



УДК 577.175.8'15

© 1994 Р. Х. Зиганшин, В. И. Свиряев, Б. В. Васьковский,*
И. И. Михалева, В. Т. Иванов, Ю. М. Кокоз*, А. Е. Алексеев*,
А. Ф. Корыстова*, Г. С. Сухова**, Т. Г. Емельянова***, А. Б. Усенко***

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПЕПТИДЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ МОЗГА ЗИМОСПЯЩИХ СУСЛИКОВ***

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино;

** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;

*** Институт химической физики РАН, Москва

Ключевые слова: зимняя спячка, биологически активные пептиды, неокиоторфин.

Из фракции уксуснокислого экстракта мозга гибернирующего длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* выделено более 20 индивидуальных пептидов и установлены их структуры. Для части из них осуществлен химический синтез и изучен спектр биологического действия. Найдено, что один из выделенных пептидов, неокиоторфин (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), известный ранее как слабый анальгетик, обладает кардиотропной и терморегуляторной активностью. Неокиоторфин активизирует *in vitro* потенциалозависимые кальциевые (предположительно через каналы L-типа) и блокирует АТР-зависимые калиевые токи предсердных волокон лягушки. Внутривнутрибрюшинное введение этого пептида сусликам, находящимся в состоянии зимней спячки, вызывает резкое увеличение частоты сокращений сердца и потребления кислорода, приводя к пробуждению животного. Внутривнутрибрюшинное и интраназальное введение неокиоторфина крысам вызывает у них увеличение температуры тела в термонейтральных (26—28° С) условиях, не оказывая заметного воздействия при низкой (4—6° С) и высокой (31—32° С) температурах окружающей среды. Другой выделенный пептид, Asp-Tyr, вызывает блокирование входящих потенциалозависимых кальциевых токов в предсердных волокнах

* В работе приняты стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC—IUB; кроме того, использованы следующие сокращения: DMF — диметилформамид, DSIP — пептид дельта-сна (WAGGDASGE) (M 849), EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота, HEPES — N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, PMSF — фенолметилсульфонилфторид, TFA — трифторуксусная кислота, НКТ — неокиоторфин (TSKYR), TEAA — ацетат триэтиламония, TRH — тиреолиберин.

** Адрес для переписки: 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии, Р. Х. Зиганшин.

лягушки, несколько увеличивая при этом выходящие токи. Его сульфатированный по остатку Туг аналог более эффективно и избирательно блокирует входящие потенциалозависимые кальциевые токи в предсердных волокнах лягушки, не изменяя при этом выходящих токов.

Уникальная способность некоторых видов животных резко понижать уровень метаболизма и в состоянии оцепенения переносить неблагоприятные условия внешней среды, а также перспективы широкого практического приложения результатов изучения механизма этого явления издавна привлекали к себе внимание исследователей. Среди основных видов спячки выделяют оцепенение, «зимний сон», гибернацию (зимняя спячка) и эстивацию (летняя спячка). Данная работа — часть исследований феномена гибернации, поэтому далее речь пойдет только об этом виде спячки, характерном для многих видов грызунов. При впадении в состояние зимней спячки у животных резко понижаются температура тела (от 38 до 5—6° С), потребление кислорода (в десятки раз), частота сердечных сокращений (от 300 до 1—2 ударов в 1 мин), происходит подавление практически всех физиологических функций организма [1]. Следует отметить особенность сердечно-сосудистой системы зимоспящих: при погружении в спячку электрические и механические свойства сердца сохраняются с понижением температуры тела до 0° С, в то время как у незимоспящих понижение температуры тела до 15—20° С приводит к развитию желудочковой фибрилляции и остановке сердца. Кроме того, сердце зимоспящих устойчиво ко всем известным воздействиям, вызывающим аритмию миокарда у незимоспящих животных (апликации аконитина и прокаина, повышению концентрации адреналина, стимулированию током в уязвимый период [2]). Интересно и то, что в периоды перехода животного из состояния бодрствования в состояние спячки падению температуры тела предшествует падение уровня метаболизма, т. е. температура тела не является ведущим фактором процесса гибернации [3, 4].

Начиная с 60-х годов в мире стали появляться сообщения о наличии в экстрактах мозга и периферических тканях животных, находящихся в состоянии спячки, веществ, вызывающих гипометаболический и гипотермический эффекты, при введении лабораторным животным [5—9]. Попытки различных исследователей выделить и идентифицировать вещества, ответственные за биологическую активность экстрактов, оказались безуспешными. Лишь однажды, в 1981 г., западногерманский исследователь Рейнхард сообщил о выделении из мозга находящейся в состоянии летней спячки двоякодышащей рыбы *Protopterus annectens* пептида, обладающего способностью снижать уровень синтеза ДНК и белка в культурах клеток [10], однако после патентования структуры этого пептида в 1983 г. дальнейших сообщений о работах с ним в печати не появлялось.

К настоящему времени показано, что в регуляции физиологических функций у зимоспящих животных принимают участие многие известные эндогенные пептиды, среди которых можно назвать опиоиды, TRH, бомбесин, холецистокинин, нейротензин. Однако перечень регуляторных пептидов, участвующих в механизмах гибернации, вряд ли можно считать исчерпанным, поскольку далеко не все проявления, свойственные этому состоянию, укладываются в спектр их действия. На наш взгляд, эндогенные регуляторы зимней спячки должны включать в себя как ингибиторы различных физиологических функций, обеспечивающих впадение животного в зимнюю спячку, так и активаторы, вызывающие переход животного в нормотропное состояние при его пробуждении.

В качестве первого этапа исследований механизмов регуляции физиологических функций зимоспящих животных нами была предпринята попытка выделить из мозга гибернирующих сусликов *Citellus undulatus* вещества с кардиотропной, гипометаболической и гипотермической активностью. В данной работе описано выделение из экстракта мозга гибернирующих сусликов двух биологически активных пептидов и результаты их тестирования на клеточном, органном и организменном уровне.

* Отдельные результаты этой работы опубликованы нами ранее [11—22].

Первичное фракционирование экстракта мозга зимоспящих сусликов



В результате первичного фракционирования экстракта мозга методом ультрафильтрации (схема 1) были получены 3 фракции: I ($M > 10$ кДа), II ($M 1-10$ кДа), III ($M < 1$ кДа). Их тестирование показало, что фракции I и III при внутривнутрибрюшинном введении мышам в дозе 1 мг/г не вызывали у них значимого изменения температуры тела и потребления кислорода, в то время как фракция II в этой же дозе проявляла выраженное гипометаболическое и гипотермическое воздействие (снижение ректальной температуры в среднем на $5-7^\circ\text{C}$ и потребления кислорода на 60%) [11]. Эта же фракция на изолированном сердце лягушки, кролика и кошки вызывала дозозависимое угнетение ритма сердцебиения и снижение амплитуды сокращения сердца (при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ г/л полная остановка работы сердца) [17]. Тестирование фракций, полученных из экстракта мозга летних эутермных животных и аналогичных по молекулярным массам фракциям I—III, не выявило ни у одной из них значимой гипометаболической и гипотермической активности в вышеуказанном тесте.

Для разделения фракции II, обладающей наибольшей гипометаболической и гипотермической активностью, использовали гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (рис. 1). Показано, что гипотермическим эффектом при внутривнутрибрюшинном введении мышам обладает лишь фракция, содержащая вещества с условной мол. массой 1—2 кДа (фракция 3 рис. 1, далее — фракция II-3). Фракция II-3 проявила отрицательные хроно- и инотропный эффекты действия на изолированном сердце лягушки, кролика и кошки, причем ее активность была на порядок выше, чем у фракции II [17]. Количество вещества, получаемого при дальнейшем разделении фракции II-3, не позволяло исследовать ее в вышеуказанных тестах.

В поисках более экономичного теста сотрудниками Института экспериментальной и теоретической биофизики был предложен чувствительный электрофизиологический тест, основанный на функциональных особенностях сердечно-сосудистой системы зимоспящих, отличающих их от незимоспящих. Известно, что потенциалы действия (далее ПД) сердечной мышцы у гибернирующих животных (монофазные, зарегистрированные на целом сердце в экспериментах *in vivo* и внутриклеточные — на клетках папиллярной мышцы) имеют характерные особенности: у них практически отсутствует фаза плато ПД и сильно замедлено окончание фазы реполяризации (рис. 2а) [23]. На сердце плато ПД формируется входящим Ca^{2+} - и выходящим K^{+} -токами. При этом показано, что падение

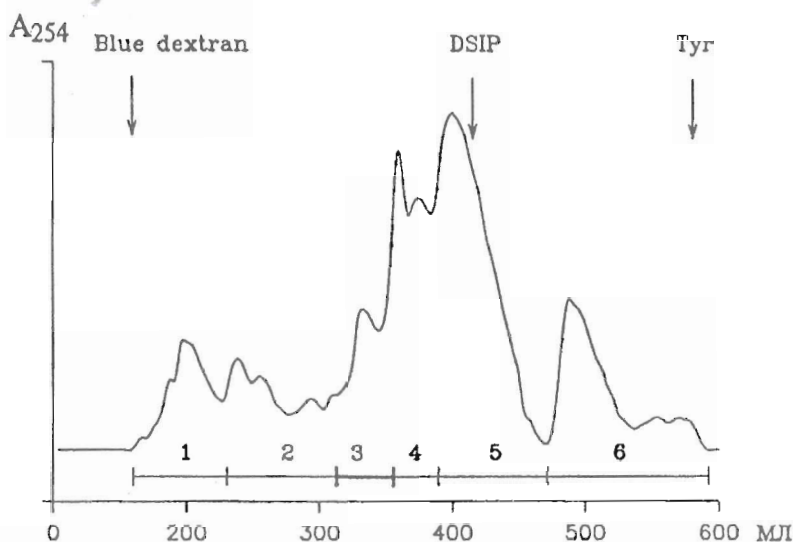


Рис. 1. Хроматографическое разделение 200 мг фракции II (схема 1) на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-25 f. Скорость элюции 16,6 мл/ч; цифрой 3 помечена фракция, содержащая, по данным калибровки, вещества с условной молекулярной массой 1—2 кДа (далее фракция II-3). Стрелками показаны места выхода маркерных веществ: DSIP (M 849), Blue dextran 2000

