

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Н. А. ЮДАЕВ, З. Ф. УТЕШЕВА, Т. Е. НОВИКОВА,
Ю. П. ШВАЧКИН, А. П. СМИРНОВА

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ ПЕПТИД, СТИМУЛИРУЮЩИЙ ОСВОБОЖДЕНИЕ РОСТОВОГО ГОРМОНА *

(Представлено академиком С. Е. Севериным 14 II 1973)

В настоящее время в литературе имеются данные только по частичной очистке гипоталамического фактора, стимулирующего секрецию ростового гормона (СТГ). Декапептид, выделенный Шелли⁽³⁾ из гипоталамуса свиньи и названный рилизинг-фактором, как показали недавно сами авторы⁽⁴⁾, таковым не является. Целью данной работы было выделение и очистка гипоталамического препарата, освобождающего из гипофиза *in vitro* СТГ, и выяснение структуры этого препарата.

Замороженные гипоталамические фрагменты крупного рогатого скота размельчали и последовательно обрабатывали ацетоном и 2M уксусной кислотой. Уксуснокислый экстракт лиофилизовали и пропускали через колонку (1,3 × 4,5 см) с Сефадексом Г-25. Фракцию, элюируемую с R_f 0,63–0,53, исследовали методом хроматографии на КМ-целлюлозе. Активный материал адсорбировали на ионообменнике из 0,005M аммонийно-ацетатного буфера рН 4,5 и элюировали 0,1M NaCl на 0,04M аммонийно-ацетатном буфере рН 6,5. Использование для дальнейшей очистки гель-фильтрации сначала на колонке с Сефадексом Г-15 (рис. 1), а затем — с Г-10 (рис. 1б) привело после повторного пропускания через Сефадекс Г-10 к получению элюирующегося одним пиком препарата.

Выделенный препарат активен *in vitro* в пикограммовых дозах. Определение активности проводили следующим образом. Гипофиз крыс-самцов весом 140–160 г после удаления задней доли делили на две половины и помечали одну половинку в контрольную пробу, другую — в опытную. Каждая проба содержала 10–12 половинок аденогипофизов. После предварительной 3-часовой предынкубации в Кребс-Рингеровском растворе рН 7,4 (0,1 мл среды на 2 мг ткани), среду заменяли свежей, в опытную пробу добавляли исследуемый препарат, и пробы инкубировали в течение 1 часа. Ростовой гормон в инкубационной среде определяли с помощью электрофореза в поликарбидном геле⁽⁵⁾. По окончании электрофореза столбики геля окрашивали 0,01% раствором амидо-черного. Окрашенные полосы, соответствующие СТГ, вырезали из геля, краску элюировали смесью метанол: 1N NaOH = 1:1. О количестве СТГ судили по величине поглощения при 570 мμ.

На основании элюции активности с Сефадекса Г-10 в объеме большем, чем свободный объем колонки, можно полагать, что молекулярный вес препарата меньше 700. Эти данные подтверждены при определении аминокислотного состава с помощью автоматического микроанализатора Technicon: в препарате обнаружены в эквимолярных соотношениях серин, глутаминовая кислота и глицин. Определение N-концевой аминокислоты дансила-методом показало, что она не свободна. Наличие блокированной N-концевой аминокислоты в пептиде сделало невозможным использование метода Эдмана для установления последовательности. Поэтому в дальнейшем исследовании структуры выделенного пептида мы исходили из сле-

* Предыдущие сообщения см. (1, 2).

дующих соображений. На основании отсутствия свободной N-концевой аминокислоты и наличия в составе препарата глутаминовой кислоты мы предположили, что на N-конце выделенного нами пептида может находиться пироглутамовая кислота, как в молекулах рилизинг-факторов тиреотропина (⁶) и гонадотропинов (⁷). Кроме того, мы полагали, что на C-конце исследуемого пептида может находиться глицинамид, который в

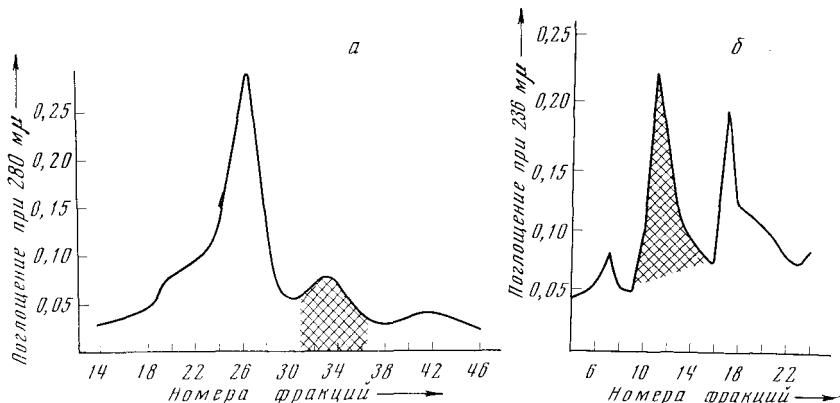


Рис. 1. Гель-фильтрация на колонках с сефадексом Г-45 (а) и с сефадексом Г-10 (б). Размеры колонок $1,2 \times 0,96$ см, объем фракций 2,4 мл. Активная зона заштрихована

составе трех аминокислот обнаружен в нашем препарате, а в молекулах рилизинг-фактора гонадотропинов (⁷) и факторов, ингибирующих освобождение мелапоцитстимулирующего гормона (^{8, 9}), глицинамид занимает С-концевое положение. На основании этих предпосылок твердофазным методом был синтезирован трипептидамид пироглутамил-серил-глицинамид. Установлено, что синтетический и природный препараты имеют одинаковые R_f при гель-фильтрации на колонке с Сефадексом Г-10, аминокислотный состав и блокированную N-концевую аминокислоту. В отношении биологической активности оказалось, что оба пептида в дозе 0,1 нг на одну половину аденогипофиза способны увеличивать освобождение ростового гормона в 2–3 раза по сравнению с контрольной пробой. Синтетически полученные аналоги трипептидамида: со свободной N-концевой аминокислотой — глутамил-серил-глицинамид, с измененной последовательностью пироглутамил-глицил-серинамид и с заменой С-концевой аминокислоты — пироглутамил-серил-аспарагинамид в этой и на порядок большей дозах не были активны. Полученные данные позволяют предположить, что гипоталамический пептид, стимулирующий *in vitro* освобождение СТГ, представляет пироглутамил-серил-глицинамид.

Институт экспериментальной
эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
12 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Юдаев, З. Евтихина, В сборн. Современные проблемы эндокринологии, в. 4, М., 1972, стр. 8. ² Н. Юдаев, З. Утешева, В кн. Актуальные проблемы физиологии, биохимии и патологии эндокринной системы, Тез. докл. I Всесоюз. съезда эндокринологов, М., 1972, стр. 6. ³ A. Scallay, J. Baba, R. Nair, J. Biol. Chem., **246**, 6647 (1971). ⁴ J. Sandow, A. Arimura, A. Schally, Endocrinology, **90**, 1315 (1972). ⁵ U. Lewis, M. M. Zitteria, E. Cheever, Endocrinology, **85**, 690 (1969). ⁶ R. Burgess, T. Dunn et al., C. R., **268**, 2116 (1969). ⁷ A. Schally, A. Arimura et al., Science, **173**, 1036 (1971). ⁸ R. Nair, L. Kastin, A. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun., **43**, 1376 (1971). ⁹ R. Nair, A. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 1420 (1972).