



УДК 547.96.04

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА  
ГИСТАМИНВЫСВОБОЖДАЮЩИХ ПЕПТИДОВ  
ИЗ ЯДА ШЕРШНЯ *VESPA ORIENTALIS*

*Мирошников А. И., Снежкова Л. Г., Назимов И. В.,  
Решетова О. И., Розынов Б. В.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

*Гуцин И. С.*

*Институт иммунологии Академии медицинских наук СССР, Москва*

Из яда шершня *Vespa orientalis* гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и тонко-слойной хроматографией выделены два линейных 14-членных пептида (HR-I и HR-II), обладающих гистаминвысвобождающим действием на тучные клетки крысы. Автоматической деградацией по Эдману и масс-спектрометрией установлена полная аминокислотная последовательность этих полипептидов. Показано, что биологическое действие этих соединений несколько ниже, чем у классического нецитотоксического агента — MCD-пептида из яда пчелы. На примере гемолиза эритроцитов продемонстрировано также цитотоксическое действие обоих пептидов. Показано, что избирательное, нецитотоксическое, действие более выражено у пептида HR-I, а цитотоксическое — у HR-II.

Выделение гистамина из тучных клеток млекопитающих — следствие проявления в живом организме аллергической реакции. Принято считать, что молекулярный механизм аллергической реакции сводится к связыванию антигена (аллергена) двумя молекулами иммуноглобулина E, фиксированными своими F<sub>c</sub>-фрагментами на поверхности мембраны тучных клеток. В результате такого взаимодействия тучные клетки дегранулируются и высвобождаются биогенные амины (гистамин), о чем свидетельствует возникновение внешних проявлений аллергической реакции [1]. Существует ряд соединений как природного, так и синтетического происхождения, которые вызывают дегрануляцию тучных клеток и, как следствие, высвобождение гистамина, имитируя тем самым запуск аллергической реакции. Изучение гистаминвысвобождающего действия различных по химическому строению пептидов, по-видимому, может способствовать составлению модели пространственного расположения функциональных групп, необходимых для запуска секреции гистамина, что в свою очередь существенно для выяснения природы клеточных рецепторов.

Яды некоторых насекомых содержат полипептиды, способные дегранулировать тучные клетки и инициировать высвобождение гистамина. Наиболее специфичным из них является MCD-пептид, выделенный из яда пчелы *Apis mellifera* и представляющий собой 22-членный полипептид с двумя дисульфидными связями [2]. В последнее время из ядов различных

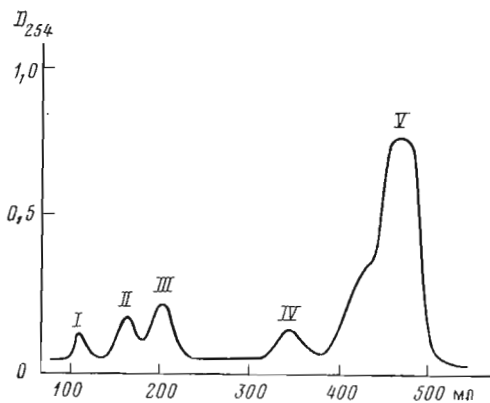


Рис. 1

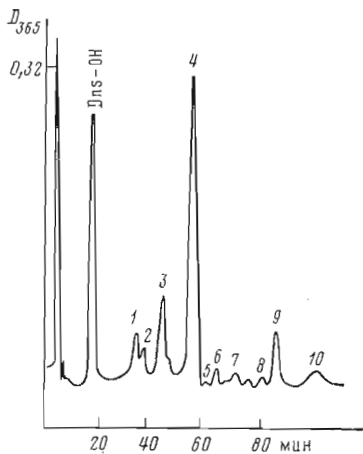


Рис. 2

Рис. 1. Гель-фильтрация пчелиного яда шершня *Vespa orientalis* на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-75 в аммоний-ацетатном буфере (рН 4,7). Фракция IV содержит низкомолекулярные пептиды, обладающие гемолитической активностью

Рис. 2. Хроматограмма смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов на колонке «Lichrosorb RB-18» (25 см×3,2 мм)

ос японскими исследователями выделены линейные полипептиды, состоящие из 14 аминокислотных остатков, структурно отличающиеся от MCD-пептида, но обладающие сходным биологическим действием [3, 4]. Ранее было показано [5], что в яде восточного шершня *Vespa orientalis* присутствуют низкомолекулярные полипептиды, биологическое действие которых детально не исследовалось. По аналогии с ядом других перепончатокрылых можно было предположить, что этот источник также должен содержать полипептиды, влияющие на секрецию биогенных аминов из тучных клеток млекопитающих.

Цель настоящей работы — выделение, установление строения и изучение биологических свойств гистаминвысвобождающих пептидов из яда шершня *Vespa orientalis*.