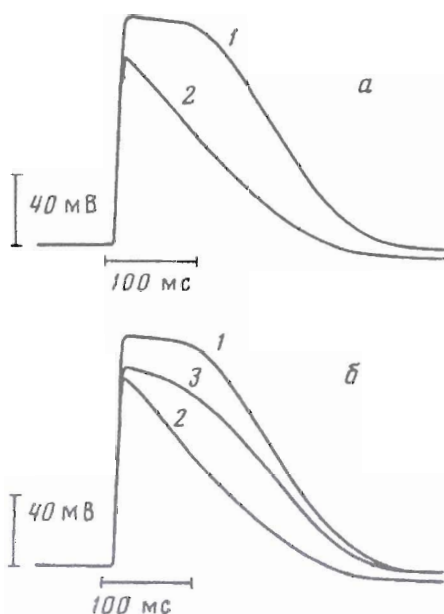


Рис. 2. Электрофизиологическое тестирование фракции II. а — потенциалы действия предсердных волокон зимоспящих (1) и активных летних (2) животных; б — потенциалы действия трабекул предсердия лягушки: 1 — контроль; 2 — после 15 мин действия фракции II; 3 — после 15 мин отмывки

температурного порога возникновения фибрилляции желудочка сердца и уменьшение частоты сокращений прямо связано с подавлением транспорта ионов Ca^{2+} и K^+ в мышечных волокнах сердца [24, 25]. Таким образом, можно предположить, что вещества, блокирующие Ca^{2+} -токи в этом тесте, связаны с понижением активности сердечной мышцы и, следовательно, с впадением животного в спячку и поддержанием этого состояния. Наоборот, вещества, вызывающие активацию Ca^{2+} -токов в клетках сердца, могут проявлять свою активность при пробуждении животного. На основании этого предположения дальнейшее тестирование фракций было решено проводить с использованием электрофизиологических методов.

Большая часть работы по тестированию фракций электрофизиологическими методами выполнена на предсердных волокнах (трабекулах) лягушки *Rana*

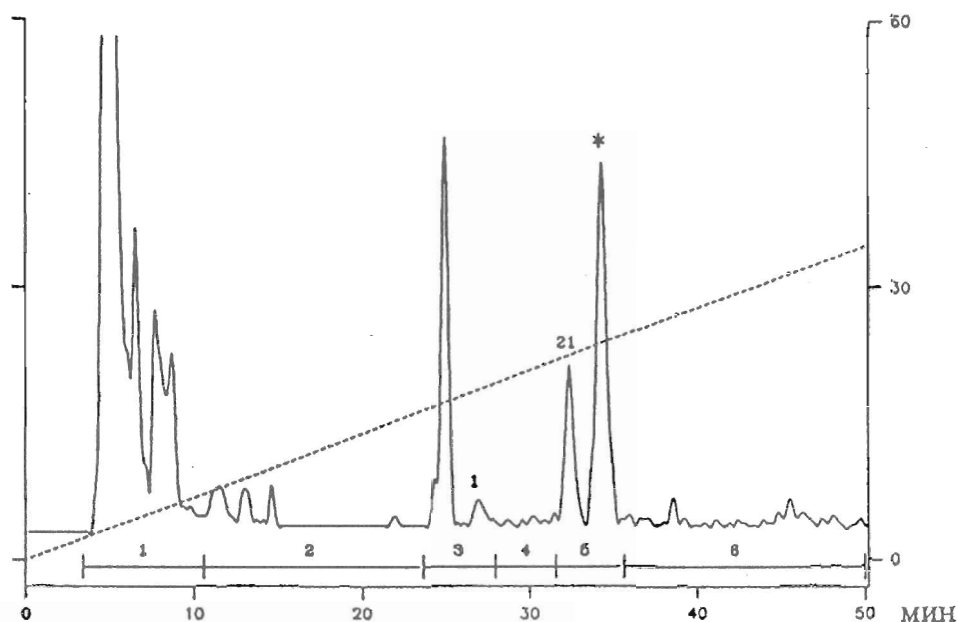
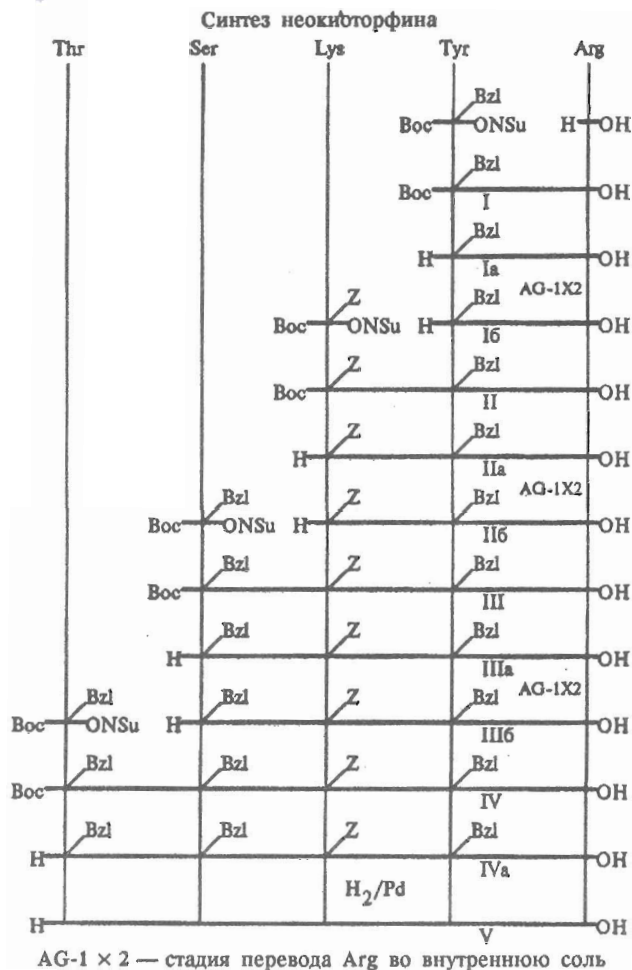


Рис. 3. Обращенно-фазовая ВЭЖХ 0,5 мг фракции II-3 (рис. 1) на колонке (4×250 мм) Nucleosil 7 C₁₈, уравновешенной в 0,1% TFA, в градиенте концентрации ацетонитрила (0 — 60% за 90 мин). Скорость элюции 0,5 мл/мин. 4 — фракция, обладающая способностью блокировать потенциалозависимые Ca²⁺-токи предсердных волокон лягушки (далее фракция II-3-4). Цифры над пиками соответствуют номерам пептидов в таблице. Звездочкой помечен пик вещества непептидной природы

ridibunda. Выбор объекта обусловлен следующими причинами: во-первых, эти земноводные при охлаждении впадают в состояние оцепенения; во-вторых, потенциал действия предсердных волокон у лягушки зависит от температуры, при которой она содержится. При температуре внешней среды порядка 18—22° С ПД предсердных волокон имеет хорошо выраженное плато, а после холодной адаптации (порядка 10 сут при 2° С) плато исчезает и ПД приобретает вид, характерный для ПД сердца зимоспящих животных; кроме того, потенциалозависимые Ca²⁺-токи у холодаадаптированных животных отсутствуют (в обоих случаях ПД и токи регистрировались при одинаковой температуре — 21—23° С). И наконец, трабекулы предсердия лягушки обладают рядом преимуществ по сравнению с миокардиальными препаратами из других видов животных: в клетках лягушки отсутствуют Ca²⁺-зависимый K⁺-ток и Ca²⁺-активируемый неспецифический ток [26, 27]; кроме того, Ca²⁺- и K⁺-токи при тестирующих потенциалах, не превышающих 200—300 мс, практически не перекрываются во времени [27], что позволяет регистрировать почти «чистый» Ca²⁺-ток без использования фармакологических K⁺-блокаторов. Таким образом, на клетках лягушки Ca²⁺-ток можно изучать в условиях, близких к «физиологическим».

Тестирование фракций I—III на волокнах предсердия лягушки показало, что в концентрации 10 мг/л наиболее выраженной способностью блокировать кальциевые токи обладает фракция II (фракция I вызывает незначительное изменение кальциевого тока, а фракция III способна блокировать кальциевые токи в значительно меньшей степени, чем фракция II). Через 10—15 мин действия фракции II ПД клеток принимает форму, характерную для ПД миокардиоцитов зимоспящих животных (рис. 2б): отсутствует плато, замедлена фаза реполяризации потенциала вблизи потенциала покоя. Практически во всех экспериментах незначительно падает амплитуда ПД (при недолгом действии фракции (10—15 мин), как правило, удается наблюдать полную или частичную обратимость этого эффекта



после отмывки в течение 15—20 мин). Потенциал покоя, регистрируемый в течение каждого эксперимента, не отличался от контрольного. Ca²⁺-Ток регистрировали после подавления Na⁺-тока (для подавления входящего натриевого тока использовали тетродотоксин в концентрации 5 · 10⁻⁷ М). Наблюдаемый пороговый потенциал возникновения Ca²⁺-тока около 30—35 мВ (длительность деполяризующей ступеньки 100 мс). Через 10 мин действия фракции более чем вдвое подавляет медленный входящий ток. Анализ K⁺-компоненты тока показывает, что уменьшение входящего тока в основном определяется подавлением Ca²⁺-компоненты. После 10-минутного действия эффект блокирования тока частично снимается после 10-минутной отмывки. Однако после 20 мин действия фракции в некоторых экспериментах (2 из 8) отмывка не дает заметного результата. Практически во всех экспериментах в присутствии фракции возрастает K⁺-ток. В отличие от Ca²⁺-тока его рост продолжается и после отмывки.

