

С.М.Толпыго

**«ХИМЕРНЫЕ» ФОРМЫ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ
И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ***НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, Москва*

The comparative analysis of physiological activity of «chimeras» complexes Angiotensin-II and β -Endorphin with proteins and native peptides was performed. Some behavioral responses after active immunization by conjugates Angiotensin II and β -Endorphin with proteins were obtained. It's suggested that «chimeras» forms of regulatory peptides play a specific informational role in systemic organization of behavior. An important function of this substances due to it's conformational properties and it's participation in hierarchical organization of integrative processes in nervous system is discussed.

Традиционно считают, что функции любого регуляторного пептида (РП) определяются активностью его свободных форм за счет комплементарного связывания лиганда с активным центром клеточного рецептора. Полагают, что РП обуславливают последовательно: запуск каскадов сигнальной трансдукции, изменение экспрессии внутриклеточных белков с участием генома, формирование специфического эффекторного ответа клетки. Эти ответы реализуются в виде секреции клетками специфических продуктов (гормоны, белки и др.), сопряженных изменений содержания других биологически активных веществ, модуляции функций внутренних органов и др. [1,2]. В целом физиологическая активность РП многообразна. Их рассматривают в качестве адаптогенов, нейротрансмиттеров, модуляторов, цитокинов и др., участвующих в регуляции многих физиологических функций [2]. Особо отчетливо многообразии функций РП выявляется при исследовании их роли в организации целостных поведенческих актов. Однако среди нескольких тысяч известных и идентифицированных РП можно выделить лишь несколько десятков соединений, оказывающих отчетливое влияние и на поведение. При этом число РП, проявляющих строгую специфичность, например, при инициации той или иной биологически окрашенной формы поведения еще меньше [2].

Образование комплексов любых биорегуляторов с белками на уровне клетки является неременным условием реализации их активной физиологической функции. Это особенно важно для обеспечения сигнально-информационных взаимоотношений в ходе взаимодействия лигандов с мембранными, цитозольными и ядерными рецепторами. Полагают, что вне клетки комплексы биорегуляторов (включая РП) с белками-носителями (альбумины, глобулины, антитела и др.) являются физиологически активными в случаях выполнения ими транспортных, депонирующих и других вспомогательных функций.

В наших исследованиях были обнаружены и описаны долгосрочные эффекты свободных форм РП, а также зависимость этих эффектов от исходного мотивационного состояния и индивидуальных типологических особенностей животных [3]. Эти эффекты теоретически нельзя связать с активностью только свободных форм РП в силу относительной химической нестабильности их молекул и краткосрочности их физиологического действия.

С целью выявления роли белково-пептидных комплексов (БПК) в регуляции физиологических

функций искусственно синтезировали «химерные» соединения специфического мотивационного (жажда) пептида ангиотензина-II (А-II) и неспецифического подкрепляющего пептида β -эндорфина (β -Э) с гетерологичным белком-носителем — бычьим сывороточным альбумином (БСА). Эти «химерные» комплексы рассматривали в качестве модельных аналогов естественных эндогенных БПК. Подобного рода соединения являются иммуногенными, так как представляют собой модифицированное белковое «свое», в соответствии с иммунологической терминологией. На это указывает обнаружение естественных аутоантител ко многим РП, в частности и к А-II и β -Э. Описаны иммунные сети, включающие идиотипические и антиидиотипические аутоантитела. Эти аутоантитела могут обладать свойствами самих пептидов, их антагонистов или свойствами ферментов их преобразующих [4].

Предварительно нами были проведены работы по синтезу БПК А-II и β -Э с БСА и оценке их физико-химических свойств. Синтез осуществляли с применением бифункциональных связывающих соединений, химически соединяющих молекулы РП (А-II и β -Э) с молекулой белка-носителя (БСА). При приготовлении А-II использовали карбодимидный метод. Полученный таким методом БПК содержал 10-12 молекул пептида на одну молекулу белка. При синтезе β -Э в качестве связывающих агентов использовали глутаровый альдегид и бис-диазобензидин. Такие БПК содержали 4-6 и 8-10 молекул пептида на 1 моль белка соответственно.