Гель-фильтрацией цельного яда шершня на сефадексе G-50 (рис. 1) удалось выделить фосфолипазу A<sub>2</sub> (фракция III) с *M* 15 000 [6]. Поскольку было показано, что фракция V не содержит соединений пептидно-белковой природы, особое внимание мы уделили изучению фракции IV, которая, как оказалось, содержит пептиды, обладающие значительной гемолитической активностью. Повторная гель-фильтрация этой фракции на сефадексе G-25 не привела к выделению индивидуальных пептидов, их разделение было осуществлено хроматографией в тонком слое целлюлозы. С помощью этого метода были выделены два основных олигопептида, аминокислотный состав которых приведен в таблице. Определение молекулярного веса в полиакриламидном геле дало для обоих пептидов величину около 1500, что соответствует полипептидной цепи, построенной из 13–15 аминокислотных остатков.

Изучение гистаминвысвобождающей активности этих двух полипептидов показывает дегранулирующее действие на тучные клетки крысы.

Определение С-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидаз А, В и С у гистаминвысвобождающих пептидов указывает на то, что С-концевые аминокислоты, по-видимому, присутствуют в виде амидов.

Для определения аминокислотной последовательности пептида НR-I был использован твердофазный вариант автоматической деградации по Эдману. Пептид, содержащий, по данным аминокислотного анализа, три остатка лизина, был присоединен к  $\gamma$ -аминопропилстеклу с помощью *n*-фенилендиизотиоцианата. После проведения 14 циклов отщепления амино-

**Аминокислотный состав полипептидов HR-I и HR-II  
из яда шершня**

Аминокислота	HR-I	HR-II
Ala	3,1(3)	0,1(0)
Gly	0,2(0)	2,2(2)
Ile	1,9(2)	1,1(1)
Leu	3,3(3)	6,2(6)
Lys	2,9(3)	2,1(2)
Asp	0,9(1)	—
Val	1,9(2)	1,3(1)
Pro	—	0,9(1)
Phe	—	1,0(1)
Общее количество	14	14
N-Концевая аминокислота	Ile	Phe

кислотных остатков определена последовательность Ile-Asn-Leu-X-Ala-Ile-Ala-X-Leu-Val-X-X-X-X. Для подтверждения данных, полученных на секвенаторе, и окончательного установления структуры пептида был использован его частичный кислотный гидролиз с последующей масс-спектрометрической идентификацией строения пептидных фрагментов. После ограниченного кислотного гидролиза смесь пептидов обрабатывали в стандартных условиях последовательно дансилхлоридом. Около 10% полученной смеси метиловых эфиров N-дансилпептидов использовали для предварительной оценки ее состава. Образец вводили в ионный источник масс-спектрометра и, ступенчато повышая температуру испарителя, записывали масс-спектры через каждые 20° С. Таким образом удалось получить масс-спектры практически всех коротких пептидов, образующихся в результате неспецифического кислотного гидролиза.

Остальную часть смеси разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке «Lichrosorb RP-18» с обращенной фазой в градиенте концентрации метанола (рис. 2). В каждой фракции содержалась смесь 2—3 пептидов. Исключение составляла фракция 4, в которой было обнаружено производное одного пептида — Ile-Ala. Выделенные фракции легко анализируются масс-спектрометрическим методом. Следует отметить, что метиловые эфиры дансилпептидов каждой фракции можно разделить адсорбционной жидкостной хроматографией на колонке «Zorbax-Sil».

Масс-спектрометрическую идентификацию метиловых эфиров N-дансилпептидов осуществляли на основании интенсивных пиков молекулярных ионов и ионов N-дансилированных аминных фрагментов  $\text{Dns}-(\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^n)-\text{CO})^n-\text{NH}=\text{CH}(\text{R}^{n+1})^*$ , присутствующих в спектрах соединений этого типа [7, 8]. В качестве типичного масс-спектра исследуемых производных выбран масс-спектр метилового эфира N-дансилаланилизололейцилаланина (рис. 3).

При хроматографическом разделении метиловых эфиров N-дансилпептидов в указанных условиях не удается обнаружить лизилсодержащих фрагментов в индивидуальном состоянии, однако анализ масс-спектров исходного гидролизата, полученных при температуре испарения 150° С, показывает наличие молекулярных ионов и аминных фрагментов, позволяющих идентифицировать производные пептидов как Dns-Leu-Lys(Dns)-OMe, Dns-Lys(Dns)-Ala-OMe, Dns-Val-Lys(Dns)-OMe, Dns-Lys(Dns)-Val-OMe.

Хотя масс-спектрометрический метод анализа метиловых эфиров Dns-пептидов не позволяет различить между собой остатки лейцина и изолоейцина, расположение их в полипептидной цепи достаточно просто установить с помощью идентификации фенилтиогидантоинов аминокислот,

\* n — номер аминокислотного остатка.

