



УДК 577.152:34.042

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СЕМАКСА И СЕЛАНКА НА ЭНКЕФАЛИНДЕГРАДИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2001 г. Н. В. Кост[#], О. Ю. Соколов, М. В. Габаева, И. А. Гривенников*, Л. А. Андреева*, Н. Ф. Мясоедов*, А. А. Зозуля

НЦ психического здоровья РАМН, 113152, Москва, Загородное шоссе, 2/2;

* Институт молекулярной генетики РАН, 123182, г. Москва, пл. Акад. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 20.10.2000 г. Принята к печати 09.11.2000 г.

Показано дозозависимое ингибирующее действие синтетических гептапептидов, семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и селанка (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro), на энкефалиндеградирующие ферменты сыворотки крови. Ингибирующий эффект семакса (IC_{50} 10 мкМ) и селанка (IC_{50} 20 мкМ) более выражен по сравнению с пуромицином (IC_{50} более 1 мМ), бацитрацином и рядом других ингибиторов пептидаз. Кроме самих гептапептидов ингибирующей способностью обладали также их пентапептидные фрагменты; три-, тетра- и гексапептидные фрагменты такого действия не оказывали. Поскольку указанные ферменты участвуют в деградации не только энкефалинов, но и других регуляторных пептидов, можно предполагать, что один из механизмов биологического действия семакса и селанка связан именно с этой их ингибирующей способностью.

Ключевые слова: семакс; селанк; энкефалиназы, ингибиторы; регуляторные пептиды; опиоидная система.

ВВЕДЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению двух гептапептидов, семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и селанка (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro), синтезированных нами ранее на основе биологически активного фрагмента адренокортикотропного гормона (4–7) и тетрапептида тафтсина, соответственно, с добавлением последовательности Pro-Gly-Pro с С-конца пептидов для повышения их устойчивости [1, 2].

Оба гептапептида способны положительно влиять на состояние ЦНС. Так селанк оказывает выраженное антистрессорное, анксиолитическое действие и оптимизирует процессы обучения и памяти [2, 3]. Семакс обладает ноотропным действием, усиливает избирательное внимание в момент восприятия информации, улучшает консолидацию памяти, повышает способность к обучению, а также увеличивает адаптационные возможности мозга, повышая его устойчивость к стрессорным повреждениям, гипобарической и сосудистой гипоксии [4, 5]. Клинические исследования показали высокую эффективность семакса при терапии интеллектуально-мнестических расстройств и астенических состояний различного генеза [4], а также при лечении мозгового инсульта [6]. Исследования *in vitro* выявили способность семакса

увеличивать выживаемость нервных клеток в эмбриональных культурах мозга крыс [7]. Радиорецепторным методом обнаружены места специфического связывания семакса на мембранной фракции клеток головного мозга крыс [7].

Следует отметить, что некоторые биологические эффекты семакса и селанка сходны с эффектами, опосредуемыми эндогенными опиоидами. Так, семакс, как и опиоидные пептиды [8–10], проявляет свойства ростовых факторов в культуре нервной и других тканей, стимулирует процессы обучения и памяти, а селанк, подобно им [11], обладает анксиолитическим действием.

Поэтому мы предположили, что один из механизмов действия семакса и селанка связан с их влиянием на эндогенную опиоидную систему, которое может быть обусловлено как непосредственным взаимодействием пептидов с опиоидными рецепторами, так и их влиянием на активность ферментов процессинга или деградации эндогенных опиоидов. Высокая активность ферментов деградации эндогенных опиоидных пептидов определяет их быстрое расщепление, например, для энкефалинов время полужизни в крови составляет всего 1–2 мин [12].

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение способности семакса и селанка, а также их пептидных фрагментов влиять на

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 952-9090; факс: (095) 952-8940; e-mail: kost@rcmh.msk.ru).

скорость деградации лей-энкефалина ферментами сыворотки крови человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время установлено, что в сыворотке крови человека присутствует, как минимум, семь ферментов, гидролизующих энкефалины по различным пептидным связям [13]. Ранее нами показано [14], что кинетика реакции деградации [Leu]энкефалина в этой полиферментной системе удовлетворяет критериям псевдостационарности, скорость реакции линейно зависит от разведения сыворотки и остается постоянной на протяжении 30 мин инкубации. Поэтому способность исследуемых пептидов влиять на активность ферментов сыворотки крови оценивали по изменению накопления продуктов расщепления 0.15 мкМ [³H]Leu]энкефалина в течение 15 мин инкубации. Скорость гидролиза [Leu]энкефалина в инкубационной среде, не содержащей ингибиторов, составляла 5.0 ± 0.2 нМ/мин [14]. Степень ингибирования определяли по отношению к этому контролю. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие ингибиторы протеолитических ферментов: *N*-карбоксиметил-Phe-Leu (CMPL), метиловый эфир *D*-фенилаланина (*D*-PAM), бацитрацин, лейпептин и пуромицин.

