

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДА НА БИОСИНТЕЗ ИНСУЛИНА У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

В.Х.Хавинсон

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

При анализе аминокислотных последовательностей инсулинотропных полипептидов обнаружен общий для них короткий участок из четырех аминокислотных остатков. Синтезирован тетрапептид KEDW_a, аналог этого участка, защищенный от действия протеиназ желудочно-кишечного тракта. При аллоксановом диабете у крыс тетрапептид частично восстанавливает синтез инсулина. Наклон сахарной кривой при этом аналогичен таковому здоровых животных. Высказано предположение о том, что тетрапептид является активатором промоторного участка гена препроинсулина, комплементарно взаимодействуя с нуклеотидными последовательностями ggсagg и сctgсс ведущей цепи двойной спирали ДНК.

Ключевые слова: *тетрапептид, диабет, препроинсулин, промотор гена, комплементарность*

В последние годы получены многочисленные свидетельства о модулирующем воздействии коротких пептидов на разные системы организма, в частности на иммунную и нейроэндокринную системы, на гормональную систему желудочно-кишечного тракта [1,2]. Как правило, эти регуляторные пептиды (РП) возникают за счет специфического гидролиза (процессинга) более длинных полипептидов. Этот путь позволяет оперативно получать РП в нужном месте за счет гидролиза неактивного предшественника [4]. Некоторые короткие пептиды рассматриваются как потенциальные средства для лечения сахарного диабета. Известно, что β-клетки поджелудочной железы синтезируют и выделяют инсулин, который обладает гипогликемическим действием. Сахарный диабет I типа (инсулинзависимый) характеризуется недостаточностью или полным отсутствием инсулина и постоянной повышенной концентрацией глюкозы в крови.

Система пептидных гормонов желудочно-кишечного тракта представляет собой специфический эндокринный аппарат, который в значительной мере самостоятельно координирует последовательность и взаимодействие функционирования желудка, поджелудочной железы, печени и кишечника. В экспериментах было показано, что

ряд эндогенных пептидных гормонов стимулирует поджелудочную железу и выделение инсулина (инсулинотропный эффект) [3,9,12]. В частности, гастроингибирующий пептид (ГИП) стимулирует выделение инсулина при повышенной концентрации глюкозы. Аналогично действует инкретин, выделяемый двенадцатиперстной и тощей кишкой в ответ на присутствие глюкозы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы попытались найти структуру короткого пептида, который мог бы действовать как миметик инсулинотропных полипептидов. С этой целью мы исследовали аминокислотную последовательность инкретина [10]:

MVALKTCSSL LVLLFLAVGL GEKEEVEFRS
NAKFAGPRPR GPRYAEGTFL⁵⁰ SDYSIAMDKI
ROQDFVNWLL AOKGKKNDWK HNLTOREA-
RA LELAGQSQRN¹⁰⁰ EEKEAQGSSL PKSLSDE-
DVL RDLIIQELLA WMADQAELCR LRSQ¹⁴⁴

В составе инкретина подчеркнута часть полипептидной цепи, соответствующая аминокислотной последовательности ГИП, за исключением остатка аргинина в позиции 61, который в составе ГИП заменен на гистидин. Оба инсулинотропных гормона содержат в структуре короткий

участок из четырех аминокислотных остатков **KNDW**, который не обнаружен в составе других регуляторных пептидов человека [7].

Из островков поджелудочной железы морского конька *Lophius americanus* был выделен регуляторный пептид YG, имеющий аминокислотную последовательность YPPKPETPGS NASPEDWASY QAAVRHYVNL ITRQRYG³⁷. Он содержит участок цепи **EDW**, представляющий собой вариант последовательности **NDW**, в котором остаток аспарагина (N) заменен остатком глутаминовой кислоты E.

Рассматривая возможность использования короткого пептида **KNDW** в качестве миметика природных инсулинотропных пептидов, следует учитывать его уязвимость протеиназами желудочно-кишечного тракта.