Сопоставляли эффекты системного введения БПК А-II и β -Э и свободных форм этих пептидов. Было обнаружено, что БПК А-II и β -Э с БСА характеризуются более широким, чем свободные А-II и β -Э, спектром физиологической активности и более длительными эффектами действия на различные формы врожденного поведения (пищевое, питьевое, пассивное избегание, двигательная активность) и вегетативные показатели у крыс (рис.1). Минимальные эффективные дозы БПК А-II и β -Э с БСА оказались значительно меньшими, чем минимальные эффективные дозы свободных форм А-II и β -Э. Было выявлено также, что спектры физиологической активности БПК β -Э и А-II, в отличие от их свободных форм, как бы «перекрывались». Так, например, при введении БПК А-II у крыс наряду с жадой и артериальной гипертензией отмечали также проявления груминга, пищевого поведения и гипоалгезию характерные для БПК β -Э (см. рис.1).

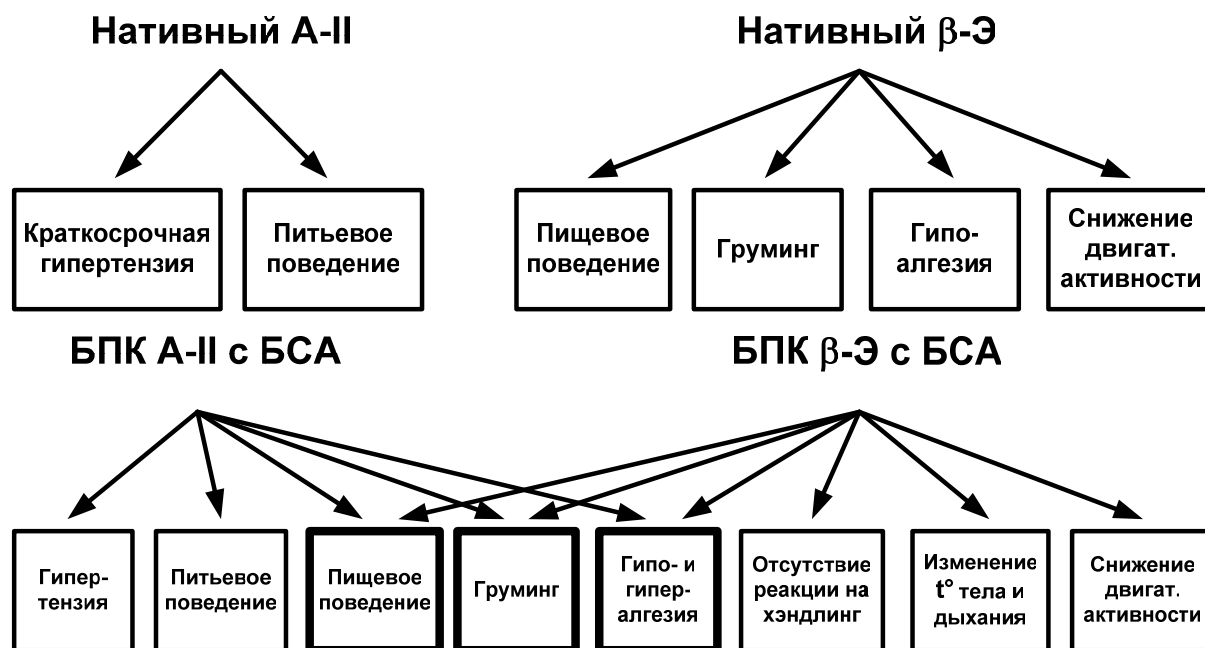


Рис.1. Спектры физиологической активности ангиотензина-II и β-эндорфина в нативной форме и в составе БПК

Известно, что белковые молекулы проявляют способность к конформационным перестройкам и, следовательно, имеют высокую информационную емкость [5]. Продemonстрированные нами феномены расширения и «перекрывания» спектров физиологической активности БПК А-II и БПК β-Э позволяют предположить, что эндогенные соединения подобного рода не только увеличивают активность и пролонгируют действие РП, входящих в их состав, но и обеспечивают кооперативное участие БПК в ходе развития и реализации приспособительной деятельности. Впрочем, это предположение было сделано на основе анализа эффектов экзогенного введения БПК А-II и БПК β-Э, т.е., при использовании экспериментально-методической схемы «плюс-вещество», характерной для фармакологических исследований. Между тем, мы отмечали, что БПК являются иммуноактивными соединениями, при этом эндогенные БПК, вероятно, играют роль индукторов образования естественных регуляторных аутоантител в организме. Это и обусловило применение иммунологического подхода к анализу собственно физиологической роли «химерных» форм РП в системной организации физиологических функций.

В наших экспериментах было показано, что иммунизация БПК А-II вызывает у крыс длительное полидипсию, снижение двигательной активности, гипоалгезию, тенденцию к гипотонии. При этом в крови у животных на фоне возрастания титра антител к А-II увеличивалось содержание альдостерона, кортизола, ангиотензина-I, возрастала активность ангиотензинпревращающего фермента, что косвенно указывало на увеличение содержания А-II и свидетельствовало об изменении процессов его синтеза и деградации (см. рис.2).