Фракция II-3 вызывала характерные изменения ПД и Ca²⁺-тока предсердных волокон, но с более выраженным эффектом действия, чем фракция II. При используемой в опытах концентрации (1 мг/л) после 5—10 мин действия фракции Ca²⁺-ток не удается восстановить (даже частично) при отмывке в течение 25—30 мин. В отличие от фракции II фракция II-3 при малых потенциалах уменьшает выходящие K⁺-токи, т. е. среди активных соединений пептидной фракции мозга

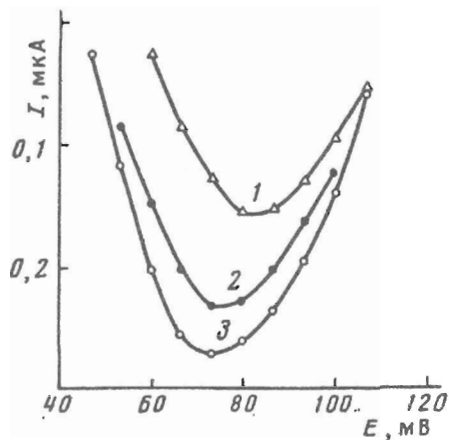


Рис. 4. Вольт-амперные характеристики потенциалозависимых Ca^{2+} -токов в трабекулах предсердия лягушки в контроле (1), после 10 мин действия неоксикторфина (2) и после 15 мин отмывки (3)

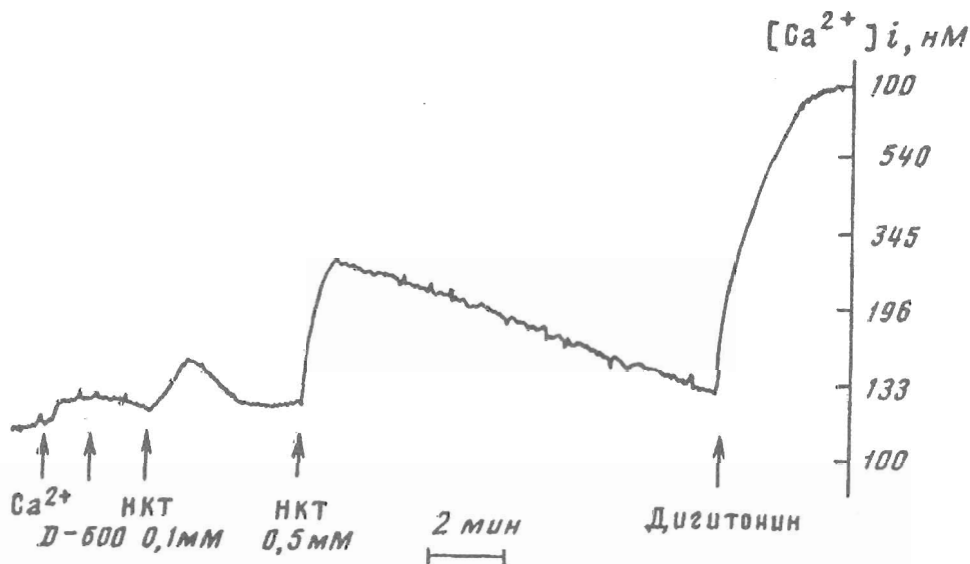


Рис. 5. Определение дозозависимого увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) неоксикторфином (НКТ) при помощи флуоресцентного метода. D-600 — блокатор Ca^{2+} -тока; дигитонин — ионофор. Стрелками указан момент аппликации веществ

зимоспящих животных есть соединения как активирующие, так и блокирующие суммарную компоненту K^+ -тока. Поскольку K^+ -ток формируется прохождением ионов K^+ через различные типы K^+ -каналов, то, вероятнее всего, во фракции содержатся два класса соединений: активаторы одного типа K^+ -каналов и блокаторы другого типа этих каналов.

Фракция II-3 была подвергнута дальнейшему разделению методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 3). В результате тестирования полученных фракций была локализована область веществ (см. рис. 3), обладающих способностью блокировать Ca^{2+} -токи, и были выделены дипептид Phe-Lys (1) и пентапептид Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg (21), которые, напротив, обратимо увеличивали Ca^{2+} -токи в этом тесте. Пентапептид по структуре был идентичен неоксикторфину, выделенному ранее японскими исследователями из мозга быка [28] и известному как слабый анальгетик.

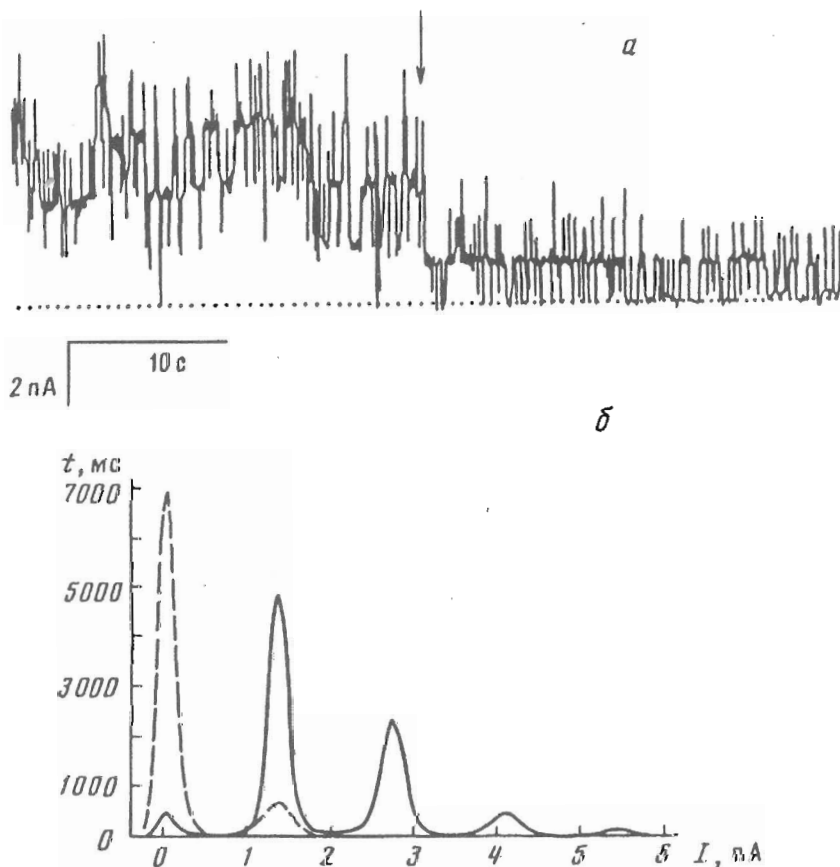


Рис. 6. Действие 10 мкмоль НКТ на АТР-чувствительный K^+ -канал. *a* — запись K^+ -тока от мембранного фрагмента изолированного кардиоцита крысы (inside-out-конфигурация). Пунктирная линия соответствует закрытому состоянию канала. Стрелкой указан момент начала аппликации НКТ. *б* — амплитудная гистограмма, построенная по данным, приведенным на рис. *a*. По оси ординат — время пребывания канала (ов) в открытом состоянии. Непрерывная линия — контроль, штриховая — действие НКТ. Множественность уровней проводимости обусловлена работой нескольких каналов, что подтверждается тестом на бинomialность распределения времен под каждым пиком гистограммы. (Сопротивление электрода-присоски 3 МОм, сопротивление контакта 30 МОм. Концентрация K^+ в камере 140 мМ, в пипетке 10 мМ. Фильтр: 1 кГц)

Необходимый для последующих исследований в препаративных количествах неокситорфин был синтезирован нами классическим методом синтеза пептидов в растворе по схеме 2 последовательным наращиванием цепи с С-конца методом N-оксисукцинимидных эфиров. Для блокирования боковых цепей Thr, Ser и Tyr использовали бензиловые эфиры, для N^α-функции Lys — бензилоксикарбонильную (Z), а для N^ε-функции — *трет*-бутилоксикарбонильную (Boc) группу. Защиту гуанидиновой и карбоксильной групп Arg осуществляли посредством внутримолекулярного солеобразования [29]. Boc-защитные группы удалялись 70% CF_3COOH в CH_2COOH . Полученный пептид (V) был очищен методом препаративной ВЭЖХ, его структура подтверждена секвенированием и методом ЯМР-спектроскопии. Время удерживания синтетического неокситорфина (V) на колонке Nucleosil 7 C₁₈ соответствовало времени удерживания природного пептида (21) в условиях его выделения (рис. 3).