Трипсин гидролизует пептидную связь лизина (и аргинина) с последующим аминокислотным остатком, поэтому связь **KN** может быть легко гидролизована трипсином из-за повышенной локальной плотности положительного заряда (лизин и амидная группа аспарагина). Замена аспарагинового остатка остатком глутаминовой кислоты обеспечивает локальную нейтрализацию заряда боковой группы лизина и защиту пептидной связи **KE** от действия трипсина. Однако пептидная связь **WK** и **WA** в составе природных полипептидов подвергается гидролизу химотрипсином. Химотрипсин специфически связывает большие гидрофобные боковые группы фенилаланина, тирозина и триптофана и разрывает их связь с последующим аминокислотным остатком, поэтому в желудочно-кишечном тракте пептидная связь **WK** и **WA** представленных полипептидов подвергается гидролизу химотрипсином. Триптофан, расположенный на конце тетрапептида **KEDW**, не будет атакован химотрипсином. Однако целесообразно амидировать концевую карбоксильную группу триптофана для защиты от возможного действия эластазы поджелудочного сока.

Таким образом, в качестве синтетического миметика инсулинотропных гормонов в лаборатории химии пептидов (рук. — канд. хим. наук Е.И. Григорьев) Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН был сконструирован и синтезирован по оптимальной схеме тетрапептид **KEDW_a**, защищенный от действия протеиназ желудочно-кишечного тракта [11]. Его биологическая активность была проверена на модели аллоксанового диабета у крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 18 белых беспородных крысах-самцах со средней массой 375 ± 35 г. После определения концентрации инсулина в крови животных их рандомизированно разделили на 2 группы: контрольную и экспериментальную (8 и 10 особей соответственно). Всем животным однократно внутривенно вводили по 1 мл раствора аллоксана в дозе 35 мг/кг массы. Через 15 сут у крыс развился диабет, и концентрация инсулина в крови снизилась в 12-15 раз по сравнению с исходной (таблица). Затем животным контрольной группы ежедневно внутрибрюшинно вводили по 0.3 мл 0.9% раствор NaCl, а животным экспериментальной группы — тетрапептид **KEDW_a** в дозе 3 мкг (в 0.3 мл 0.9% раствора NaCl) в течение 11 сут.

После окончания введения тетрапептида в опытной группе концентрация инсулина в крови повысилась, тогда как в контрольной группе инсулин в крови полностью отсутствовал.

У всех животных с аллоксановым диабетом через 44 дня после окончания введения тетрапептида оценивали динамику усвоения глюкозы. Для этого им внутривенно вводили 1 мл 2% раствора глюкозы и измеряли ее уровень в крови в течение 2 ч. В качестве второго контроля использовали здоровых крыс с нормальным уровнем глюкозы в крови. После введения глюкозы здоровым крысам ее концентрация в течение 2 ч

Влияние пептида **KEDW_a** на уровень инсулина в крови крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$, мкМЕ/мл)

Группа	Исходный уровень	Через 15 сут после введения аллоксана	Время после окончания введения тетрапептида, сут				
			1	9	18	28	44
Контрольная	24.3±2.1 (8)	2.0±0.7 (8)	0 (7)	0 (6)	0 (5)	0 (5)	0 (5)
Опытная (тетрапептид)	23.8±2.8 (10)	1.5±0.4 (10)	3.6±0.7* (8)	3.2±0.5* (7)	4.3±0.5* (7)	4.1±0.6* (7)	3.9±1.1* (7)

Примечание. В скобках — количество животных. * $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

уменьшилась практически до начального уровня (рис. 1, 1). Глюкоза, введенная животным опытной группы, получавшим пептид $KEDW_a$, быстро усваивалась и через 2 ч ее концентрация была ниже начального значения (рис. 1, 2). Скорость усвоения глюкозы у крыс с экспериментальным диабетом, получивших пептид, была сопоставима с таковой у здоровых животных. При введении глюкозы крысам контрольной группы начальная повышенная концентрация глюкозы в крови возрастала и в дальнейшем уменьшалась очень медленно, не достигая исходного значения (рис. 1, 3).