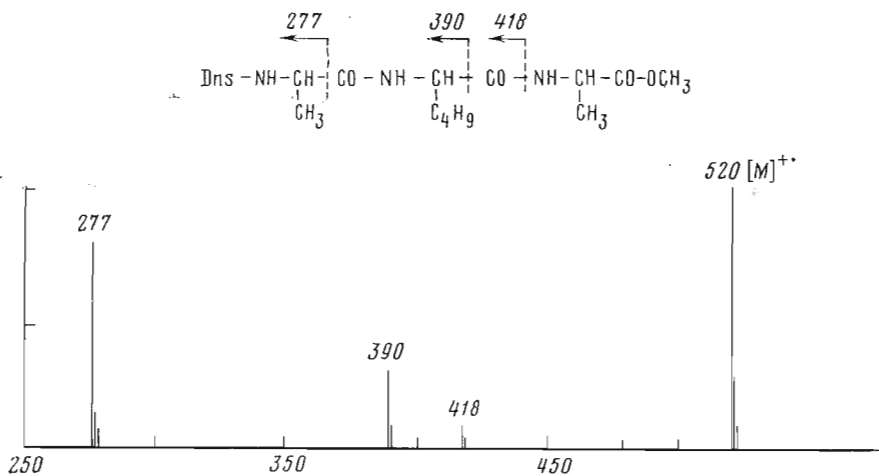


Рис. 3. Масс-спектр метилового эфира N-дансилаланилизольцилаланина (фракция 7, рис. 2; температура записи 70° C)

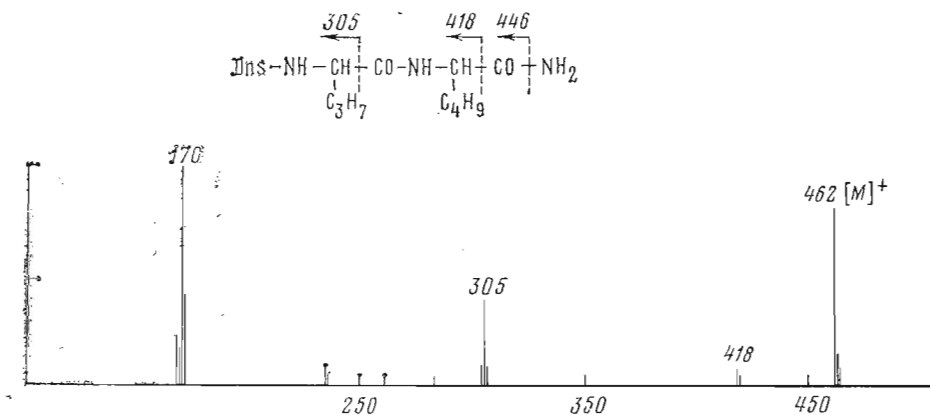


Рис. 4. Масс-спектр N-дансилвалллейциламида (из триптического гидролизата, температура записи 70° C)

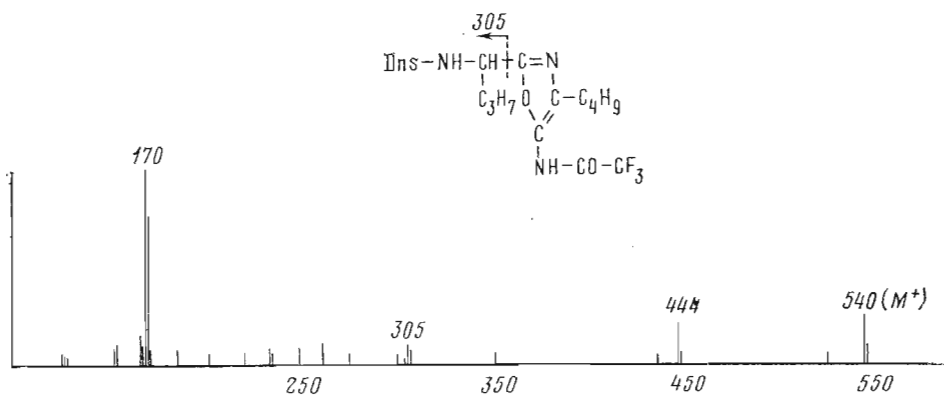


Рис. 5. Масс-спектр трифторацетильного производного N-дансилвалллейциламида (температура записи 40° C)

полученных после автоматической деградации на секвенаторе. Следует также отметить, что вместо пептидов Ile-Asn, Ile-Asn-Leu присутствуют пептиды, содержащие остатки аспарагиновой кислоты, образующиеся при кислотном гидролизе амидных групп остатков аспарагина в исходных пептидах.

С-Концевой пептид Val-Leu-NH<sub>2</sub> был обнаружен среди пептидов неспецифического кислотного гидролиза, однако с большим выходом он выделен в виде дансилпроизводного жидкостной хроматографией на колонке «Lichrosorb-RP-18» после триптического гидролиза пептида HR-I. В масс-спектре этого пептида (рис. 4) присутствует интенсивный пик молекулярного иона M<sup>+</sup> с m/z 462, пики аминных фрагментов с m/z 418 и 305, а также пик иона диметиламинонафталина с m/z 170.