Тестирование пентапептида (V) показало, что в концентрации 10^{-6} М он обратимо увеличивал потенциалозависимые Ca^{2+} -токи предсердных волокон (рис. 4). Кроме того, было обнаружено, что синтетический неокситорфин увеличивал

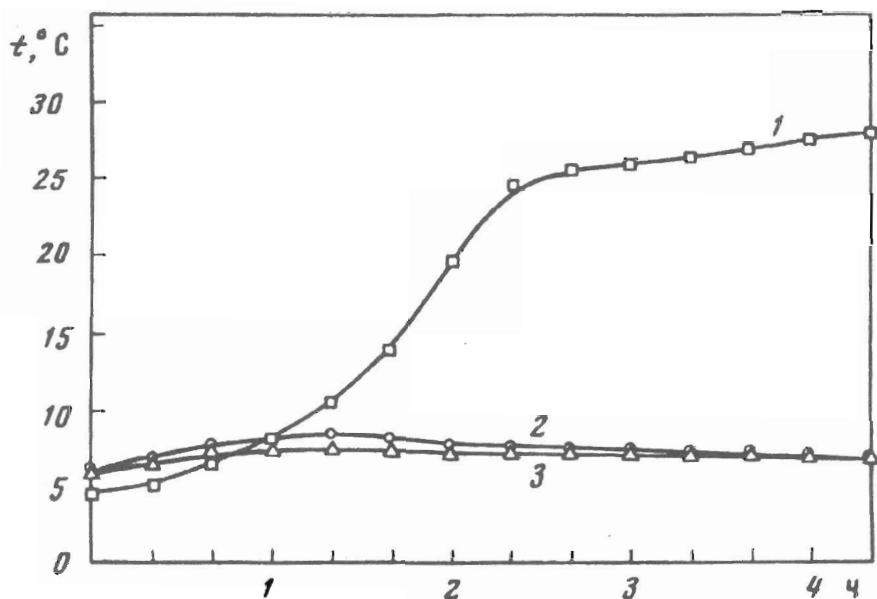


Рис. 7. Изменение температуры тела у гибернарующих сусликов после внутривнутрибрюшинного введения некиоторфина (V) после первого дня спячки (1). 2 — инъекция аминокислотного «коктейля» (Thg, Ser, Lys, Tyr, Arg); 3 — «ложный укол». Инъекции проводили в 0,5 мл физиологического раствора при температуре окружающей среды 3—4° С

внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в кардиоцитах желудочка. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} наблюдалось также и в присутствии блокатора кальциевых каналов D-600 (рис. 5). Рост концентрации Ca^{2+} осуществлялся, вероятнее всего, за счет их мобилизации из внутриклеточных депо, поскольку увеличение наблюдали и в отсутствие внешнего Ca^{2+} . Исследование влияния некиоторфина на K^+ -ток кардиоцитов крысы показало, что в концентрации 10^{-5} М он увеличивает вероятность пребывания АТР-зависимых K^+ -каналов в закрытом состоянии (рис. 6). Полученные результаты говорят о способности некиоторфина активизировать работу сердца на клеточном уровне.

Изучение влияния некиоторфина *in vivo* проводилось на находящихся в состоянии спячки сусликах. При этом регистрировали частоту сердечных сокращений, температуру тела и уровень потребления кислорода. Исследование показало, что внутривнутрибрюшинное введение пептида в дозе 1,5 мг/кг резко увеличивало сердечный ритм: от 7—12 до 170 ударов/мин через 90 мин и до 420 ударов/мин к 120-й мин. В последующие 2—3 ч сердечный ритм постепенно возвращался к норме активного животного. Изменение деятельности сердца значительно опережало рост температуры тела, которая достигала субнормальных значений спустя 3 ч после инъекции (рис. 7). Уровень потребления кислорода, составлявший в состоянии спячки около 1% от этого показателя активного животного, также резко возрастал в результате инъекции некиоторфина, превышая в момент достижения максимальной скорости повышения температуры тела животного уровень нормотермии более чем в 5 раз (обычно не более чем в 2,5—3 раза). После повышения температуры тела животного выше 20° С и по мере достижения нормотермии потребление кислорода постепенно уменьшалось до уровня бодрствующего животного. Эффективность действия некиоторфина зависела от состояния животного. Внутривнутрибрюшинная инъекция пептида сусликам на стадии вхождения в спячку и в первый день баута в дозах 1,5 и даже 4 мг/кг не оказывала пробуждающего эффекта, а лишь кратковременно задерживала снижение частоты сердечных сокращений и температуры [30].

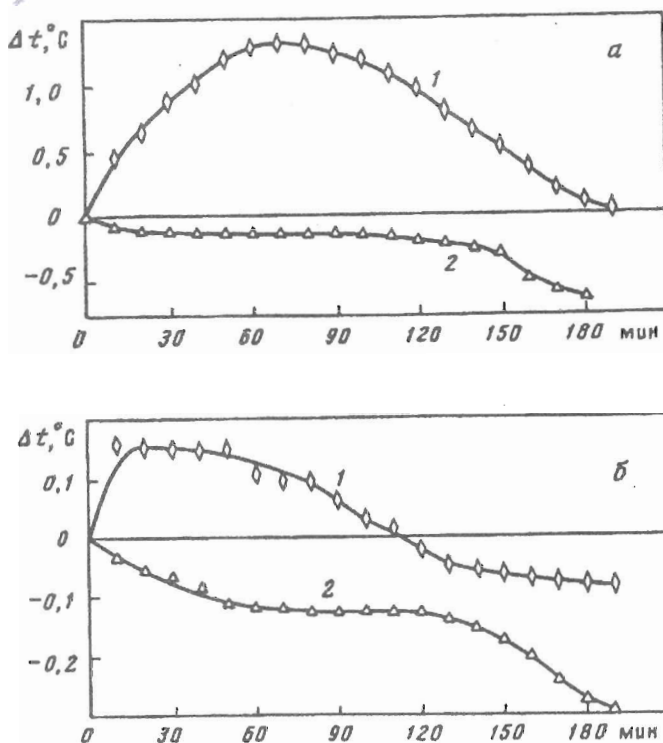


Рис. 8. Изменение температуры кожи хвоста (а) и в прямой кишке (б) крыс в термонеutralной среде под действием некиоторфина (1) и в контрольном эксперименте (2)

С целью исследования терморегуляторной активности некиоторфина проведено 4 серии экспериментов на крысах. Эксперименты проводили в термостатируемой камере при различных температурных режимах, каждый из которых характеризуется определенным функциональным состоянием системы терморегуляции:

1) в термонеutralной среде (температура камеры 26—28° С), когда процессы теплопродукции и теплоотдачи находятся в динамическом равновесии и уровень основного обмена не зависит от внешней температуры;

2) в холодной среде (температура камеры 4—6° С), когда процессы теплопродукции доминируют над процессами теплоотдачи;

3) в жаркой среде (31—32° С), когда процессы теплоотдачи доминируют над процессами теплопродукции;

4) при резком повышении температуры камеры от комнатной до 36° С со скоростью 10°/с, когда для поддержания постоянной температуры тела в ответ на тепловое воздействие развиваются компенсаторные сосудистые реакции, направленные на сброс избыточного тепла.

Результаты проведенных исследований показали, что при внутривентральном и интраназальном введениях (в дозе 500 и 150 мкг/кг соответственно) в холодной и жаркой средах, т. е. в условиях максимального напряжения компенсаторных механизмов, некиоторфин не оказывал заметного воздействия. В термонеutralной среде введение пептида вызывало увеличение температуры тела с последующим развитием компенсаторной реакции вазодилатации, приводившей через 40 мин после введения к снижению температуры тела до исходного уровня и ниже (рис. 8). В условиях нестационарных тепловых воздействий некиоторфин вызывал торможение развития компенсаторной реакции вазодилатации на перегрев. Анализ полученных данных позволяет предположить, что некиоторфин в термонеutralной среде и в условиях нестационарных тепловых воздействий вызывает изменение температурной чувствительности центральных или перифе-

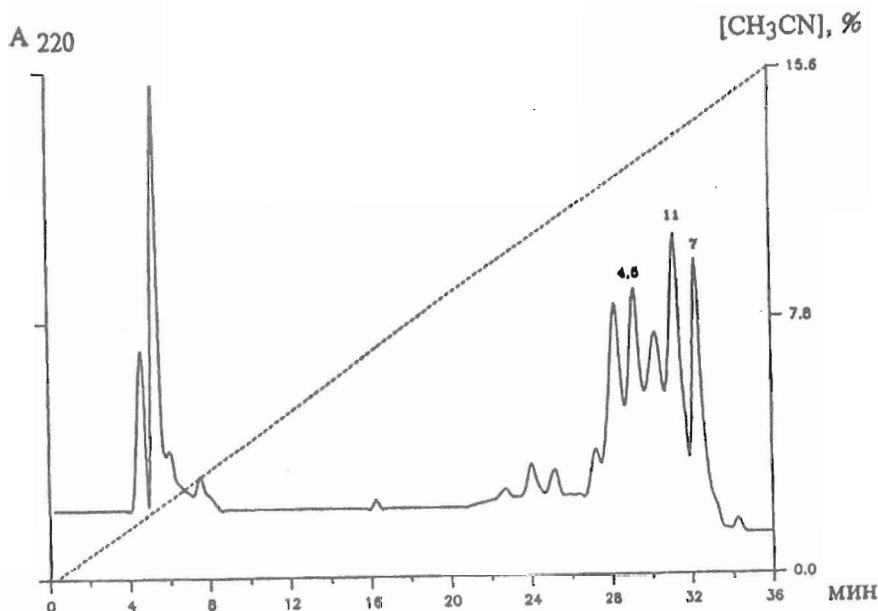


Рис. 9. Обращенно-фазовая ВЭЖХ фракции П-3-4 (рис. 3) на колонке (4 × 250 мм) Nucleosil 7 C₁₈, уравновешенной в 0,1% TFA, в градиенте концентрации ацетонитрила (0 — 39% за 90 мин). Скорость элюции 0,5 мл/мин. Цифры над хроматографическими пиками соответствуют номерам пептидов в таблице. Пики, не помеченные цифрами, представляют собой смесь коротких пептидов либо не поддаются секвенированию