Механизм возникновения экспериментального сахарного диабета заключается в следующем. Аллоксан по своему строению близок к природным пиримидиновым основаниям урацилу и тимину, поэтому может конкурировать с природными нуклеиновыми основаниями, встраиваясь по механизму интерколяции в структуры РНК и ДНК, и ингибировать синтез белков, в том числе инсулина. Вероятный механизм индукции биосинтеза инсулина пептидом $KEDW_a$, по-видимому, обусловлен взаимодействием этого тетрапептида с промоторным участком гена препроинсулина. Связывание тетрапептида в большой канавке двойной спирали ДНК на промоторном участке гена, вероятно, может привести к конкурентному вытеснению аллоксана гидрофобной боковой группой остатка триптофана. Продуктом трансляции этого гена является препроинсулин. Сигнальный пептид этой молекулы облегчает мембранный переход предшественника инсулина

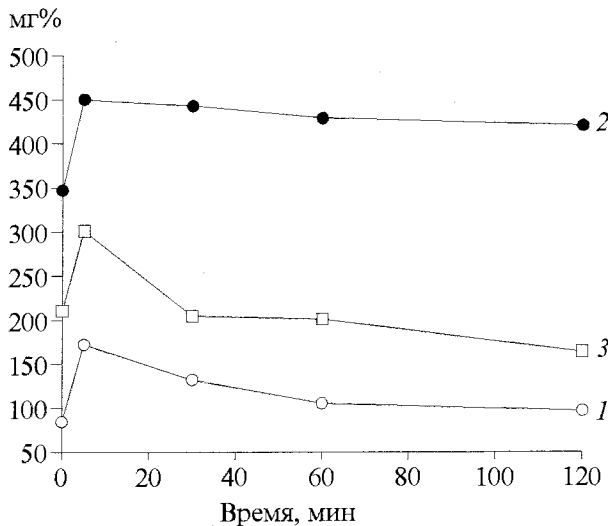


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови крыс после ее внутривенного введения. 1 — здоровые животные; 2 — крысы с аллоксановым диабетом (контроль); 3 — крысы с аллоксановым диабетом после введения тетрапептида $KEDW_a$.

и отщепляется после перехода. Полученная молекула проинсулина содержит пептидные цепи А и В, соединенные участком С. После энзиматического удаления этого участка между цепями А и В устанавливаются дисульфидные связи, специфические для природного инсулина.

Используя разработанный нами ранее метод оценки комплементарных взаимодействий коротких пептидов с нуклеотидными последовательностями двойной спирали ДНК, мы определили последовательность нуклеотидов, которая может комплементарно связывать тетрапептид $KEDW_a$ в большой канавке ДНК [5,8]. Эта последовательность составила 6 п.о. $ggcagg$ и $cctgcc$ на ведущей цепи ДНК гена препроинсу-