В результате исследования обнаружено, что и семакс, и селанк значительно снижают скорость деградации [Leu]энкефалина ферментами сыворотки крови (рис. 1). Причем кривые дозозависимости этого эффекта для обоих гептапептидов практически совпадают, а концентрация пептидов, при которой наблюдается 50% ингибирование ферментов (IC_{50}), составляет для семакса около 10 и для селанка 15–20 мкМ. В тех же условиях все использованные для сравнения ингибиторы оказались значительно менее активными (рис. 1).

К энкефалиндеградирующим ферментам сыворотки крови относятся аминопептидазы, обеспечивающие около 70% общей энкефалиназной активности, и более специфичные к энкефалинам диамино- и дикарбоксипептидазы, такие, как эндопептидаза 24–11 (энкефалиназа В) и ангиотензинпревращающий фермент или энкефалиназа А [13]. Использованные в данной работе ингибиторы сравнения различаются по специфичности к разным типам энкефалиндеградирующих ферментов. Так специфический ингибитор энкефалиназ CMPL при максимальной концентрации, достижимой при его малой растворимости в водных растворах (50 мкМ), снижает скорость деградации энкефалина не более чем на 25% (рис. 1). *D*-PAM и пуромицин во всем исследованном диапазоне концентраций также менее активны, чем семакс и селанк. Наиболее близкий по эффективности к изучаемым гептапептидам ингибитор сериновых и цистеиновых протеиназ лейпептин, также имеющий пептидную природу, имеет IC_{50}

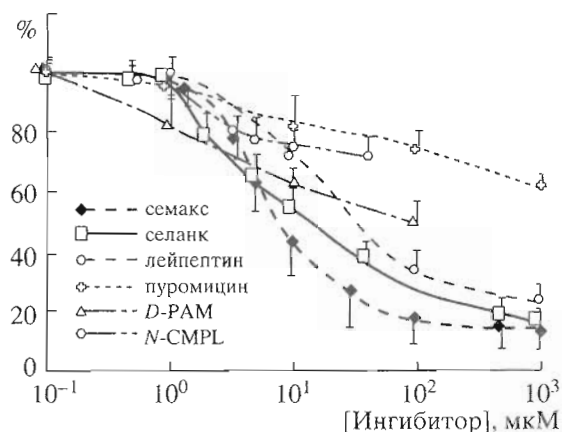


Рис. 1. Влияние семакса, селанка и стандартных ингибиторов протеолитических ферментов на скорость деградации [Leu]энкефалина ферментами сыворотки крови человека. По оси абсцисс приведены концентрации ингибиторов в логарифмической шкале; по оси ординат — остаточная активность.

около 50 мкМ (рис. 1). Одним из обычно используемых в радиорецепторном и других биохимических исследованиях ингибиторов пептидаз является бацитрацин, содержание которого в его препаратах, подобно антибиотикам, оценивается в единицах активности. В результате данного исследования показано, что бацитрацин в наиболее употребляемой концентрации 50 мкг/мл (3 МЕ/мл) снижает энкефалиназную активность сыворотки крови на 50%. В той же весовой концентрации, соответствующей примерно 50 мкМ, гептапептиды вызывают 70% ингибирование ферментов.

Пуромицин и бацитрацин взаимодействуют преимущественно с аминопептидазами, обеспечивающими, как отмечено выше, основную долю общей энкефалиназной активности. Наблюдаемая относительно низкая степень ингибирования ими гидролиза энкефалина, возможно, связана с тем, что при малых концентрациях субстрата, как мы предполагаем, ингибирование аминопептидаз повышает скорость гидролиза энкефалина дипептидилпептидазами.

Можно предполагать, что семакс и селанк взаимодействуют с энкефалиндеградирующими ферментами сыворотки крови, являясь, подобно энкефалинам, их субстратами. Косвенным доказательством этому служат данные о том, что время полужизни семакса и селанка в крови составляет так же, как у энкефалинов, всего несколько минут. Причем процессы ферментативного гидролиза этих пептидов схожи: деградация как семакса, так и энкефалинов начинается с отщепления *N*-концевой аминокислоты [15].