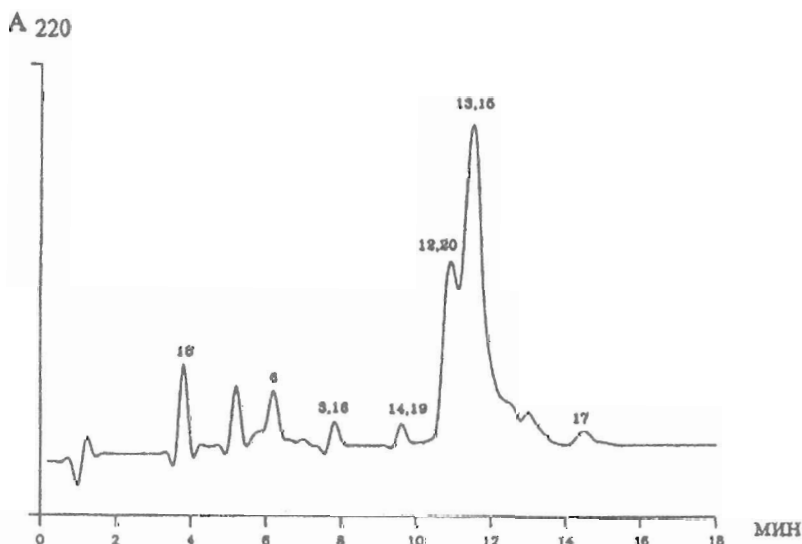


Рис. 10. Ионообменная ВЭЖХ фракции П-3-4 (рис. 3) на колонке (7,5 × 150 мм) Ultragel TSK-gel 535 CM в 50% метаноле в 0,05 М ацетате триэтиламония, pH 3,3. Скорость элюции 1 мл/мин. Цифры над пиками соответствуют номерам пептидов в таблице

рических термосенсоров, сдвигая регуляцию физиологического термостата на другой уровень температурной чувствительности.

Результаты исследований биологической активности неокиторфина дают основание утверждать, что этот пептид обладает способностью выводить животное из состояния зимней спячки. Такое действие неокиторфина, вероятно, связано со стимуляцией работы сердца в условиях пониженной активности последнего. Это предположение подтверждает факт выделения небольшого количества эндо-

Структуры пептидов, выделенных из фракции II-3 уксуснокислого экстракта мозга зимоспящих сусликов

Номер	Структура пептида	Фракция	Номер	Структура пептида	Фракция
1	FK ^b	II-3-3	15	LT	II-3-4
2	AL ^c	II-3-4	16	SM	II-3-4
3	DY ^a	II-3-4	17	AGG	II-3-4
4	FI ^c	II-3-4	18	VGG	II-3-4
5	FP ^c	II-3-4	19	LG	II-3-4
6	VG ^c	II-3-4	20	MG	II-3-4
7	VD ^c	II-3-4	21	TSKYR ^{b,d}	II-3-5
8	TSKY	II-3-4	22	TS	II-3-6
9	QSKY	II-3-4	23	VLSPA ^o	II-3-6
10	SKYR	II-3-4	24	VVAOVANA ^f	II-3-6
11	RLL	II-3-4	25	VHLSGDGEKNAISTAWG ^g	II-3-6
12	LS	II-3-4	26	VHLSGDGEKNAISTA ^h	II-3-6
13	LR	II-3-4	27	INDPF ⁱ	II-3-6
14	IQ	II-3-4	28	IVIVMA ^k	II-3-6

- a - блокатор кальциевого тока предсердных волокон лягушки,
b - активатор кальциевого тока предсердных волокон лягушки (неокиоторфин),
c - не оказывает влияния на кальциевый ток предсердных волокон лягушки,
d - фрагмент 137-141 α-цепи гемоглобина (C. citellus),
e - фрагмент 1-5 α-цепи гемоглобина (C. citellus),
f - фрагмент 133-140 β-цепи гемоглобина (C. citellus),
g - фрагмент 1-16 β-цепи гемоглобина (C. citellus),
h - фрагмент 1-14 β-цепи гемоглобина (C. citellus),
i - фрагмент 30-34 глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (крыса),
k - фрагмент 110-115 β-цепи гемоглобина (C. citellus).

генного тепла, наблюдаемое на крысах в термонеutralных условиях среды. На основании результатов комплекса исследований можно предположить, что неокиоторфин является эндогенным регулятором процесса гибернации. Полученные данные подтверждают гипотезу о роли Ca²⁺-токов сердца в цирканнуальных ритмах зимнеящих животных.

После наработки фракции II-3-4, обладающей способностью блокировать потенциалозависимый Ca²⁺-ток, и разделения ее обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ (рис. 9 и 10) были выделены и установлены первичные структуры ряда пептидов (2—20, см. таблицу). Синтетические аналоги некоторых из них: Asp-Tyr (синтезирован нами), Ala-Leu, Phe-Ile, Phe-Pro, Val-Gly и Val-Asp (фирм BACHEM Biochemica GmbH (ФРГ) и Reanal (Венгрия)) были исследованы в электрофизиологическом тесте, выявившем способность блокировать потенциалозависимый Ca²⁺-ток предсердных волокон лягушки у Asp-Tyr (рис. 11). Насыщающая концентрация дипептида была 10⁻⁵ М, при 10⁻⁶ М ток блокировался наполовину. Кроме того, отметим, что при проведении экспериментов по определению зависимости указанного эффекта от дозы пептида было обнаружено значительное увеличение выходящего тока при действии пептида (рис. 12б).

Учитывая, что N-концевым фрагментом природного октапептида холецистокинина является дипептид Asp-Tyr, остаток Tyr которого сульфатирован, а также тот факт, что сульфатирование этого остатка Tyr весьма существенно для биологической активности октапептида [31], нами был синтезирован сульфатированный аналог выделенного дипептида — Asp-Tyr(SO₃H). Сульфатирование ди-

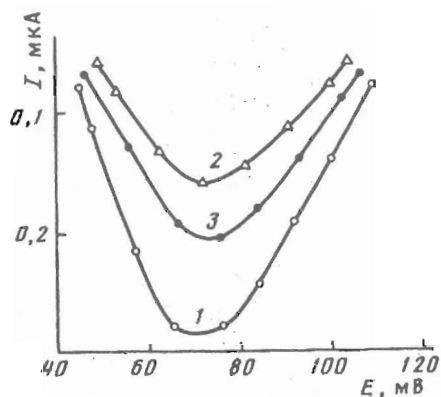


Рис. 11. Блокирование потенциалозависимых Ca^{2+} -токов предсердных волокон лягушки *Rana ridibunda* пептидом Asp-Туг: 1 — контроль; 2 — действие пептида (1 мкМ); 3 — отмывка.

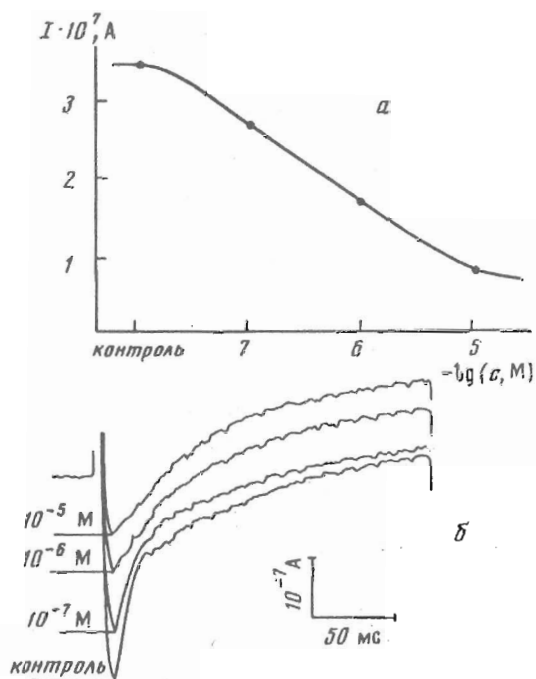


Рис. 12. Влияние Asp-Туг на ионные токи предсердных волокон лягушки *R. ridibunda*: а — кривая зависимости эффекта действия пептида на Ca^{2+} -токи от концентрации; б — запись суммарных токов при различных концентрациях пептида.

пептида проводили по методике, описанной М. А. Ondetti [31]. Действие сульфатированного аналога более специфично: в его присутствии не изменяется выходящий ток (рис. 13б). Кроме того, анализ кривой зависимости эффекта действия сульфатированного дипептида от концентрации (рис. 13а) показывает, что в отличие от несulfатированного аналога (рис. 12а) он блокирует не весь Ca^{2+} -ток. Мы не проводили специальных исследований, но можно высказать предположение, что сульфатированный дипептид блокирует Ca^{2+} -каналы только L-типа. Косвенным доводом в пользу такого утверждения может быть тот факт, что во всех экспериментах доля заблокированного тока составляла значительную часть от исходного, приблизительно соответствующую соотношению L- и T-типов Ca^{2+} -каналов на предсердных волокнах лягушки. Его константа полуэффекта равна $5 \cdot 10^{-7}$ М, т. е. сульфатированный дипептид более эффективен, чем несulfатированный.