Определение структуры С-концевых фрагментов в пептидах и белках всегда связано с некоторыми сложностями из-за своеобразной специфичности обычно используемых карбоксипептидаз, тем более если последняя аминокислота присутствует в виде какого-либо производного. В последнее время из мозга млекопитающих и ядов различных животных выделены полипептиды с блокированной в виде амида С-концевой аминокислотой, поэтому необходимо иметь дополнительные методы идентификации этих фрагментов. Так как масс-спектрометрический метод является, пожалуй, наиболее надежным в этом случае, мы несколько подробнее остановимся на анализе масс-спектров — амидов олигопептидов.

Недавно было показано [9], что обработка α-амидов олигопептидов трифторуксусным ангидридом приводит к образованию стабильных N-трифторацетилпептидил-5 (трифторацетиламино)оксазолов. Эти соединения образуются в результате присоединения трифторацетильного остатка к α-амидной группе С-концевой аминокислоты с последующей циклизацией, сопровождающейся элиминированием молекулы Н<sub>2</sub>О.

Естественно, что С-концевые аминокислоты со свободной карбоксильной группой таким превращениям не подвергаются, как и пептиды, содержащие остатки аспарагина и глутамина.

С-Концевой фрагмент пептида HR-I при обработке трифторуксусным ангидридом превращается в производное со структурой, показанной на рис. 5. В масс-спектре этого оксазола присутствует достаточно интенсивный пик молекулярного иона с m/z 540, а также пики аминного фрагмента с m/z 305 и диметиламинонафталин с m/z 170. Приведенный пример свидетельствует, что трифторацетилирование амидов Dns-пептидов с последующим масс-спектрометрированием является удобным методом идентификации С-концевых амидных группировок.

Данные анализа метиловых эфиров Dns-пептидов методом комбинирования жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии позволили предложить для пептида HR-I следующую структуру:

Ile-Asn

Ile-Asn-Leu

Leu-Lys

Lys-Ala

Ala-Ile

Ala-Ile -Ala

Ala-Ile -Ala-Ala

Ile -Ala-Ala

Ala-Leu-Val

Val-Lys

Lys-Val

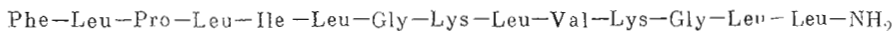
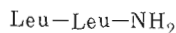
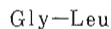
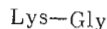
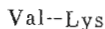
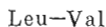
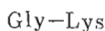
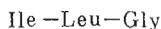
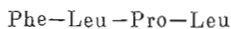
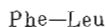
Val-Leu-NH<sub>2</sub>

Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Val-Lys-Lys-Val-Leu-NH<sub>2</sub>

Аналогичный подход был использован и при выяснении структуры второго гистаминвысвобождающего пептида — HR-II. При определении аминокислотной последовательности с помощью твердофазного секвенатора были получены следующие результаты:



Масс-спектрометрический анализ метиловых эфиров Dns-пептидов, как после разделения продуктов ограниченного кислотного гидролиза с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, так и при непосредственном введении неразделенной смеси в ионный источник, позволил идентифицировать следующие пептиды:



Таким образом, определение последовательности на секвенаторе позволяет установить структуру большей части молекулы пептида, а масс-спектрометрический анализ коротких фрагментов дает возможность локализовать остатки лизина (блокированных при присоединении к нерастворимому носителю) и определить структуру С-концевого фрагмента.

Изучение гистаминвысвобождающего действия пептидов HR-I и HR-II в сравнении с MCD-пептидом из яда пчелы показывает, что они действуют в гораздо более высоких концентрациях (рис. 6). Если действие MCD-пептида достигает максимума (высвобождение 70% содержащегося в клетках гистамина) при концентрациях 0,2 мкг/мл, то полипептиды из яда шершня в концентрации ~100 мкг/мл приводят к полному истощению запасов гистамина в тучных клетках, что свидетельствует о проявлении этими соединениями цитотоксических свойств. Высвобождение гистамина, вызванное пептидами HR-I и HR-II, достигает максимума в течение первых секунд (рис. 7), что принципиально соответствует временному течению высвобождения гистамина, вызываемого MCD-пептидом или веществом 48/80 [10]. Папаверин в концентрациях, истощающих запасы АТФ [11], тормозит в зависимости от дозы высвобождение гистамина, вызванное пептидом HR-I (рис. 8а) и HR-II (рис. 8б). Глюкоза (5 мМ), восстанавливающая в этих условиях запасы АТФ за счет гликолитического пути его накопления [11], предотвращает тормозящее действие папаверина (кривые 2). Добавление подкисленной кислоты, блокирующей гликолиз [12], резко снижает предотвращающее действие глюкозы (кривые 3).