На следующем этапе исследования было проведено сравнение ингибирующей способности пептидных фрагментов исследуемых гептапептидов: общего для семакса и селанка трипептида Про-

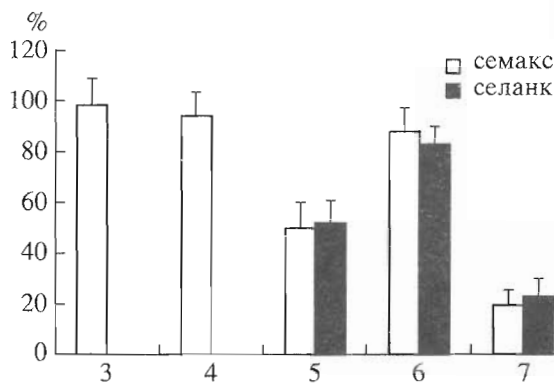


Рис. 2. Ингибирующий эффект семакса, селанка и их пептидных фрагментов в концентрациях 0.5 мМ на энкефалиназную активность сыворотки крови человека. По оси ординат – остаточная активность.

Gly-Pro, а также их С-концевых тетра-, пента- и гексапептидов:

семакс	селанк	число а. о.
Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	7
Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro	Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	6
His-Phe-Pro-Gly-Pro	Pro-Arg-Pro-Gly-Pro	5
Phe-Pro-Gly-Pro	–	4
Pro-Gly-Pro	Pro-Gly-Pro	3

В результате показано (рис. 2), что пентапептидные фрагменты семакса и селанка снижают скорость ферментативного гидролиза [Leu]энкефалина до 60% от контроля при концентрации 0.5 мМ, в то время как для нативных гептапептидов тот же эффект наблюдается при микромолярных концентрациях (см. рис. 1). Три-, тетра- и гексапептидные фрагменты в 0.5 мМ-концентрациях не оказывают существенного влияния на сывороточные энкефалиназы. Тот факт, что относительно стабильный в организме шестичленный фрагмент семакса практически не снижает энкефалиназную активность сыворотки (рис. 2), косвенно свидетельствует в пользу того, что ингибирование деградации энкефалина гептапептидами идет за счет их конкуренции с субстратом за активные центры ферментов, в частности аминопептидаз.

Таким образом, можно предположить, что один из механизмов биологического действия семакса и селанка связан с их способностью ингибировать ферменты, разрушающие биологически активные пептиды, в частности энкефалины. Поскольку время ферментативной деградации энкефалинов измеряется минутами [12], предполагается, что именно этот процесс в значительной степени лимитирует как их периферические, так и центральные биологические эффекты. Возможно ингибирование энкефалиндеградирующих фермен-

тов семаксом и селанком обуславливает то, что ряд их центральных эффектов [3, 4] сходен с поведенческими эффектами опиоидов [10, 11]. Один из компонентов ноотропного и антиишемического действия семакса [5] и селанка [16] может быть связан также с повышением содержания опиоидных пептидов в тканях мозга, поскольку на примере синтетического аналога [Leu]энкефалина даларгина показана возможность репаративного действия опиоидов [17, 18].

Дополнительная значимость полученных результатов связана с тем, что ферменты, гидролизующие эндогенные опиоидные пептиды, в частности энкефалиназы, в той или иной мере участвуют в деградации других регуляторных пептидов, таких, как вещество Р, брадикинин, ангиотензин и др. [12]. Таким образом можно предполагать, что некоторые биологические эффекты семакса и селанка связаны с регулированием содержания регуляторных пептидов через ингибирование ферментов их деградации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сыворотку крови получали от пяти здоровых доноров в результате стандартной процедуры, включающей 30-минутную инкубацию венозной крови при 37°C с последующим обведении сгустка стеклянной палочкой и центрифугированием (1000 g, 10 мин, 4°C). Полученные сыворотки объединяли, готовили аликвоты по 0.2 мл, замораживали и хранили при –20°C.

Энкефалиназную активность определяли по скорости накопления радиоактивных продуктов ферментативной деградации [³H]Leu]энкефалина по модифицированному методу [14]. Инкубационная смесь (конечный объем 50 мкл) содержала 10-кратно разведенную сыворотку крови, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 0.15 М NaCl, 1 мкКи (150 нМ) [³H]Leu]энкефалина с удельной активностью 120 Ки/ммоль [19] и тестируемые пептиды в соответствующих концентрациях. Инкубацию проводили 15 мин при 37°C и останавливали добавлением 5 мкл 0.2 М HCl.

Продукты гидролиза радиоактивного [Leu]энкефалина разделяли методом хроматографии в тонком слое на силикагельных пластинках (Merck, Германия) в системе этилацетат–изопропанол–вода–уксусная кислота, 40 : 40 : 1 : 19. В качестве маркеров, соответствующих продуктам реакции, использовали пептиды: Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly-Phe (Serva), Tyr-Gly-Gly, тирозин и холодный [Leu]энкефалин (Sigma). (*R_f* [Leu]энкефалина составляет 0.54, продуктов гидролиза – 0.25–0.42.) На хроматограмме вырезали зоны, соответствующие положению маркеров, помещали их в сцинтилляционные флаконы, добавляли 0.4 мл воды для экстракции пептидных фрагментов из силикагеля и после 30-минутного перемешивания заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 и измеряли

радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном спектрометре. Каждую точку определяли как среднее из 3–5 независимых экспериментов.