Необходимо отметить, что достигаемая при разделении фракции II-3 степень очистки не коррелирует с увеличением искомой активности, наблюдаемой во фракции II-3-4, что позволяет ожидать присутствие в экстракте других активных соединений. По этой причине нами было решено более детально исследовать пептидный состав фракции II-3 и наряду с фракцией II-3-4 нами была наработана и разделена фракция II-3-6 (рис. 14), из которой были выделены еще несколько пептидов и установлены их первичные структуры (22—28, таблица). Исследования биологической активности пептидов, выделенных из фракции II-3-4, а также поиск новых биологически активных пептидов в исследуемом экстракте в настоящее время продолжаются, результаты этих исследований будут рассмотрены в последующих сообщениях.

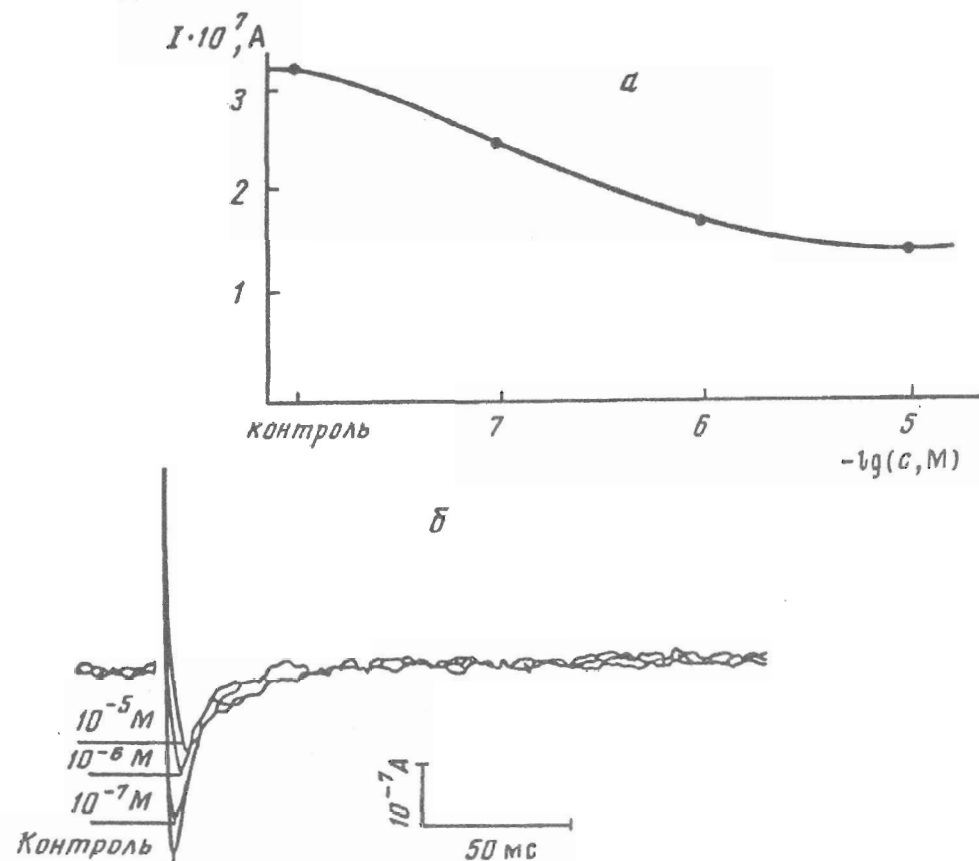


Рис. 13. Влияние Asp-Тур(SO₃H) на ионные токи предсердных волокон лягушки *R. ridibunda*: а — кривая зависимости эффекта действия пептида на Ca²⁺-токи от концентрации; б — запись суммарных токов при различных концентрациях пептида

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: Blue dextran 2000 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), DSIP (M 849) (синтезирован нами), Тур, D-600 (Sigma, США), тетродотоксин (Serva, ФРГ).

Для гомогенизации мозга использовали ножевой гомогенизатор Type 324 (Польша). Экстракцию проводили 1 М уксусной кислотой с добавлением 1 мМ EDTA (BDH, Англия), 1 мМ дитиотреита (Serva, ФРГ), 1 мМ PMSF (Fluka) и 100 мкл октанола (в качестве пеногасителя). Центрифугирование осуществляли на центрифуге фирмы Beckman (США), ротор JA 10. Для ультрафильтрации использовали ультрафильтрационную ячейку Amicon model 402 (Amicon, США), фильтры Amicon PM-10 и UM-2 диаметром 76 мм. Гель-фильтрацию проводили на сефадексе G-25 f (Pharmacia, Швеция). В качестве детектирующего прибора использовали Uvicord II (ЛКВ, Швеция). Высокоэффективную обращенно-фазовую хроматографию осуществляли на колонке Nucleosil 7 C₁₈ (Macherey Nagel, ФРГ) на приборе Du Pont 8800 (Франция). Высокоэффективную ионообменную хроматографию проводили на колонке Ultragac TSK 535 CM (ЛКВ, Швеция). Первичную структуру пептидов определяли на автоматическом секвенаторе 477A (ABI, США).

Получение экстракта мозга. Отловленные в августе животные (якутский длиннохвостый суслик *Citellus undulatus*) содержались в виварии. В ноябре клетки с сусликами переносили в тихое и темное помещение, где животных содержали при 5—8° С. В конце ноября большая часть животных впадала в спячку. В

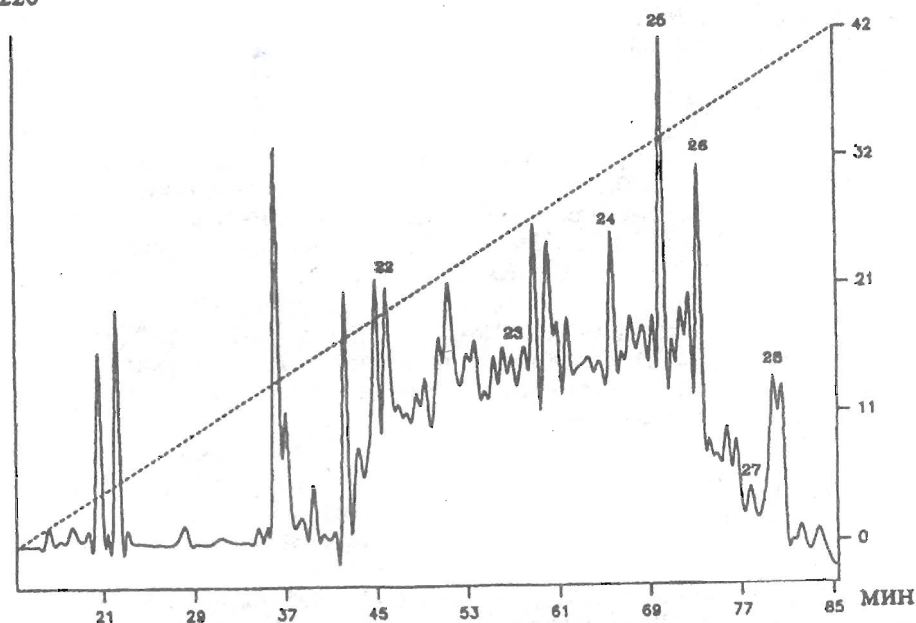


Рис. 14. Обращенно-фазовая ВЭЖХ 5 мг фракции П-3-6 (рис. 3) на колонке (10 × 600 мм) Nucleosil 7 C₁₈, уравновешенной в 0,1% ТФА, в градиенте концентрации ацетонитрила 0—60% за 90 мин. Скорость элюции 2 мл/мин. Цифры над пиками соответствуют номерам пептидов в таблице

январе гибернирующие животные умерщвлялись без пробуждения методом декапитации, мозг извлекали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70° С. Гомогенизацию мозга проводили в 1 М уксусной кислоте (20 мл на мозг одного животного) в течение 3 мин при 14 000 об/мин в присутствии EDTA (1 мМ), PMSF (1 мМ) и дитиоэритрита (1 мМ). Гомогенат центрифугировали 50 мин при 12 000g, супернатант отделяли, осадок регомогенизировали в таком же объеме 1 М уксусной кислоты, прогревали 15 мин на кипящей водяной бане и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатанты объединяли и фильтровали последовательно через ультрафильтрационные мембраны Amicon PM-10 (предел эксклюзии 10 кДа) и Amicon UM-2 (предел эксклюзии 1 кДа).

Синтез пептидов. Для синтеза пептидов использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия); индивидуальность полученных соединений проверяли методом ТСХ на хроматографических пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1 (А); хлороформ — метанол — уксусная кислота, 6 : 1 : 1 (Б); *n*-бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин, 2 : 1 : 1 : 1 (В), 3 : 1 : 1 : 1 (Г). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью хлор-бензидаина. Гидрирование пептида осуществляли в присутствии палладиевой черни (катализатора брали 10% от веса пептида). Аминокислотные анализы кислотных гидролизатов пептидов (6 н. HCl, 24 ч, 110° С) проводили на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Удельное оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer (США). Молекулярную массу веществ определяли с помощью FAB-масс-спектрометрии на приборе Kratos MS50TS (Великобритания).

Синтез неокитрофина

1. *Вос-Тур(Bzl)-Arg (I)*. К охлажденной суспензии 3,6 г (20,5 ммоль) Arg в 15 мл DMF добавляли 9,6 г (20,5 ммоль) *Вос-Тур(Bzl)-ONSu*, перемешивали 3 ч при 0° С, оставляли при 20° С на 16 ч, упаривали, растворяли в этилацетате

и осаждали диэтиловым эфиром (дважды). Выход пептида 96%. R_f 0,46 (А), 0,22 (Б).