Однако торможение папаверином не является полным, как следовало бы ожидать при избирательном (нецитотоксическом) действии пептидов из яда шершня. Так, действие MCD-пептида, избирательного высвободителя гистамина, в концентрации, вызывающей максимальный эффект,



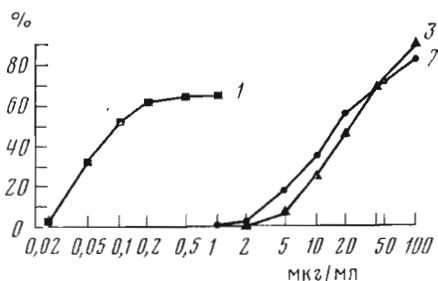


Рис. 6

Рис. 6. Высвобождение гистамина (%), вызванное MCD-пептидом (1), пептидом HR-I (2) и HR-II (3). Концентрация веществ здесь и на рис. 6, 8, 9, 11 дана в логарифмической шкале. Тучные клетки ( $20 \cdot 10^3$  клеток в образце) инкубировали 5 мин в 1 мл буферного раствора при  $37^\circ\text{C}$  без испытуемых веществ или с ними. Реакцию останавливали, добавляя к клеткам 1 мл охлажденного ( $0^\circ\text{C}$ ) буферного раствора. Спонтанное высвобождение гистамина 3,7%

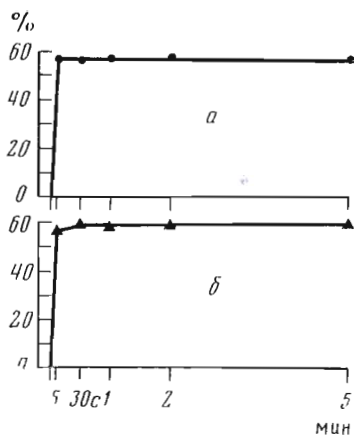


Рис. 7

Рис. 7. Зависимость от времени высвобождения гистамина (%), вызванного пептидом HR-I (а) и HR-II (б). Тучные клетки ( $20 \cdot 10^3$  клеток в образце) инкубировали указанное время без испытуемых веществ или с ними (50 мкг/мл) в 200 мкл при  $37^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали, добавляя к клеткам 1,8 мл охлажденного буферного раствора. Спонтанное высвобождение гистамина 5%

полностью тормозится в этих условиях (рис. 8в), что согласуется с полученными ранее данными [10]. При низких концентрациях пептида HR-I (до 10 мкг/мл) папаверин оказывает более выраженное торможение высвобождения гистамина, и, напротив, при повышении концентрации HR-I до 50 мкг/мл наблюдается отчетливое ускользание высвобождения гистамина от тормозящей блокады энергозависимых процессов папаверином (рис. 9). Определение высвобождения гистамина, вызванного полипептидами яда шершня при разных температурах, показывает, что при низкой температуре ( $4^\circ\text{C}$ ) их действие тормозится, но в отличие от избирательных агентов не полностью (рис. 10).

Таким образом, приведенные данные позволяют предположить двоякое действие полипептидов из яда шершня, соответствующее как избирательному, так и цитотоксическому действию на мембрану тучных клеток. Для цитотоксического действия характерны тенденция к полному истощению запасов гистамина в клетках при возрастании концентрации исследуемого полипептида (рис. 6), сохранение способности к высвобождению гистамина из клеток при низкой температуре (рис. 10), отсутствие полного торможения высвобождения гистамина, вызванного пептидами, в условиях блокады энергозависимых процессов (рис. 8а). О наличии специфического действия этих пептидов свидетельствует заметное торможение их действия при угнетении энергетически зависимых процессов, что отчетливо проявляется при использовании низких концентраций пептидов (рис. 8а, б и в).

Из полученных результатов следует, что действие пептидов яда шершня в относительно низких концентрациях соответствует эффекту избирательных высвободителей гистамина, осуществляющих активную, энергозависимую секрецию медиатора из клетки, а при высоких концентрациях проявляется цитотоксическое действие, характерное для катионных детергентов пептидной природы, например мелиттина из яда пчелы [10].

Цитотоксическое действие исследуемых пептидов было продемонстрировано на примере гемолиза эритроцитов; разрушение мембраны происхо-