Семакс, селанк и их пептидные фрагменты были синтезированы классическими методами пептидной химии как описано в работах [1, 20].

[Leu]энкефалин, пурамицин, лейпептин, *N*-карбоксиметил-Phe-Leu, метиловый эфир *D*-фенилаланина и бацитрацин (59400 МЕ/г) – продукты фирмы Sigma.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотруднику ИМГ РАН Ю.А. Золотареву за любезно предоставленный [³H]Leu]энкефалин с высокой удельной радиоактивностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Антонова Л.В., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Потаман В.Н., Каменский А.А., Ашмарин И.П. // Хим.-фарм. журн. 1984. Т. 18. С. 790–795.
2. Семенова Т.П., Козловская М.М., Вальдман А.В., Громова Е.А. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1988. Т. 106. С. 161–163.
3. Серединин С.Б., Козловская М.М., Бледнов Ю.А., Козловский И.И., Семенова Т.П., Чабак-Горбач Р., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф. // Журн. высш. нервн. деят. 1998. Т. 48. С. 153–160.
4. Ashmarin I.P., Nezavibatko V.N., Levitskaya N.G., Koshchelev V.N., Kamensky A.A. // Neurosci. Res. Commun. 1995. V. 16. P. 105–112.
5. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Ряпина Т.В. // Журн. высш. нервн. деят. 1997. Т. 47. С. 420–430.
6. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф., Незавибатько В.Н., Журавлева Е.Ю., Ванчиккин А.В. // Журн. невропат. псих. им. А.А. Корсакова. 1997. Т. 6. С. 26–34.
7. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. // Молекулярн. биология. 1999. Т. 33. С. 27–31.
8. Ильинский О.Б. // Нейрофизиология (Киев). 1985. Т. 17. С. 550–556.
9. Zagon I.S., Goodman S.R., McLaughlin P.J. // Brain Res. 1989. V. 482. P. 297–305.
10. Shen Y., Li R. // Med. Hypotheses. 1995. V. 45. P. 529–538.
11. Зозуля А.А., Мешавкин В.К., Торопов А.В., Гуревич К.Г., Кост Н.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 127. С. 211–214.
12. Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко Н.Д. Биохимия мозга. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1999.
13. Marini M., Roscetti G., Bonjorno L., Urbani A., Rodolfo L. // Neurochem. Res. 1990. V. 15. P. 61–67.
14. Соколов О.Ю., Габаева М.В., Гуревич К.Г., Акатова Е.В., Алфимова М.В., Кост Н.В. // Нейрохимия. 2000. Т. 17. С. 150–156.
15. Potaman V.N., Alfeeva L.Y., Kamensky A.A., Nezavibatko V.N. // Peptides. 1993. V. 14. P. 491.
16. Иноземцев А.Н., Кокаева Ф.Ф., Козловский И.И., Сарычева Е.И. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1990. Т. 109. С. 445–446.
17. Золотов Г.К., Коваленко Н.Я., Мацевский Д.Д. // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1988. Т. 3. С. 48–51.
18. Лишманов Ю.В., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1994. С. 352.
19. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // Amino Acids. 1995. V. 47. P. 353–365.
20. Пономарева-Степная М.А., Незавибатько В.Н., Потаман В.Н., Козловская М.М., Вальдман А.В., Бондаренко Н.А. Пат. № 1124544 // Б. И. 1995. № 1. С. 260.

Semax and Selank Inhibit the Enkephalin-degrading Enzymes of Human Serum

N. V. Kost*, O. Yu. Sokolov*, M. V. Gabaeva*, I. A. Grivennikov**,
L. A. Andreeva**, N. F. Myasoedov**, and A. A. Zozulya*

e-mail: kost@rcmh.msk.ru.

*National Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences,
Zagorodnoe shosse 2/2, Moscow, 113152 Russia

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

A dose-dependent effect of synthetic heptapeptides Semax (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) and Selank (Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro) on the enkephalin-degrading enzymes of human serum was demonstrated. The inhibitory effects of Semax (IC₅₀ 10 μM) and Selank (IC₅₀ 20 μM) are more pronounced than those of puromycin (IC₅₀ 10 mM), bacitracin, and some other inhibitors of peptidases. Beside the heptapeptides, their pentapeptide fragments also possessed an inhibitory effect; tri-, tetra-, and hexapeptide fragments did not display such an effect. As the above enzymes take part in degradation of not only enkephalins but also other regulatory peptides, it can be assumed that one of the mechanisms of biological activity of Semax and Selank is related to this inhibitory activity of theirs. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Semax; Selank; enkephalinases, inhibitors; regulatory peptides; opioid system