2. *Woc-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Arg (II)*. 5,27 г (10 ммоль) дипептида (I) растворяли в 70% TFA в уксусной кислоте, выдерживали 30 мин при 20° С, упаривали, сушили в вакууме над КОН. Выход трифторацетата (Ia) 6,28 г (96%). Трифторацетат (Ia) обрабатывали 10 экв. смолы AG-1X2 (Biorad, США) в OH⁻-форме в 70% метаноле, переводя C-концевой Arg во внутреннюю соль, промывали смолу метанолом, растворитель упаривали, продукт сушили в вакууме над КОН. Выход H-Tyr(Bzl)-Arg (Iб) 3,85 г (94%). Реакцию конденсации Woc-Lys(Z)-ONSu с дипептидом (Iб) осуществляли по методике, описанной в опыте 1. Woc-Lys(Z)-ONSu брали в 10% избытке. Пептид (II) выделяли осаждением водой из DMF (дважды). Выход 86%. R_f 0,60 (А), 0,32 (Б).

3. *Woc-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Arg (III)*. Трипептид (II) обрабатывали как в опыте 2. Выход трифторацетата (IIa) 95%. Выход H-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Arg (IIб) 92%. Тетрапептид (III) синтезировали по методике, описанной в опыте 1, и выделяли осаждением диэтиловым эфиром из этилацетата. Выход пептида (III) 89,9%. R_f 0,96 (А), 0,37 (Б).

4. *Woc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Arg (IV)*. Тетрапептид (III) обрабатывали как в опыте 2. Выход трифторацетата (IIIa) 93%. Выход H-Lys(Z)-Tyr(Bzl)-Arg (IIб) 93%. Пентапептид (IV) синтезировали по методике, описанной в опыте 1, и выделяли осаждением этилацетата из метанола (дважды). Выход пептида (IV) 77%. R_f 0,75 (А), 0,55 (Б).

5. *Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg (V)*. Пентапептид (IV) обрабатывали 70% TFA в уксусной кислоте как в опыте 2, упаривали, трифторацетат (IVa) растворяли в метаноле и гидрировали в присутствии палладиевой черни. Катализатор удаляли фильтрованием, метанол упаривали в вакууме, а остаток растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и наносили на колонку с сефадексом G-15. Выход пентапептида (содержание примесей ~ 25%) (V) 86%. Очистку пептида методом препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили на колонке (25 × 250 мм) Silasorb 7/C18 («Хроматосервис», Россия) (градиент — 0 — 21% MeOH за 30 мин в присутствии 0,1% TFA, скорость элюции 8 мл/мин, детекция при 280 нм). Общий выход 63%. Степень чистоты пептида (98%) подтверждалась аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil 7 C₁₈ (Macherey Nagel, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила. Аминокислотный анализ: Thr 1,0 (1); Ser 1,1 (1), Lys 1,0 (1), Tyr 1,1 (1), Arg 0,9 (1). Масс-спектр [MН⁺] 655. [α]_D - 26,4° (с 1,15; 3% AcOH). Литературные данные [32]: [α]_D - 21,7° (с 1,2; 3% AcOH). R_f 0,46 (В), 0,23 (Г).

Синтез Asp-Tyr

1. *Woc-Asp(OBu)-Tyr*. 1,13 г (13,4 ммоль) NaHCO₃ растворяли в 20 мл воды и к полученному раствору добавляли 1,21 г (6,7 ммоль) Tyr, 20 мл диоксана и 2,16 г (5,59 ммоль) Woc-Asp(OBu)-ONSu в 10 мл диоксана. Реакционную смесь оставляли при перемешивании на ночь, затем упаривали, остаток растворяли в 500 мл смеси этилацетат — 10% лимонная кислота, органический слой отделяли, промывали 50 мл насыщенного раствора NaCl и дважды осаждали дипептид диэтиловым эфиром. Выход пептида 94%. R_f 0,84 (А), 0,50 (Б).

2. *Asp-Tyr*. 2,26 г (5,0 ммоль) полученного выше защищенного дипептида растворяли в 70% TFA в уксусной кислоте, выдерживали 30 мин при 20° С, упаривали, сушили в вакууме над КОН. Выход трифторацетата Asp-Tyr 1,96 г (96%). R_f 0,35 (А), 0,42 (Г). Дипептид растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и наносили на колонку с сефадексом G-15. Полученный продукт очищали методом препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ в условиях, аналогичных описанным в опыте 5 для неокиоторфина (V). Общий выход 94%. Степень чистоты пептида (98%) подтверждалась аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ в условиях, аналогичных для аналитической ВЭЖХ неокиоторфина (рис. 3). Аминокислотный анализ: Asp

1,0 (1); Туг 1,1 (1). Масс-спектр $[MH^+]$ 297. $[\alpha]_D$ 15,1° (с 0,36, вода), литературные данные [33]; $[\alpha]_D$ 15° (с 1, вода).

Синтез Asp-Туг(SO₃H). 100 мг (0,24 ммоль) трифторацетата Asp-Туг растворяли в 8 мл охлажденной до -10° С концентрированной серной кислоты и перемешивали при -10° С (сухой лед — ацетон) 20 мин. Реакционную смесь обрабатывали согласно методике [31]. Asp-Туг(SO₃H) выделяли ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-сефадексом А-25 в градиенте концентрации NH₄HCO₃ (рН 7,5) 0,1 — 1 М (общий объем 600 мл). Выход сульфатированного дипептида 15,7 мг (16%). Аминокислотный анализ: Asp 1,0 (1); Туг 1,0 (1). Масс-спектр: $[MH^+]$ 377. $[\alpha]_D$ 13,3° (с 0,15; 3% АсОН).

Регистрация кальциевого тока. Для электрофизиологических тестов использовался нормальный раствор Рингера, содержащий следующие компоненты (мМ): NaCl — 100; KCl — 2,5; MgSO₄ — 1,25; CaCl₂ — 2; NaH₂PO₄ — 1,2; глюкоза — 5; HEPES — 10. рН доводили раствором NaOH до 7,4—7,5 (в растворе такого состава при его непрерывной оксигенации можно устойчиво регистрировать кальциевый ток в течение 2—3 ч). Входящий натриевый ток блокировали 0,5 мкМ тетродотоксином.

Для контроля ПД использовали аспаратсодержащий деполаризующий раствор [34, 35]. В нем содержались (мМ): однозамещенный аспарат калия — 140; NaCl — 8; CaCl₂ — 2,5; MgSO₄ — 1,25; NaOH — 7; NaHCO₃ — 1,2; KH₂PO₄ — 1,2; глюкоза — 2,5; рН 7,4—7,5. На вольт-амперных характеристиках тока указывается мембранный потенциал относительно потенциала покоя клеток в момент тестирующего воздействия.

Препараты предсердных волокон лягушки диаметром 0,1—0,2 мм и длиной 4—5 мм помещали в рабочую камеру через 20—30 мин после выделения, когда заканчивались процессы заживления и восстанавливалось сокращение трабекул. Перед началом измерения препараты адаптировали до полной стабилизации ПД, стимулируя их импульсами длительностью 5 мс и частотой 1 Гц в течение 20—30 мин. Ионные токи регистрировали по методу фиксации потенциала в двойном сахарозном мостике [36].

Экспериментальная камера из оргстекла имела следующие характеристики: ширина центрального измерительного канала 0,25 мм, ширина сахарозных каналов 0,4 мм, толщина разделительных стенок 0,2 мм. Трабекулу укладывали сверху поперек каналов. Для улучшения изоляции на верхние торцы разделительных стенок тонким слоем наносили вазелиновую смазку.

В качестве источника сигналов электронной схемы фиксации трансмембранной разности потенциалов использовался аналоговый выход ЭВМ «Искра-226», которая управляла также и самим процессом измерений в соответствии с условиями, задаваемыми с помощью диалоговой программы. Результаты измерений записывались на гибкий диск с последующим выводом их на графопостроитель Н-306. Численные значения основных параметров ионных токов выводили на печатающее устройство. Среднюю величину трансмембранной разности потенциалов клеток, образующих рабочий участок препарата, регистрировали с помощью двух внеклеточных электродов, один из которых помещали в рабочем отсеке вблизи поверх препарата, а другой — в одном из боковых отсеков измерительной ячейки.

Исследование пробуждающего эффекта неокиоторфина проводили на 10 гибернирующих сусликах *Citellus undulatus* в декабре — феврале. Частоту сердечных сокращений и температуру тела определяли телеметрически с помощью радиодатчиков, вживленных сусликам за 2—3 недели до экспериментов. Потребление кислорода измеряли с помощью анализатора кислорода КА-1 (кооператив «Пульс», Новосибирск; точность измерения 2,5%). Введение неокиоторфина осуществляли внутривнутрибрюшинно в дозе 1,5 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора. Контролем служило введение «коктейля» соответствующих аминокислот (1 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора, внутривнутрибрюшинно), а также физиологического раствора. Достоверность результатов оценивалась по критерию χ^2 .

Тестирование терморегуляторной активности неокиоторфина. Объектом исследования служили самцы нелинейных белых крыс массой 180—250 мг. Неокиоторфин вводили интраназально и внутривенно в виде водного раствора в дозе 150 и 500 мкг/кг веса животного соответственно. Контрольным животным инъецировали воду в эквивалентных количествах.

