

© А. А. Булатов, 1998

УДК 612.433.65.08

А. А. Булатов

СЕМЕЙСТВО КСЕНОБИОТИКОВ, СТИМУЛИРУЮЩИХ СЕКРЕЦИЮ ГОРМОНА РОСТА, И НОВАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Рассматриваются история открытия и свойства семейства низкомолекулярных ксенобиотиков пептидной и непептидной природы, избирательно стимулирующих секрецию гормона роста (ГР). Результаты исследования этих неприродных стимуляторов секреции ГР, их физиологических эффектов и механизмов действия *in vitro* и *in vivo*, взаимоотношений с ГР-рилизинг-гормоном (ГРРГ) и соматостатином (СС) — классическими природными регуляторами секреции ГР — послужили базой для открытия ранее не известной физиологической системы, контролирующей во взаимодействии с ГРРГ и СС и их рецепторами нормальную пульсовую секрецию этого гормона. Она включает уникальный сопряженный с G-белком рецептор, который обнаружен в гипофизе, гипоталамусе и гиппокампе и недавно клонирован, и эндогенный лиганд этого рецептора, который является, по-видимому, структурным и функциональным аналогом указанных выше ксенобиотиков.

*The history of discovery of low-molecular xenobiotics of peptide and non-peptide origin selectively stimulating growth hormone (GH) secretion is presented and the properties of this family are described. Results of study of these synthetic GH secretagogues, their physiological effects and mechanisms of *in vitro* and *in vivo* action, relationships with GH releasing hormone (GH-RH) and somatostatin (SS), classical natural regulators of GH secretion, underlie the discovery of a heretofore unknown physiological system regulating normal pulsatile secretion of GH in interactions with GH-RH and SS and their receptors. This system includes a unique G-protein coupled receptor which was detected in the pituitary, hypothalamus, and hippocampus and was recently cloned, and endogenous ligand of this receptor, apparently a structural and functional analog of the above xenobiotics.*

Гормон роста (ГР), или соматотропин, представляющий собой регуляторный белок с мол. массой около 22 кД, секретируется центральной железой эндокринной системы — гипофизом. Являясь важнейшим регулятором процессов роста, он дает широкий спектр физиологических эффектов в организме, затрагивающих различные стороны белкового, жирового и углеводного обмена. В последнее время внимание исследователей привлекает возможная функция ГР как иммуномодулятора. Согласно классической схеме, контроль секреции ГР осуществляется гипоталамусом посредством двух его пептидных гормонов — соматотрибери́на, или ГР-рилизинг-гормона (ГРРГ), который ее стимулирует, и соматостатина (СС), который ее подавляет. Молекула ГРРГ у человека и ряда животных построена из 44 аминокислотных остатков, однако N-концевой 29-членный фрагмент сохраняет полную физиологическую активность этого гормона. СС состоит из 14 аминокислотных остатков и имеет за счет дисульфидного мостика между 3-м и 14-м остатками полуциклическую структуру. ГРРГ и СС, вырабатываясь нейросекреторными клетками гипоталамуса, достигают гипофиза через его портальную кровеносную систему и оказывают свое влияние на соматотрофы — высокодифференцированные клетки, имеющие специфические рецепторы к этим нейропептидам и продуцирующие ГР.

Одним из последних заметных событий в нейроэндокринологии и биохимии гормональной регуляции является открытие в организме животных и человека ранее не известной физиологической системы, регулирующей секрецию ГР гипофизом. Получены убедительные доказательства уча-

стия в контроле секреции ГР наряду с классическими гормонами гипоталамуса — ГРРГ и СС — еще одного регулятора и его специфического рецептора. Это открытие особенно примечательно из-за нетривиальности его истории и доказательств, лежащих в его основе. Целью настоящей статьи является анализ этих доказательств, полученных в результате изучения нового семейства ксенобиотиков, избирательно стимулирующих секрецию ГР.