Было обнаружено также, что иммунизация БПК β-Э длительно увеличивает потребление пищи (без увеличения массы тела), вызывает фазные изменения болевой чувствительности (гипо- и гипералгезия), уменьшает реакцию на «хэндлинг», изменяет иерархический статус животных в группе. Сопреженные биохимические изменения на фоне увеличения титра антител к β-Э проявлялись в виде увеличения содержания в плазме β-Э, тироксина, снижения содержания АКТГ, кортизола и др., что свидетельствует об изменении процессов синтеза и деградации также и β-Э (см. рис.2). Использование БПК А-II и β-Э в качестве антигенов при иммунизации животных привело, таким образом, к развитию симптомокомплексов изменений поведения и сопутствующих им сдвигов биохимических показателей в крови и структурах мозга, характерных для действия свободных форм этих пептидов, но имеющих длительное течение. Данный факт мы спекулятивно рассматриваем как «фиксацию», а в последующем и стабилизацию, более широкого, чем у свободных форм РП, спектра физиологической активности «химерных» РП.

Обращает на себя внимание однонаправленность эффектов экзогенного введения свободных и связанных с белком А-II и β-Э и эффектов активной иммунизации животных БПК А-II и β-Э на простые формы целенаправленного поведения, обнаруживаемых преимущественно на основе врожденных генетически детерминированных механизмов, а также яркая выраженность и длительность последствий иммуногенных воздействий. Иммунизация БПК РП сначала как бы «вскрывала», а затем способствовала длительной манифестации их физиологического действия в различных видах поведенческой деятельности. Полученные результаты убедили нас также, что иммунизацию можно использовать не только в качестве способа направленной иммунной модуляции физиологических функций, но и как самостоятельный экспериментальный прием изучения естественной физиологической роли эндогенных БПК. Следует отметить также, что спектры физиологической активности неспецифического подкрепляющего пептида