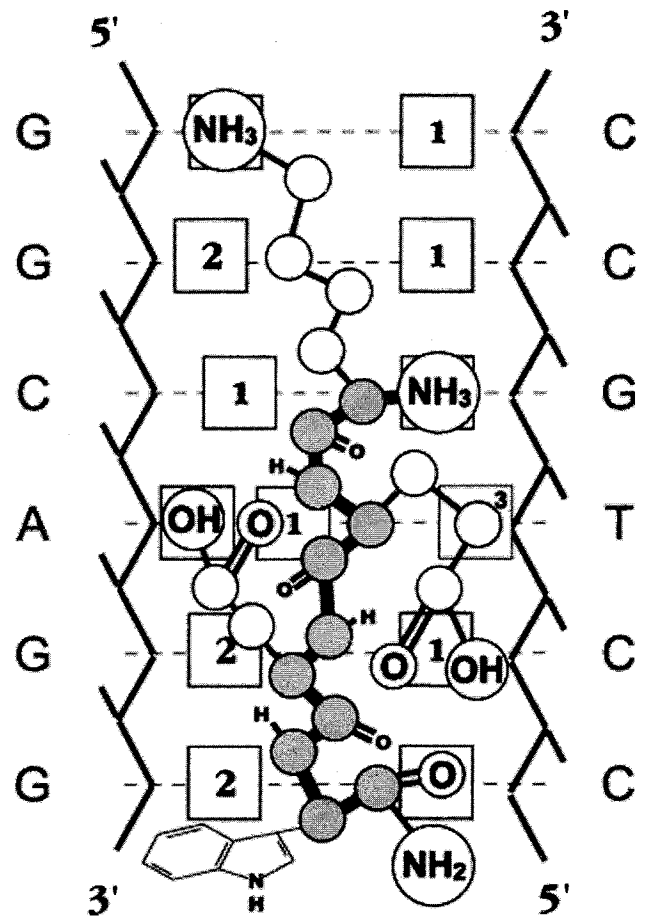


Рис. 2. Комплементарное связывание тетрапептида $KEDW_a$ с нуклеотидными основаниями в большой канавке двойной спирали ДНК.

1 — аминогруппы аденина и цитозина; 2 — атомы 7N аденина и гуанина; 3 — метильная группа тимина. Пунктирные линии — плоскости нуклеотидных пар. Темные кружки — каркас основной пептидной цепи; светлые — атомы боковых групп аминокислотных остатков. Ароматическая группа триптофана расположена параллельно плоскости гуанина (перпендикулярно к плоскости рисунка), т.к. ориентируется стэкинг-эффектом.

лина [13], на промоторном участке которого (2423 п.о.) было обнаружено 14 таких участков, что может служить основанием для экспериментальной проверки гипотезы. Представлена проекция боковых групп тетрапептида, взаимодействующих с функциональными группами нуклеотидной последовательности ggcsagg двойной спирали ДНК (рис. 2).

Таким образом, сконструирован тетрапептид KEDW_a, обладающий способностью инициировать транскрипцию гена и синтез инсулина при аллоксановом диабете у крыс. Это позволяет разрабатывать новые лекарственные препараты для лечения больных сахарным диабетом.

Автор выражает благодарность академику РАМН И.П.Ашмарину, профессору Л.К.Шатаевой, профессору В.В.Малинину, канд. хим. наук Е.И.Григорьеву и канд. биол. наук А.М.Ульянову за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 250-253.
2. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. // Биохимия. 1986. Т. 51, № 4. С. 531-544.
3. Климов П.К. Пептиды и пищеварительная система. Л., 1983.
4. Тутельян В.А., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. // Бюл. exper. биол. 2003. Т. 135, № 1. С. 4-10.
5. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Бондарев И.Э. // Успехи соврем. биол. 2003. Т. 123, № 5. С. 467-474.
6. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Чернова А.А. // Бюл. exper. биол. 2003. Т. 136, № 9. С. 328-330.
7. Шатаева Л.К., Ряднова И.Ю., Хавинсон В.Х. // Успехи соврем. биол. 2002. Т. 122, № 3. С. 282-289.
8. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем. Факты и гипотезы. СПб., 2003.
9. Ashcroft F.M., Ashcroft, S.J.H. // Insulin: molecular biology to pathology. Oxford, 1992. P. 97-150.
10. Higashimoto Y., Liddle R.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 193, N 1. P. 182-190.
11. Sewald N., Jakubke H.-D. Peptides: chemistry and biology. Weinheim, 2002.
12. Tseng C.C., Jarboe L.A., Landau S.B. et al. // J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993. Vol. 90, N 5. P. 1992-1996.
13. Ullrich A., Dull T.J., Gray A. et al. // Science. 1980. Vol. 209, N 4456. P. 612-615.

Получено 24.05.06