История данного открытия началась еще в 1980 г., когда в США С. Bowers и соавт. [2, 3] синтезировали аналоги природного опиоидного пентапептида Met-энкефалина Tyr-DTrp-Gly-Phe-Met-NH₂ и Tyr-DPhe-Gly-Phe-Met-NH₂, которые были лишены опиоидной активности, но стимулировали секрецию ГР клетками гипофиза крыс *in vitro*. Несмотря на то что эти пептиды проявляли ГР-рилизинг-активность только при использовании в довольно высоких дозах (10–20 мкг/мл среды) и были неактивны *in vivo*, они представляли несомненный интерес, поскольку в то время химическая структура природного ГРРГ еще была неизвестна. Выделение, расшифровка структуры и химический синтез ГРРГ были впервые осуществлены лишь в 1982 г. Продолжение исследований по компьютерному моделированию, химическому синтезу, изучению биологической активности и структурно-функциональному анализу самых разных отделенных аналогов энкефалина привело к получению гексапептида His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂ с высокой ГР-рилизинг-активностью *in vitro* и *in vivo* [3]. Активность этого пептида, обозначенного как ГР-рилизинг-пептид-6

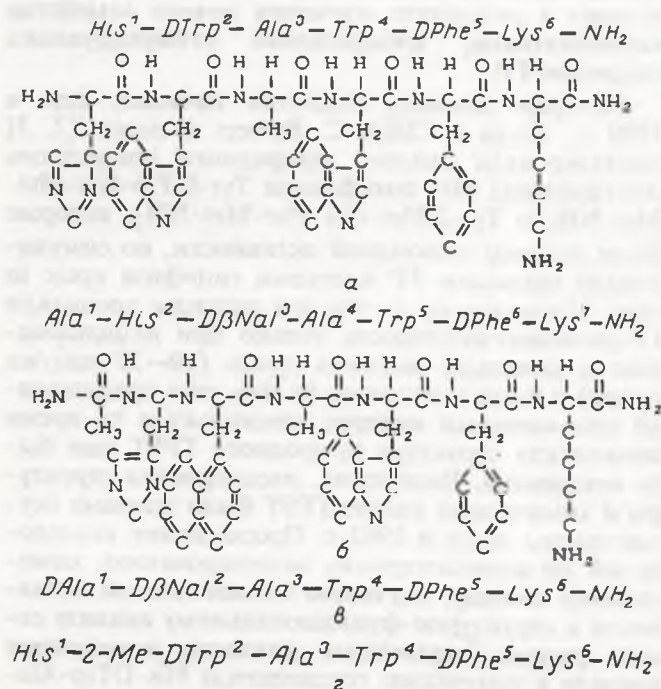
К настоящему времени различными группами исследователей синтезирован целый спектр родственных ГРРП, способных, подобно ГРРГ, усиливать секрецию ГР у экспериментальных животных и человека. Структуры наиболее активных и наиболее изученных ГРРП приведены на рис. 1. Их объединяют небольшие размеры (6—7 аминокислотных остатков) и наличие в качестве важных элементов D-стереоизомеров аминокислот или других неприродных аминокислотных остатков и ароматических колец в боковых цепях. ГРРП-1 по сравнению с ГРРП-6 имеет дополнительный остаток аланина на N-конце и неприродный β-нафтил-D-аланин вместо триптофана. ГРРП-2 наиболее близок по структуре к ГРРП-1 и отличается от последнего лишь наличием в 1-й позиции D-стереоизомера аланина и отсутствием гистидина, имеющегося в ГРРП-1 во 2-й позиции. Единственным различием в структурах гексарелина, синтезированного группой "Европептиды", и ГРРП-6 является замена D-триптофана на его 2-метилпроизводное.

Доказательства различия рецепторов ГРРГ и ГРРП были получены в опытах *in vitro* на клетках гипофи-

Имеющиеся сведения о биохимических событиях, вовлекающихся в физиологический эффект ГРПП, пока ограничены. Однако они свидетельствуют о том, что действие этих пептидов на соматотрофы опосредуется Ca^{2+} -зависимыми и по крайней мере частично цАМФ-зависимыми механизмами с участием протеинкиназы С. Следует заметить, что данные о возможности вовлечения цАМФ в механизмы действия различных ГРПП, полученных на разных экспериментальных моделях, носят противоречивый характер.

Синергизм в действии ГРРП и ГРРГ *in vivo* обнаруживается как у экспериментальных животных, так и у человека [3, 4, 10]. Например, сильный синергизм эффектов ГРРГ и ГРРП-1 выявлен при их совместном введении здоровым молодым людям [4].