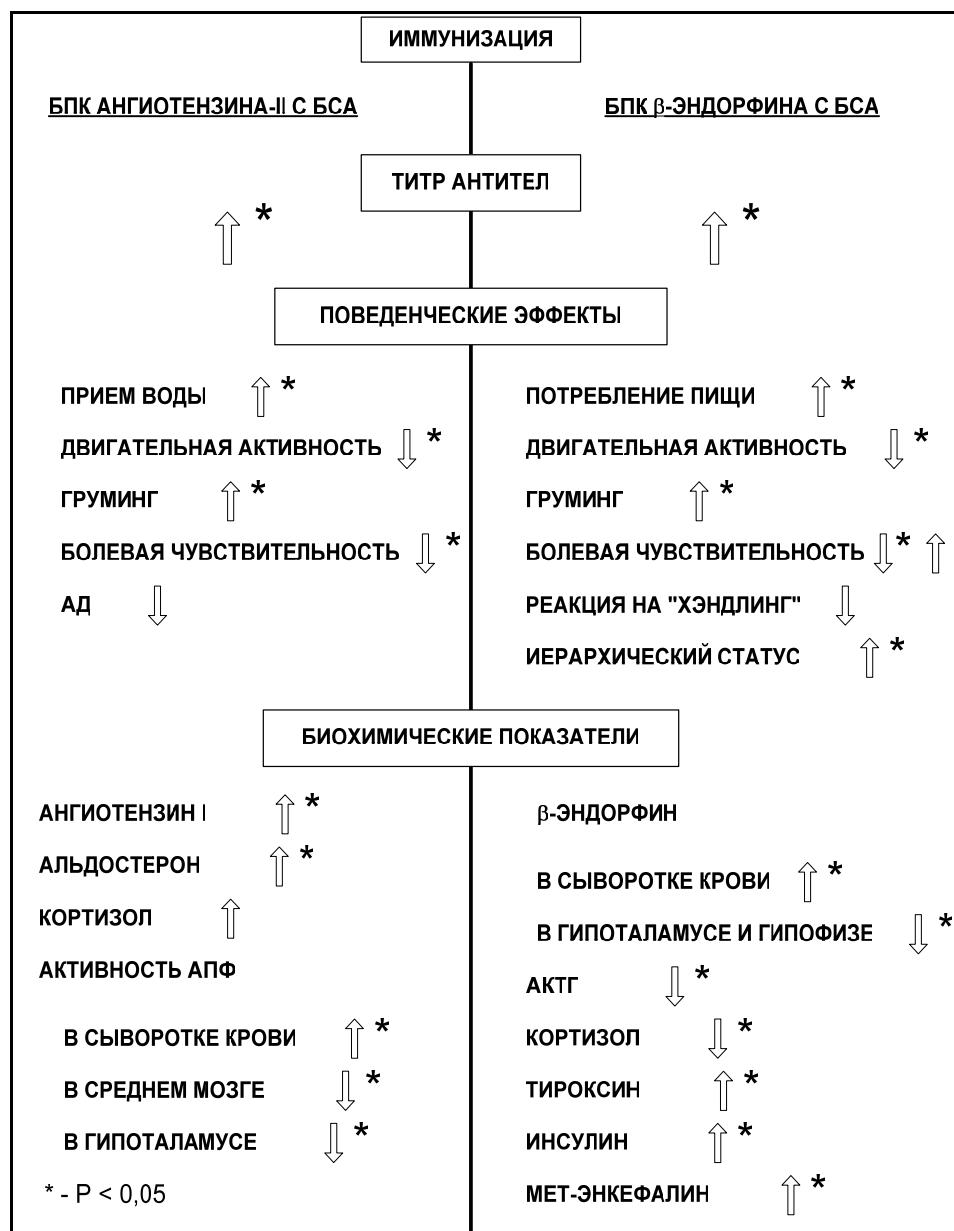


Рис.2. Эффекты активной иммунизации БПК ангиотензина-II и БПК β-эндорфина у животных. Стрелка вверх — стимулирующее, стрелка вниз — подавляющее действие на регистрируемый показатель; * — $P < 0,05$

β-Э и БПК β-Э качественно принципиально не различались. Можно констатировать, что при связывании β-Э с белком-носителем его физиологическое действие лишь приобретало пролонгированный фазный характер. Одновременно у А-II — пептида, оказывающего избирательное мотивационное действие, связывание с белком приводило к расширению спектра его активности и ее «перекрыванию» со спектром физиологической активности β-Э. БПК А-II характеризовался уже новыми сигнально-информационными свойствами по сравнению со свободной формой А-II.

В наших исследованиях на модели питьевого инструментального поведения [6] было показано, что «химерные» комплексы β-Э и А-II с БСА, в отличие от их свободных форм, оказывают однонаправленное активирующее действие на реализацию приобретенного навыка, не влияя на осуществление генетически детерминированного поведения — потребления воды

в условиях свободного доступа к ней. Была предложена гипотеза, что БПК как самостоятельный класс информационно-емких соединений играют особую роль в организации мотивационно-подкрепляющих отношений. Можно высказать несколько спекулятивных соображений о механизмах образования эндогенных «химерных» БПК и их вовлечении в системную организацию целенаправленного поведения.

Реализация мотивационно-обусловленного врожденного поведения осуществляется с помощью сигнальных молекул, функции которых детерминированы генетически. В свою очередь, в инициации же и осуществлении приобретенных форм поведения участвуют, по-видимому, иные, модифицирующиеся в ходе обучения сигнальные молекулы. Об этом косвенно свидетельствуют данные о синтезе новых белковых соединений в процессе обучения животных новым навыкам.

На примере А-II и β -Э как ключевых пептидов, участвующих соответственно в инициации жажды и регуляции подкрепления, рассмотрим гипотетические пути образования их эндогенных БПК в организме.

По мере нарастания сроков жажды в организме в естественных физиологических условиях уровень эндогенного А-II прогрессивно увеличивается [7]. При взаимодействии А-II с АТ1 рецепторами запускается множество каскадов сигнальной трансдукции [8], среди которых особый интерес представляют следующие: 1) сопряженная интраклеточная трансактивация мембранных рецепторов ростовых факторов, обуславливающая увеличение синтеза белков; 2) увеличение активности тирозинкиназ, сопровождающееся образованием свободно радикальных соединений; это создает предпосылки к модификации внутриклеточных и мембранных белков, в частности молекул комплекса клеточной адгезии, способствуя образованию новых межклеточных связей; 3) интернализация комплекса А-II с рецептором в цитоплазму клетки, а затем и в ядро.