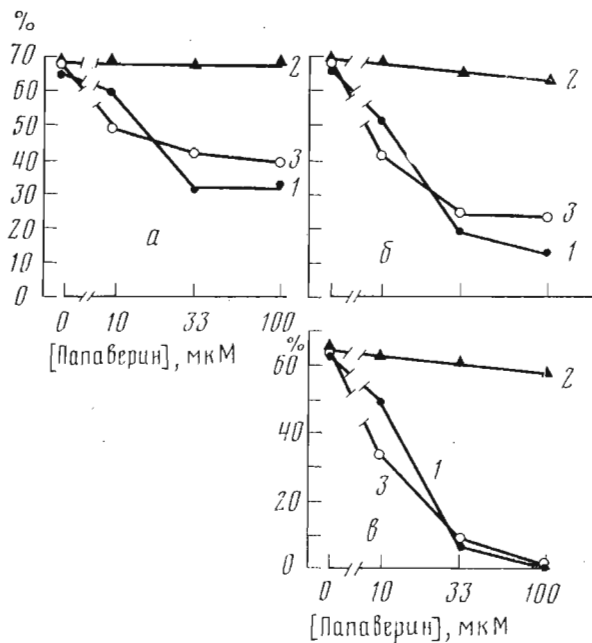


Рис. 8

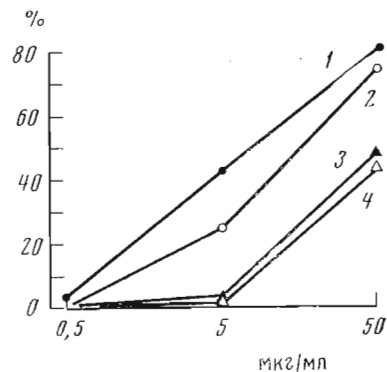


Рис. 9

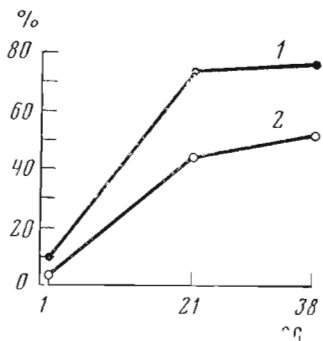


Рис. 10

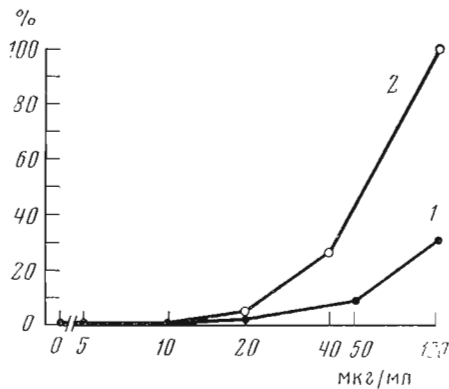


Рис. 11

Рис. 8. Высвобождение гистамина (%), вызванное пептидом HR-I (*a* — 25 мкг/мл), HR-II (*б* — 25 мкг/мл) и MCD-пептидом (*в* — 2 мкг/мл) в присутствии папаверина без глюкозы (1), с 5 мМ глюкозой (2) и с 5 мМ глюкозой + 13 мкМ иодацетатом (3). Тучные клетки ( $15 \cdot 10^3$  клеток в образце) прединкубировали 10 мин в 1 мл буферного раствора при 37° С. Реакцию останавливали, добавляя к клеткам 1 мл охлажденного буферного раствора. Спонтанное высвобождение гистамина 2,5%

Рис. 9. Действие папаверина на высвобождение гистамина, вызванное пептидом HR-I. Тучные клетки ( $20 \cdot 10^3$  клеток в образце) инкубировали 10 мин в 1 мл буферного раствора при 37° С без (1) или в присутствии папаверина в концентрации 10 (2), 33 (3), 100 мкМ (4). Затем к ним добавляли пептид и инкубировали 5 мин. Реакцию останавливали, добавляя 1 мл охлажденного буферного раствора. Спонтанное высвобождение гистамина 3%

Рис. 10. Зависимость от температуры высвобождения гистамина, вызванное пептидом HR-I (50 мкг/мл) (1) и HR-II (20 мкг/мл) (2). Тучные клетки ( $15 \cdot 10^3$  клеток в образце) инкубировали 5 мин в 1 мл буферного раствора без или в присутствии пептидов. Реакцию останавливали, добавляя 1 мл охлажденного буферного раствора. Спонтанное высвобождение гистамина 2—3%

Рис. 11. Гемолитическое действие гистаминвысвобождающего пептида I (1) и II (2). По оси ординат — гемолиз в % к максимальному гемолизу в опыте. 2,5% взвесь эритроцитов инкубировали 10 мин в 1 мл буферного раствора при 37° С в присутствии пептидов



дит в концентрациях, начиная с 20 мкг/мл (рис. 11). Из рис. 11 видно, что при всех эффективных концентрациях гемолитическое действие более выражено у пептида HR-II и различие это становится отчетливым при использовании концентрации пептидов порядка 50 мкг/мл. Эти данные соответствуют характеру кривых «доза — эффект» (рис. 6) гистаминвысвобождающего действия пептидов яда шершня. Согласно рис. 6, в концентрациях выше 50 мкг/мл, при которых проявляется цитотоксическое действие пептидов, гистаминвысвобождающий эффект сильнее у пептида HR-II, имеющего и более высокую гемолитическую активность. Таким образом, можно полагать, что избирательное действие более выражено у пептида HR-I, тогда как цитотоксическое — у HR-II.

Из сопоставления химических структур MCD-пептида, полипептидов из яда шершня, а также мелиттина (катионного детергента полипептидной природы, разрушающего биологические мембраны) не следует какого-либо прямого объяснения характерного действия пептидов HR-I и HR-II на мембраны тучных клеток. Если MCD-пептид имеет жесткую пространственную структуру, что, возможно, обеспечивает специфическое взаимодействие с рецептором на поверхности мембраны, то мелиттин, очевидно, связываясь своим С-концевым фрагментом с отрицательно заряженными молекулами фосфолипидов, внедряет гидрофобную N-концевую часть молекулы в липидный матрикс мембраны, приводя к ее дезинтеграции. Некоторое подобие структур пептидов HR-I и HR-II структуре мелиттина объясняет наличие гемолитического эффекта пептидов яда шершня, тогда как их избирательное действие, вероятно, может проявляться после конформационного изменения структуры, индуцируемого взаимодействием с высокомолекулярным партнером — биологическим рецептором на поверхности мембраны.

