический раствор. Спустя 40 мин. после окончания воздействия крыс контрольной и двух опытных групп декапитировали и в их тканях определяли содержание указанных выше биологически активных веществ. У животных контрольных групп содержание адреналина, норадреналина, КС в надпочечниках и 5-ОТ в селезенке составляло соответственно 508 ± 40 , 235 ± 14 , $24,0 \pm 1,2$ и $3,05 \pm 0,45$ мкг/г ткани.

Через 40 мин. после действия холода в селезенке и надпочечниках самцов животных наблюдали повышение уровня всех исследуемых биологически активных веществ, тогда как у самок крыс было отмечено лишь снижение содержания серотонина в селезенке (табл. 1). Эти определяемые полом различия в характере изменений содержания КА, КС и серотонина в один и тот же период времени после холодового воздействия, вероятнее всего, обусловлены различной скоростью развития стресс-реакции у самцов и самок животных.

В отсутствие холодового воздействия после введения HLDF-6 и его Туг-аналога крысам обоего пола не было отмечено каких-либо изменений количества биогенных аминов и КС в исследованных тканях. Более того, при всех использованных вариантах применения (введение в дозах 0,5 мг/кг и 1 мг/кг за 4, 24 и 48 ч) HLDF-6 достоверно не влиял и на сдвиги в содержании этих биогенных веществ, вызываемые переохлаждением у самцов, а также серотонина — у самок крыс (данные не приводятся). В отличие от HLDF-6 его Туг-аналог HLDF-Y при инъекции самцам крыс в дозе 1 мг/кг за 4 ч до холодового воздействия проявил способность нормализовать содержание биоген-

ных аминов и КС в тканях подопытных животных (табл. 1). В то же время HLDF-Y не оказывал какого-либо заметного влияния на эти биохимические показатели у самок крыс, подвергнутых холодовому воздействию.

Таблица 1

Влияние HLDF-Y (1 мг/кг, за 4 ч) на содержание (% от контроля) катехоламинов, 11-оксикортикостероидов и серотонина в тканях крыс через 40 мин. после окончания холодового воздействия (5 мин. при 0-2°C)

Биогенные вещества	Ткань	Пол	Контроль	Холод	HLDF-Y + холод
Адреналин	Надпочечники	♂	100 ± 6 (n = 23)	125 ± 10 (n = 24) p < 0,05	100 ± 9 (n = 15)
		♀	100 ± 6 (n = 3)	78 ± 9 (n = 8)	66 ± 8 (n = 15) p < 0,01
Норадреналин		♂	100 ± 6 (n = 21)	126 ± 11 (n = 27) p < 0,05	105 ± 18 (n = 9)
		♀	100 ± 6 (n = 3)	85 ± 18 (n = 8)	75 ± 9 (n = 5) p < 0,01
Кортикостероиды		♂	100 ± 5 (n = 24)	163 ± 15 (n = 26) p < 0,001	124 ± 37 (n = 12)
		♀	100 ± 17 (n = 3)	95 ± 17 (n = 8)	74 ± 9 (n = 5)
Серотонин	Селезенка	♂	100 ± 12 (n = 21)	139 ± 11 (n = 25) p < 0,05	125 ± 13 (n = 15)
		♀	100 ± 12 (n = 12)	52 ± 2 (n = 7) p < 0,01	58 ± 9 (n = 5) p < 0,02

Примечание. За 100% принято содержание биогенных веществ в тканях крыс, не подвергавшихся холодовому воздействию (абсолютные значения этих показателей приведены в тексте); n — число животных в группе; p — показатель достоверности различий относительно контроля по критерию Стьюдента.

Зависящие от пола отличия в действии HLDF-Y проявились и при оценке влияния на жизнеспособность самцов и самок мышей в условиях интенсивного охлаждения. В этих опытах, результаты которых по самцам приведены в табл. 2, определяли время с момента помещения животных в ледяную воду до их гибели. Величина этого интегрального показателя устойчивости организма к холодовому шоку, в зависимости от линии, пола мышей и от опыта к опыту, варьировала в контроле в пределах от 130 до 175 секунд.

HLDF-6 и HLDF-Y при всех использованных вариантах предварительного введения не изменяли устойчивости самок мышей к действию холода. В экспериментах же с самцами после введения HLDF-6 прослеживалась тенденция к повышению средней продолжительности жизни, а в случае HLDF-Y — достоверное повышение жизнеспособности животных в условиях интенсивного охлаждения (см. табл. 2).

Обнаруженная способность HLDF-Y сглаживать ответную реакцию системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники и симпатико-адреналовой системы организма на холодовое воздействие, а также повышать устойчивость животных к холодовому шоку свидетельствует о наличии адаптогенной активности у этого пептида.

HLDF-6 и HLDF-Y содержат в своем составе остаток гистидина. Известно, что некоторые короткоцепочечные гистидин-содержащие пептиды (ГСП) оказывают положительное влияние на устойчивость организма к различным

экстремальным воздействиям. Ранее было обнаружено, что один из наиболее активных ГСП — карнозин не только предотвращает интенсификацию ПОЛ и нарушения обмена биогенных аминов в тканях животных, но и снижает процент гибели животных после переохлаждения [7, 9, 10]. Эти эффекты карнозина связывают с его способностью вызывать опосредованные антиоксидантные эффекты в организме [11, 12]. Низкое значение активной дозы HLDF-Y и значительные сроки (4 часа после введения) проявления его противострессорного эффекта также позволяют предположить доминирование опосредованных механизмов влияния этого пептида на устойчивость организма к действию холода. Не исключено, что этот эффект HLDF-Y может быть связан с опосредованным влиянием пептида на интенсивность процессов ПОЛ в организме. Однако четкая зависимость адаптогенной активности этого пептида от пола животных, не отмеченная у карнозина и других ГСП [12], указывает на возможность существенных различий в механизмах действия HLDF-Y и карнозина.