Во время эксперимента крысы находились в термостатируемой камере при определенном температурном режиме: 1) 26—28; 2) 4—6; 3) 31—32° С; 4) в условиях резкого повышения температуры камеры от 26 до 36° С со скоростью 10°/с. Непрерывную регистрацию температуры воздуха в камере, температуры в прямой кишке (на глубине 6 см) и кожи хвоста (являющегося у крыс специфическим органом теплообмена) осуществляли при помощи медно-константановых термопар. В одном опыте одновременно находилось 10 животных, 5 из которых — контрольные. Животные использовались однократно. Пептид вводили после предварительной часовой адаптации животных к условиям эксперимента. Всего было проведено 240 экспериментов. Результаты опытов обрабатывались статистически с использованием непараметрического критерия Вилкоксона — Манна — Уитни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyman C. P., Chatfield P. O. // *Physiol. Rev.* 1955. V. 35. P. 403—425.
2. Johanson B. W. // *Cardiology.* 1963. V. 43. P. 158—169.
3. Lyman C. P. // *Amer. J. Physiol.* 1958. V. 194. P. 407—420.
4. Wang L. C. H. // *Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis/Eds L. C. H. Wang, J. W. Hudson.* N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 109—145.
5. Swan H. // *Arch. Surg. Chicago.* 1963. V. 87. P. 715—716.
6. Swan H., Jenkins D., Knox K. // *Nature.* 1968. V. 217. P. 671.
7. Dawe A. R., Spurrier W. A. // *Science.* 1969. V. 163. P. 298—299.
8. Swan H., Schatte C. // *Science.* 1977. V. 195. P. 84—85.
9. Swan H., Reinhard F. G., Caprio D. L., Schatte C. L. // *Cryobiology.* 1981. V. 18. P. 598—602.
10. Reinhard F. G. // *Acta Universitatis Carolinae — Biologica* 1979. 1981. P. 275—276.
11. Игнатьев Д. А., Колаева С. Г., Михалева И. И., Крамарова Л. И., Свириев В. И., Польшкина О. В. // *Механизмы зимней спячки.* Научный центр биологических исследований АН СССР. Пушкино, 1987. С. 106—118.
12. Vaskovsky B. V., Ivanov V. T., Mikhaleva I. I., Kolaeva S. G., Kokoz Yu. M., Svieryaev V. I., Ziganshin R. H., Sukhova G. S., Ignatiev D. A. // *Peptides. Chemistry, Structure and Biology/Eds E. River, G. R. Marshall.* Escom. Leiden, 1990. P. 302—304.
13. Mikhaleva I. I., Svieryaev V. I., Vaskovsky B. V., Ziganshin R. H., Ivanov V. T., Kokoz Yu. M., Povzun A. A., Kolaeva S. G. // *J. Cell. Biochem. Suppl.* 14C. 1990. P. 244.
14. Иванов В. Т., Карелин А. А., Михалева И. И., Васильковский Б. В., Свириев В. И., Назимов И. В. // *Биоорг. химия.* 1992. Т. 18. № 10—11. С. 1271—1311.
15. Svieryaev V. I., Vaskovsky B. V., Ziganshin R. H., Mikhaleva I. I., Ivanov V. T., Kokoz Yu. M., Povzun A. A., Alekseev A. E., Sukhova G. S. // *Proc. of the 21 Eur. Peptide Sympos., Peptides 1990/Eds E. Giralt, D. Andreu.* Escom. Leiden, 1991. P. 751—752.
16. Емельянова Т. Г., Усенко А. Б., Ушаков В. В., Кононова Л. В., Михалева И. И. // *Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов.* Пушкино, 1990. С. 54.
17. Сухова Г. С., Игнатьев Д. А., Ахременко А. К., Левашова В. Г., Михалева И. И., Свириев В. И., Ануфриев А. И., Зиганшин Р. Х., Крамарова Л. И., Гутцов Д. Ю., Колаева С. Г., Ашмарин И. П. // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 1990. Т. 26. № 5. С. 623—629.
18. Игнатьев Д. А., Воробьев В. В., Ярков А. В., Свириев В. И. // *Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний.* Пушкино, 1992. Т. II. С. 117—124.
19. Сухова Г. С., Левашова В. Г., Игнатьев Д. А., Михалева И. И., Крамарова Л. И., Свириев В. И., Сухов В. П., Зиганшин Р. Х., Колаева С. Г., Ашмарин И. П. // *Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний.* Пушкино, 1992. Т. II. С. 125—132.
20. Емельянова Т. Г., Усенко А. Б., Ушаков В. В., Кононова Л. В., Михалева И. И. // *Эколого-физиологические характеристики природных гипометаболических состояний.* Пушкино, 1992. Т. II. С. 132—137.

21. *Mikhaleva I. I., Svieryaev V. I., Vaskovsky B. V., Ziganshin R. H., Ivanov V. T., Kokoz Yu. M., Povzun A. A., Alekseev A. E., Ignatiev D. I., Kolaeva S. G., Sukhova G. S.*//Chemistry of Peptides and Proteins. V. 5/6. Part A/ Eds D. Brandenburg, V. T. Ivanov, W. Voelter. DWI Reports 1993. V. 112A. P. 287—297.
22. *Mikhaleva I. I., Svieryaev V. I., Vaslovsky B. V., Ziganshin R. H., Ivanov V. T., Kokoz Yu. M., Povzun A. A., Alekseev A. E., Ignatiev D. I., Kruman I. M., Sukhova G. S., Emelyanova T. G.*// Chemistry of Peptides and Proteins. V. 5/6. Part A/Eds D. Brandenburg, V. T. Ivanov, W. Voelter. DWI Reports 1993. V. 112A. P. 299—308.
23. *Duker G., Sjouist P. O., Svensson O., Wohlfart B., Johansson B.*//Living in the Cold/Eds H. C. Heller, X. J. Musacchia, L. C. Wang. N. Y.: Elsevier, 1986. P. 565—572.
24. *Vaughan W. E. A.*//J. Clin. Pharmacol. 1984. V. 24. P. 129—147.
25. *Schlenker E. H., Smith G.*//Comp. Biochem. and Physiol. 1988. V. 90c. № 2. P. 465—469.
26. *Campble D. L., Giles W. R., Shibata E. F.*//J. Physiol. 1988. V. 403. P. 239—266.
27. *Hume J. R., Giles W. R., Robinson K., Shibata E. F.*//J. Gen. Physiol. 1986. V. 88. P. 777—798.
28. *Takagi H., Shiomu H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K.*//Life Sci. 1982. V. 31. P. 1733—1736.
29. *Овчинников М. В., Беспалова Ж. Д., Молокоедов А. С., Ревенко И. В., Сентов Н. Ф., Исакова О. Л., Титов М. И.*//Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 6. С. 759—767.
30. *Изнатъев Д. А., Сухова Г. С., Загнойко В. И., Сухов В. П., Свириев В. И.*//Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1992. Т. 28. № 4. С. 459—466.
31. *Ondetty M. A., Pluscec J., Sabo E. F., Sheehan J. T., Williams N.*//J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92: 1. P. 195—199.
32. *Kiso Y., Kitagawa K., Kawai N., Akita T., Takagi H., Amano H., Fukui K.*//FEBS Lett. 1983. V. 155. № 2. P. 281—284.
33. *Mazur R. H., Schlatter J. M., Goldkamp A. H.*//J. Amer. Chem. Soc. 1969. V. 91. P. 2684.
34. *Vaughan-Jones R. D.*//Intercellular pH. Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Functions/Eds R. Nuccitelli, D. W. Deamer. N. Y.: Alan R. Liss Inc., 1982. P. 239—252.
35. *Накипова О. В., Кокос Ю. М., Лазарев А. В., Крупенин В.*//Физиол. журн. СССР. 1988. Т. 74. № 3. С. 420—427.
36. *Rougier O., Vassort G., Stampfli R.*//Pflügers Arch. 1968. B. 301. S. 91—108.

Поступила в редакцию
16.III.1994

*R. H. Ziganshin, V. I. Svieryaev, B. V. Vaskovsky, I. I. Mikhaleva,
V. T. Ivanov, Yu. M. Kokoz*, A. E. Alekseev*, A. F. Korystova*,
G. S. Sukhova**, T. G. Emelyanova***, A. B. Usenko****

BIOACTIVE PEPTIDES ISOLATED FROM THE BRAIN OF HIBERNATING GROUND SQUIRREL

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of
Sciences, Pushchino, Moscow Region;*

***M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;*

****Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Key words: hibernation, bioactive peptides, neokytorphin.

More than 20 peptides have been isolated and sequenced from the brain of hibernating ground squirrel *Citellus undulatus*. Some of the isolated peptides were chemically synthesized and investigated for the spectrum of biological activity. One of the isolated peptides, neokytorphin (Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg), earlier known as a weak analgetic, is found to have a cardiotropic and thermoregulatory activity.

Neokyotorphin activates *in vitro* voltage-dependent calcium and blocks ATP-dependent potassium currents in the frog atrial fibres. Intraperitoneal injection of this peptide in hibernating ground squirrels speeds up the arousal of animals increasing sharply the heart rate and oxygen consumption. Intraperitoneal and intranasal administrations of neokyotorphin in rats raises body temperature in thermoneutral conditions (26—28° C) exerting no effects at low (4—6° C) and high (31—32° C) environmental temperatures. Another isolated peptide, Asp-Tyr, blocks the inward voltage-dependent calcium current in the frog atrial fibres and slightly increases the outward potassium current. Sulfated analogue of this dipeptide (aspartyl-O-sulfate-tyrosine) more effectively blocks the inward voltage-dependent calcium current in the frog atrial fibres and have no effects on the outward potassium current.