Механизмы интернализации комплекса А-II-рецептор гетерогенны. Отметим лишь тот механизм эндоцитоза А-II, при котором после диссоциации лиганд-рецепторного комплекса рецептор вновь встраивается в мембрану, а лиганд (А-II) экзоцитируется в межклеточное пространство. Возможно, что в условиях нарастания жажды А-II в ходе его экстернализации связывается с секретирующимися клеткой эффекторными белками, образуя соответствующий БПК. Эти вновь образованные БПК выделяются в межклеточное пространство, а затем и в биологические жидкости организма. БПК А-II является уже вновь сформированной сигнальной молекулой, которой присущи новые информационные свойства. В условиях пищевой депривации в организме прогрессивно увеличивается также и уровень эндогенного β -Э. Известно, что β -Э, как и другим опиоидным пептидам (ОП), принадлежит важная роль в регуляции иммунных процессов и модуляции иммунного ответа на эндогенные и экзогенные антигены. Так, на мембранах лимфоцитов обнаружены все типы опиатных рецепторов. Выявлено, что иммуннокомпетентные клетки экспрессируют гены проопиомеланокортина, проэнкефалинов и других белков-предшественников, способны синтезировать и секретировать ОП. Известно также, что опиоидные пептиды модулируют образование антителообразующих клеток, активность естественных киллеров в периферической крови и в селезенке, увеличивают активность Т-лимфоцитов [9]. Существенно, что опиатные рецепторы циклически изменяют активность за счет их интернализации при связывании с эндогенным лигандом и преобразований в ходе процессов сигнальной трансдукции [10]. Это позволяет предположить, что БПК опиоидных пептидов способствуют приобретению этими рецепторами определенных функциональных свойств и вовлечению механизмов «иммунной памяти» в фиксацию информации об их включении в новую, сформировавшуюся при длительном мотиваци-

онном возбуждении, нейрохимическую организацию. Это согласуется с данными последних лет о повышенной способности опиатных рецепторов образовывать гомо- и гетеро-олигомерные комплексы [11,12], причем такие олигомерные комплексы рецепторов характеризуются и гетерогенностью сигнальной трансдукции, соединяя в себе принципиально новые и специфические для каждого из компонентов черты. По-видимому, БПК опиоидных пептидов являются эндогенными индукторами образования подобного рода рецепторных комплексов.

Гипотетически представляется, что в организме животных и человека молекулы БПК А-II и β -Э вовлекаются в различные процессы внутри- и межсистемной интеграции функций. В случае системной организации мотивации жажды свободный А-II, вероятно, включается в механизмы ее быстрого, немедленного удовлетворения. В свою очередь, длительное сохранение информации о потребности в воде и способах ее удовлетворения у необученных животных, по-видимому, обеспечивают информационно-емкие и стабильные молекулы БПК А-II. В отличие от А-II, связанного с белком, БПК β -Э участвует в процессах межсистемной интеграции, обеспечивающих фиксацию информации о свойствах подкрепления при системогенезе новых поведенческих актов.

Таким образом, можно полагать, что различные «химерные» комплексы А-II и β -Э обеспечивают функциональное сопряжение нейрогуморальных и иммунных механизмов в системной организации регуляции физиологических функций в постоянно меняющихся условиях внешней среды.

Работа выполнена в рамках научной программы Министерства образования РФ «Университеты России» (проект УР.11.01.014 «Конъюгированные формы пептидов и факторы апоптоза в регуляции целенаправленного поведения животных»).

1. Ашмарин И.П., Королева С.В. // Вестник РАМН. 2002. №6. С.40-48.
2. Гомазков О.А. Мозг и нейропептиды: Справ.-информ. изд. М.: ИБМХ, 1997. 170 с.
3. Котов А.В., Толпыго С.М., Певцова Е.И., Обухова М.Ф. // Вестник РАМН. 2005. № 8. С.30-36.
4. Мягкова М.А. Естественные антитела к низкомолекулярным соединениям. М.: МГУ, 2001. 370 с.
5. Лопухин Ю.М., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 2000. Т.130. № 7. С.4-9.
6. Толпыго С.М. // Вестник РАМН. 1999. № 6. С.52-55.
7. Fitzsimons J.T. // Physiol. Rev. 1998. V.78. № 3. P.583-686.
8. Kurdi M., De Mello W., Booz G.W. // Int. J. Biol.Chem. Cell Biol. 2005. V.37. P.1357-1367.
9. Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Терашвили М., Малкова Н.В. // Патолог. физиология и эксперимент. терапия. 2004. № 3. С.15-23.
10. Bodnar R.J., Hadjimarkou M.M. // Peptides. 2003. V.24. №9. P.1241-1302.
11. Breitwieser G.E. // Circ. Res. 2004. V.94. P.17-27.
12. Gasi L., Lopez-Gimenenez J.F., Strange P.G. // Current Opinion in Drug Discovery & Development. 2002. V.5. №5. P.756-763