В Эндокринологическом научном центре РАМН изучено действие одного из наиболее активных ГРП — ГРП-2 и комбинации этого пептида с ГРП(1—29)NH₂ — аналогом природного ГРП у детей с различными формами задержки роста [10]. У детей с идиопатической низкорослостью, когда функция соматотрофов сохранена, внутривенное введение ГРП-2 сопровождалось значительным и быстрым повышением уровня иммунореактивного ГР в сыворотке крови с пиком реакции через 15—30 мин после введения. При этом, как установлено в нашей лаборатории, имела место хорошая корреляция содержания в крови иммунореактивного и биологически активного ГР [1]. Последний определялся по стимуляции пролиферации клеток Nb2 лимфомы. Низкорослые дети с дефицитом ГР гипофизарного происхождения проявляли очень слабую реакцию на



а — ГРРП-6; б — ГРРП-1; в — ГРРП-2; г — гексарелин.

введение как ГРРП-2, так и ГРРГ (1—29)NH₂. При совместном введении ГРРП-2 и ГРРГ(1—29)NH₂ детям с идиопатической низкорослостью выявлен весьма значительный синергизм их действия. Стимуляция секреции ГР под влиянием комбинации пептидов более чем в 2 раза превосходила сумму реакций на индивидуальное введение каждого из пептидов. Таким образом, эффекты ГРРП и природного ГРРГ явно независимы и комплементарны. Вместе с тем их совместное действие в организме носит перmissive характер. У человека реакция на введение ГРРП-6 может частично подавляться предварительным введением синтетического рецепторного антагониста природного ГРРГ. Это означает, что для максимальной стимуляции секреции ГР под влиянием ГРРП-6 необходима оккупация специфических рецепторов ГРРГ их эндогенным лигандом.

Весьма важным с точки зрения потенциального использования ГРРП в клинической практике для дифференциальной диагностики или лечения различных форм нарушений роста является способность пептидов этого семейства стимулировать секрецию ГР при интраназальном и даже пероральном введении [4]. Однако при введении *per os* для достижения значительного физиологического эффекта требуются существенно более высокие дозы этих пептидов.

С целью изучения прямого влияния ГРРП на соматотрофы человека и возможных взаимоотношений этих стимуляторов секреции ГР с классическими гипоталамическими регуляторами — ГРРГ и СС — на уровне гипофиза в нашей лаборатории исследованы эффекты ГРРП-2 (отдельно взятого, а также в комбинации с ГРРГ(1—29)NH₂ или с СС) в первичных монослойных культурах клеток аденом гипофиза, секретирующих ГР или ГР и пролактин [5, 6]. Установлено, что ГРРП-2 способен, подобно ГРРГ, оказывать непосредственное избирательное действие на клетки гипофиза человека, усиливая секрецию ими ГР, но не пролактина. Согласно результатам наших экспериментов с использованием комбинации разных доз ГРРП-2 и ГРРГ(1—29)NH₂, совместное прямое действие двух стимуляторов секреции ГР в зависимости от их доз может быть аддитивным либо носить характер слабого синергизма. Это подтверждает тот факт, что ГРРП-2 и ГРРГ реализуют свое действие в гипофизе человека через различные рецепторы и пострецепторные сигнальные пути. Поскольку синергизм ГРРП-2 и ГРРГ(1—29)NH₂ *in vivo* проявляется явно больше, чем *in vitro*, есть основание предположить, что в условиях целого организма он реализуется за счет действия ГРРП-2 в основном на уровне гипоталамуса.

Интересным фактом, установленным в наших исследованиях [5] на культурах клеток аденом гипофиза человека, продуцирующих ГР, является то, что СС блокирует ГР-рилизинг-эффект ГРРП-2, ГРРГ(1—29)NH₂ или их комбинации в условиях, при которых этот ингибитор не влияет или слабо влияет на базальную секрецию ГР. Диссоциация влияния СС на базальную и стимулированную секрецию ГР, проявляющаяся значительно большей чувствительностью к СС последней, может быть связана со сложностью механизма действия

СС, который включает в себя разные внутриклеточные события, цАМФ-зависимые и цАМФ-независимые, опосредуемые Ca²⁺. Известно, что в клетках ГР-секретирующих аденом гипофиза человека СС может вызывать гиперполяризацию плазматической мембраны и таким образом инактивировать кальциевые каналы, что приводит к понижению внутриклеточной концентрации Ca²⁺. Имеющиеся данные о важной роли ионных каналов и Ca²⁺ в стимуляции секреции ГР позволяют предположить, что подавление в культурах клеток аденом гипофиза человека ГР-рилизинг-эффекта ГРРП-2 и ГРРГ в присутствии в среде СС может быть следствием вызываемой СС гиперполяризации мембраны соматотрофов и инактивации Ca²⁺-каналов.