### Экспериментальная часть

Яд восточного шершня *Vespa orientalis* был получен из Института биохимии АН УзССР. Раствор 250 мг яда в 0,2 М аммоний-ацетатном буфере (рН 4,7) наносили на колонку (2,5×90 см) с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция), уравнивавшим тем же буфером. Скорость элюирования 25 мл/ч (рис. 1). Выход фракции IV 125 мг. После лиофилизации смесь полипептидов фракции IV (0,15 мг) разделяли на целлюлозной пластинке (20×20 см) (Schleicher und Schüll, ФРГ) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (15:10:12:3) (контроль нингидрином). Полипептиды HR-I (75 мкг,  $R_f$  0,5) и HR-II (45 мкг,  $R_f$  0,85) были выделены элюированием с пластинок 50% пиридином в индивидуальном состоянии. N-Концевые аминокислоты определены в виде дансильных производных, С-концевые — после обработки карбоксипептидазами А, В и С (Worthington, США) в стандартных условиях. Аминокислотный состав устанавливали на автоматическом анализаторе D-500 (Durrum, США), после 24 и 72 ч гидролиза в 5,7 н. HCl. Определение молекулярного веса гистаминвысвобождающих пептидов проводили диск-электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Като и др. [13]. Для построения калибровочной кривой использовали цитохром *c* ( $M$  12 300, Serva, ФРГ), мелиттин ( $M$  2840), апамин ( $M$  2038), MCD-пептид ( $M$  2593) и грамицидин S ( $M$  1140). Для приготовления растворов и гелей применяли додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), акриламид и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal, ВНР), дансилхлорид (Serva, ФРГ).

*Триптический гидролиз пептидов* и дансильрование полученных фрагментов осуществляли в стандартных условиях. Дансилпептиды разделяли на колонке «Lichrosorb-RP-18», как описано ниже.

*Автоматическая деградация по Эдману (твердофазный вариант)*. Раствор пептида (40 нмоль) в 100 мкл 1 М квадрольного буфера (рН 9,0) смешивали с 1 мг *n*-фенилндиизотиоцианата в 100 мкл диметилформамида.

Реакционную массу перемешивали 1 ч под аргоном при 45° С, добавляли 1 г  $\gamma$ -аминопропилстекала и снова перемешивали 1 ч при 45° С. После добавления к реакционной смеси 100 мкл 50% метилизоцианата в ацетонитриле перемешивали еще 45 мин, добавляли 15 мл метанола, нерастворимый носитель отфильтровывали и сушили в вакууме при 20° С. Отщепление 2-анилино-5-тиазолинонов проводили на твердофазном секвенаторе модели ARS-240 (Rank Hilger, Англия). Разделение 3-фенил-2-тиогидантоинов аминокислот осуществляли высокоэффективной жидкостной хроматографией на носителе Ultrasphere C<sub>18</sub> (колонка 4,6×150 мм, Altex, США) с помощью градиентного элюирования двухбуферной системой. Состав первого буфера (1 л): 50 мл 0,06 М ацетата натрия, 220 мл метанола, 110 мл ацетонитрила. Состав второго буфера (1 л): 100 мл 0,06 М ацетата натрия, 220 мл метанола, 300 мл ацетонитрила. Скорость элюирования 90 мл/ч, смена буферов на 16-й мин.

*Частичный гидролиз пептидов HR-I и HR-II.* Пептид (0,25 мг) растворяли в 3 мл 6 н. HCl и нагревали 45 мин при 100° С. К упаренному гидролизату добавляли 1,72 мг хлоргидрата дансилхлорида, 0,23 мл 0,1 н. NaHCO<sub>3</sub> и 0,43 мл ацетона. Через 12 ч добавляли 0,3 мл 0,1 н. HCl. После упаривания остаток обрабатывали 10 мин 1 н. HCl в метаноле при 60° С, после упаривания остаток растворяли в хлороформе, фильтрат упаривали и использовали для дальнейшего анализа. Смесь метиловых эфиров Dns-пептидов разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Du Pont 830» (США), колонка (25 см×3,2 мм) с обращенной фазой (Lichrosorb RP-18, 10 мкм). Для хроматографического разделения использовано 90% исходной смеси, растворенной в 50 мкл метанола. Метиловые эфиры Dns-пептидов вначале элюировали 20 мин со скоростью 1 мл/мин смесью метанол — вода (1 : 1), затем в течение 60 мин использовали градиентное элюирование от смеси метанол — вода (1 : 1) до метанола.