Т а б л и ц а 2

Продолжительность жизни (в % от контроля) самцов мышей в воде (0-2°C) при профилактическом (за 4 часа) введении HLDF-6 и HLDF-Y

Линия животных	Пептид (доза)	Холод (контроль)	Пептид + холод
СВА/С57Black6	HLDF-6 (1 мг/кг)	100 ± 7 (n = 10)	119 ± 13 (n = 6)
SHK		100 ± 8 (n = 28)	116 ± 9 (n = 28)
СВВА	HLDF-Y (1 мг/кг)	100 ± 3 (n = 25)	116 ± 4 (n = 25) p < 0,01
SHK		100 ± 5 (n = 24)	139 ± 8 (n = 25) p < 0,001

Примечание. В контроле (при холодом воздействии в отсутствие введения препаратов) продолжительность жизни мышей варьировала в разных экспериментах от 130 до 175 секунд; n — число животных в группе; p — показатель достоверности различий относительно контроля по критерию Стьюдента.

Дальнейшее изучение биологической активности синтезированных аналогов TGENHR имеет не только самостоятельное значение, но и представляет особый интерес в связи с возможной перспективностью использования этих пептидов в терапии рака [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Костянян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В. и др. Биологически активный фрагмент фактора клеток дифференцировки клеток линии HL-60. Идентификация и свойства // Биологическая химия. — 2000. — №7. — С. 505-511.
2. Сахарова Н.Ю., Костянян И.А., Лепихова Т.Н. и др. Эффект синтетических пептидов TQVENR и TGENHR на раннее эмбриональное развитие мышей *in vitro* // Докл. АН. — 2000. — Т. 372. — С. 84-86.
3. Rodionov I., Baru M., Ivanov V.A. A swellographic approach to monitoring continuous-flow solid-phase peptide synthesis // Pept. Res. — 1992. — Vol. 5. — P. 119-125.
4. Miller E.P., Maicle R.P. Fluorometric determination of indole derivatives // Life Science. — 1970. — Vol. 9. — №3. — P. 747-751.

5. Metcalf G. A rapid method for the simultaneous determination of NA, DA and 5-HT in small amounts of brain tissues // *Anal. Biochem.* — 1974. — Vol. 57. — №1. — P. 316-320.
6. Панкова Ю.А., Усваитова И.Я. Методы исследования некоторых гормонов и медиаторов / Тр. по новой аппаратуре и методикам. I-й МОЛМИ. Вып. III. — М., 1965. — С. 137-145.
7. Гончаренко Е.Н., Деев Л.И., Ахалая М.Я. и др. Исследование влияния карнозина и мидийного гидролизата на некоторые изменения обмена липидов и аминов у крыс, подвергнутых кратковременному переохлаждению // *Вестник МГУ. Сер. 16, Биология.* — 1995. — №2. — С. 37-41.
8. Гончаренко Е.Н., Кудряшов Ю.Б. Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980.
9. Гончаренко Е.Н., Антонова С.В., Ахалая М.Я. и др. Влияние карнозина на некоторые компоненты защитных ресурсов организма в условиях переохлаждения // *Вестник МГУ. Сер. 16, Биология.* — 1997. — №2. — С. 33-35.
10. Деев Л.И., Байжуманов А.А., Наумова О.В. Сравнительная эффективность влияния препаратов карнозина и женьшеня на интенсивность процессов перекисного окисления липидов при переохлаждении животных / Доклады МОИП. Общая биология. — М., 1997. — С. 93-96.
11. Деев Л.И., Гравская Е.Э., Байжуманов А.А. и др. Антиоксидантные и радиозащитные эффекты карнозина // *Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности.* — 1997. — №2. — С. 119-124.
12. Болдырев А.А. Карнозин. Биологическое значение и возможности применения в медицине. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. — 320 с.

FRAGMENT HLDF ANALOGS AS MODIFIERS OF ORGANISM RESISTANCE TO SUPERCOOLING

E.N.Goncharenko¹, L.I.Deyev¹, I.A.Kostanyan², M.Ya.Akhalaya¹,
N.Yu.Kudryashova¹, A.G.Platonov³

¹*Biological Faculty, Moscow State University, Vorobjevy Gory, 119899, Moscow, Russia*

²*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Miklukho-Maklaya street, 16/10, 117871, Moscow, Russia*

³*Ecological Faculty, Peoples' Friendship Russian University, Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia*

It was shown that the prophylactic administration of synthesized Tyr-analog of a peptide HLDF-6 decreased the response of hypothalamus—hypophysis—adrenal glands system and sympathoadrenal system of rat males on supercooling. HLDF-6 and its Tyr-analog also increased the resistance (the duration of life) of mouse males to supercooling. In the experiences with females these peptides did not show the similar biological activity.