Неожиданным поворотом в развитии работ по изучению ГРРП явился синтез исследователями фирмы "Мерк" непептидных низкомолекулярных стимуляторов секреции ГР с физиологическими характеристиками, свойственными ГРРП [7, 9]. Вначале было получено 2 родственных производных бензолактама (L-692,429 и L-692,585), оказавшихся довольно сильными стимуляторами секреции ГР *in vitro* и *in vivo*, в том числе у человека, а затем был синтезирован другой весьма активный низкомолекулярный непептидный стимулятор секреции ГР МК-0677, существенно отличающийся от двух предыдущих по химической структуре и представляющий собой спироиндолин сульфонамид. Дизайн этих соединений осуществлялся на основе структуры ГРРП как матрицы. Химические структуры L-692,429 и МК-0677 приведены на рис. 2.

В опытах *in vitro* на культурах клеток гипофизов крыс установлено, что действие бензолактамов и МК-0677 на секрецию ГР опосредуется теми же механизмами, что и действие ГРРП [7, 9]. Например, соединение L-692,429, подобно ГРРП-6, не влияло на внутриклеточную концентрацию цАМФ, но усиливало накопление цАМФ в клетках под влиянием ГРРГ и действовало синергично с ГРРГ на освобождение из клеток ГР. Соединение L-692,429 и ГРРП-6, добавленные вместе в культуру клеток в максимальных эффективных концентрациях, не вызывали дополнительного освобождения ГР в среду по сравнению с эффектом каждого из стимуляторов, добавленных по отдельности. Их максимальные эффекты были близки. Действие L-692,429, подобно действию ГРРП-6, подавлялось в присутствии СС. Концентрация МК-0677, необходимая для полумаксимальной стимуляции секреции ГР (ED₅₀), состав-

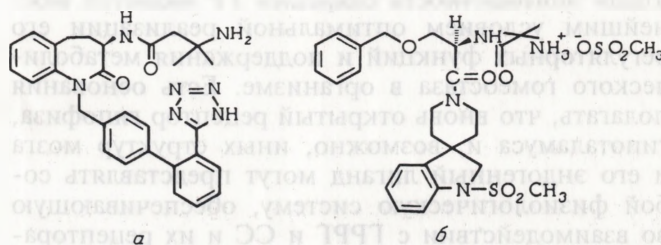


Рис. 2. Структура непептидных стимуляторов секреции ГР.

a — L-692,429; б — МК-0677.

ляла в одних и тех же условиях инкубации для МК-0677, L-692,585, ГРРП-6 и L-692,429 соответственно 1,6, 3,0, 10,3 и 60 нМ.

Детальное изучение действия соединения МК0677 у собак [9] показало, что его пероральное введение вызывает значительное и длительное увеличение содержания ГР в циркулирующей крови, которое сопровождается повышением уровня в крови инсулиноподобного ростового фактора-1, продуцирующегося в печени под влиянием ГР и являющегося посредником его рост-стимулирующего эффекта. Отмечена хорошая всасываемость МК-0677 в кишечнике, иначе говоря, высокая биодоступность при пероральном введении (более 60% от введенной дозы), тогда как биодоступность ГРРП и бензолактамовых производных при пероральном введении составляла лишь 1—3%.

Самым веским доказательством реальности существования эндогенного регулятора секреции ГР, родственного по своим свойствам ГРРП и их непептидным функциональным аналогам, явилась идентификация в гипофизе и гипоталамусе уникального сопряженного с G-белком рецептора, избирательно связывающего указанные неприродные стимуляторы секреции ГР [8].

Исследования в этом направлении были представлены в нескольких докладах на 10-м Международном конгрессе по эндокринологии (San Francisco, 1996 г.) и на 79-м Годичном собрании общества эндокринологов США (Minneapolis, 1997 г.). С помощью меченого ^{35}S МК-0677 рецептор с высокой аффинностью ($K_d = 200$ пМ) и ограниченной связывающей способностью был обнаружен во фракции плазматических мембран гипофиза и гипоталамуса. Новый рецептор, во-влекающийся в стимуляцию секреции ГР, был клонирован. Нуклеотидная последовательность кДНК, полученной для рецептора из гипофизов человека, свиньи и крысы, свидетельствовала об отсутствии значительной гомологии этого рецептора с каким-либо другим известным рецептором, сопряженным с G-белком. Методом гибридизации *in situ* доказана активная экспрессия мРНК нового рецептора в гипофизе, аркуатном и вентромедиальном ядрах гипоталамуса и некоторых зонах гиппокампа мозга крыс, а также в нормальной ткани и в ткани аденом гипофиза человека.