*Масс-спектрометрический анализ* фракции пептидов после хроматографического разделения смеси и самой исходной пептидной смеси после частичного гидролиза осуществляли на приборе LKB 9000 (Швеция, LKB) при энергии ионизирующих электронов 70 эВ. Образец в стеклянной ампулке вводили непосредственно в ионный источник масс-спектрометра и ступенчато нагревали от 20 до 200° С, записывая масс-спектры через каждые 20° С.

*Гистаминвысвобождающее действие пептидов* изучали на тучных клетках белых крыс весом 300—350 г. Способ получения тучных клеток, особенности построения опытов, составы использованных растворов, спектрофлуорометрическое определение гистамина описаны ранее [14].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за участие в обсуждении результатов и критические замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Stanworth D. R., Kings M., Ray P. D., Moran J. M., Moran D. M. Synthetic peptides comprising sequences of the human immunoglobulin E heavy chain capable of releasing histamine.— *Biochem. J.*, 1979, v. 180, № 3, p. 665—668.
2. Habermann E. Bee and wasp venoms.— *Science*, 1972, v. 177, № 4046, p. 314—322.
3. Hirai Y., Yashuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C. A new mast cell degranulating peptide «Mastoparan» in the venom of vespula lewisii.— *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, v. 27, № 8, p. 1942—1944.
4. Hirai Y., Kawada M., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of japanese hornea (*Vespa xanthoptera*).— *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, v. 27, № 8, p. 1945—1946.
5. Туйчибаев М. У., Муксимов Ф. А., Ахмедова Н., Шкинев А. В., Мирходжаев У. З., Мурадова К. Г., Алматов К. Т., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А. Характеристика некоторых мембраноактивных компонентов яда *Vespa orientalis*.— *Биохимия*, 1977, т. 42, в. 12, с. 2160—2167.

6. Мирошников А. И., Грицук В. И., Мещерякова Е. А., Оганов В. В., Туйчибаев М. У., Ташмухамедов Б. А. Выделение и характеристика фосфолипазы А<sub>2</sub> из яда шершня *Vespa orientalis*.— Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 494–501.
7. Day R. A., Falter H., Lehman J. P., Hamilton R. E. N-Terminal groups in mass spectrometry of peptides. A study including some new and useful derivatives.— J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 4, p. 782–788.
8. Marino G., Malorni A. Peptide fragmentation mechanisms.— Adv. in mass spectr. in biochem. and medicine, 1976, v. II, p. 249–255. Spectrum Publications, Inc.
9. Engelfried C., Ludwig K., Jänichen H., König W. A. Reaktionen von Aminosauer und Peptiden. II. Darstellung von 2-Aminooxazolderivaten aus Peptidamiden mit Hexafluoracetanhydrid.— Liebigs Ann. Chem., 1979, № 7, S. 973–985.
10. Гуцун И. С., Мирошников А. И., Мартынов В. И. Особенности гистаминвысвобождающего действия MCD-пептида из яда пчел.— Бюл. exper. биол. и мед., 1977, т. 84, № 7, с. 78–80.
11. Fredholm B. B., Gushchin I. S., Elwin K., Schwab G., Uvnas B. Cyclic AMP independent inhibition by papaverine of histamine release induced by compound 48/80.— Biochem. Pharmacol., 1976, v. 25, p. 1583–1588.
12. Peterson C. Role of energy metabolism in histamine release. A study on isolated rat mast cells.— Acta physiol. scand., 1974, Suppl. 413, p. 1–34.
13. Kato K., Sasaki M., Kimura S. Application of the dansylation reaction to the characterization of low molecular weight peptides by dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis.— Analyt. Biochem., 1975, v. 66, № 2, p. 515–522.
14. Гуцун И. С., Фредгольм Б., Увиас Б. Действие папаверина и простагландина Е<sub>1</sub> на вызванное веществом 48/80 высвобождение гистамина из тучных клеток крыс.— Пат. физиол., 1975, № 6, с. 3–7.

Поступила в редакцию  
4.V.1981

## STRUCTURE AND PROPERTIES OF HISTAMINE RELEASING PEPTIDES FROM THE VENOM OF *VESPA ORIENTALIS* HORNET

MIROSHNIKOV A. I., SNEZHKOVA L. G., NAZIMOV I. V.,  
RESHETOVA O. I., ROZYNOV B. V., GUSHCHIN I. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Institute of Immunology, Academy of Medical Sciences  
of the USSR, Moscow*

Two linear 14-membered peptides (HR-I and HR-II) have been isolated from the venom of hornet *Vespa orientalis* using Sephadex G-50 gel filtration and TLC. Histamine releasing activity of HR-I and HR-II was assayed on rat mast cells and found to be somewhat lower than that of a classical non-cytotoxic agent, MCD peptide from the bee venom. Cytotoxic effects of HR-I and HR-II were demonstrated in the experiments on the erythrocyte hemolysis. Thus HR-I was found to have a more potent selective and non-cytotoxic activity, while a higher cytotoxicity was associated with HR-II.