Хорошо известно, что нормальная физиологическая секреция ГР, как и многих других гормонов, имеет эпизодический характер с закономерной частотой и амплитудой отдельных пульсов. Такая эпизодичность секреции ГР является важнейшим условием оптимальной реализации его регуляторных функций и поддержания метаболического гомеостаза в организме. Есть основания полагать, что вновь открытый рецептор гипофиза, гипоталамуса и, возможно, иных структур мозга и его эндогенный лиганд могут представлять собой физиологическую систему, обеспечивающую во взаимодействии с ГРРГ и СС и их рецепторами пульсовой режим секреции ГР гипофизом. Обнаружено, что в противоположность "эффекту десенситизации", наблюдаемому *in vitro*, продолжи-

тельное воздействие соединения L-692,429 *in vivo* приводит к инициации и амплификации пульсового освобождения ГР, подобного физиологическому. Такой же эффект получен у человека при пероральном введении соединения МК-0677.

Суммируя все изложенное, отметим следующее. Компьютерное моделирование, химический синтез, изучение биологической активности и структурно-функциональный анализ коротких пептидов, представлявших собой отдаленные аналоги энкефалинов, привели к получению целого семейства низкомолекулярных пептидных и непептидных ксенобиотиков, способных избирательно стимулировать секрецию ГР клетками гипофиза. В свою очередь детальное исследование этих неприродных стимуляторов секреции ГР, их физиологических эффектов и механизмов действия *in vitro* и *in vivo*, взаимоотношений с ГРРГ и СС — классическими природными регуляторами секреции ГР — послужило базой для открытия новой физиологической системы, контролирующей нормальную пульсовую секрецию этого гормона. Она включает в себя уникальный сопряженный с G-белком рецептор, который присутствует в гипофизе, гипоталамусе и, возможно, в других структурах мозга и был недавно клонирован, и эндогенный лиганд этого рецептора, который является, по-видимому, структурным и функциональным аналогом указанных выше ксенобиотиков пептидной или непептидной природы. Открытие новой системы, участвующей в регуляции секреции ГР, несомненно, имеет принципиально важное теоретическое и практическое значение, заставляя по-новому оценить механизмы контроля соматотрофной функции гипофиза и патогенеза ее нарушений, а также возможности диагностики и коррекции этих нарушений. Хотя молекулярную структуру нового эндогенного стимулятора секреции ГР еще предстоит установить, уже сейчас очевидно, что в данном случае мы имеем определенную историческую аналогию, повторение ситуации с открытием в недалеком прошлом морфиноподобных пептидных биорегуляторов — энкефалинов и эндорфинов и опиоидной физиологической системы в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов А. А., Осипова Т. А., Раевская Г. В. // Бюл. экпер. биол. — 1996. — № 1. — С. 559—563.
2. Bowers C. Y., Momany F. A., Chang D. // Endocrinology. — 1980. — Vol. 106. — P. 663—667.
3. Bowers C. Y., Sartor A. O., Reynolds G. A., Badger T. M. // Ibid. — 1991. — Vol. 128. — P. 2027—2035.
4. Bowers C. Y. // Pediatr. Endocrinol. — 1993. — Vol. 6. — P. 21—31.
5. Bulatov A. A., Osipova T. A., Komolov I. S., Bowers C. Y. // International Congress of Endocrinology, 10-th: Abstracts. — San Francisco, 1996. — Vol. 1. — P. 229.
6. Bulatov A., Peterkova V., Osipova T., Tiupakov A. // Endocrinol. Metab. — 1997. — Vol. 4, Suppl. A. — P. 65—66.
7. Cheng K., Chan W., Butter B. et al. // Endocrinology. — 1993. — Vol. 132. — P. 2729—2731.
8. Howard A. D., Feighner S. D., Cully D. F. et al. // Science. — 1996. — Vol. 273. — P. 974—977.
9. Jacks T., Smith R., Judith F. et al. // Endocrinology. — 1996. — Vol. 137. — P. 5284—5289.
10. Tiupakov A. N., Bulatov A. A., Peterkova V. A. et al. // Metabolism. — 1995. — Vol. 44. — P. 1199—1204.

Поступила 17.12.97