



УДК 577.112.6:577.175.53

ВЛИЯНИЕ АКТГ-ПОДОБНОГО ПЕПТИДА ИММУНОКОРТИНА НА АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫСЫ

© 2004 г. Е. В. Наволоцкая**, В. И. Ванина*, Т. А. Заргарова*, Е. Н. Гончаренко**, Н. Ю. Кудряшова**, М. Я. Ахалая**, В. Б. Садовников*, С. Г. Семушина*, А. А. Колобов***, Е. А. Кампе-Немм***, В. В. Юровский****, В. М. Липкин*

*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292, Московская область, г. Пущино, просп. Науки, 6;

**Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

***ГНЦ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург;

****Медицинский факультет университета Мэриленд, Балтимор, США

Поступила в редакцию 10.02.2003 г. Принята к печати 11.03.2003 г.

Исследовано влияние АКТГ-подобного декапептида иммунокортина VKKPGSSVKV, соответствующего аминокислотной последовательности 11–20 варибельной части тяжелой цепи IgG1 человека, на содержание 11-оксикортикостероидов (КС) в надпочечниках и плазме крови крыс *in vivo*. Установлено, что через 1 ч после внутримышечной инъекции иммунокортина в дозе 10 мкг/кг содержание КС в надпочечниках снижалось в 2 раза, в плазме, напротив, этот показатель увеличивался в 1.8 раза. В то же время введение иммунокортина в дозе 100 мкг/кг практически не влияло на содержание КС, а в дозе 1000 мкг/кг вызывало повышение уровня КС и в надпочечниках, и в плазме соответственно в 1.6 и 2.2 раза. Через 4 ч после введения любой из трех доз иммунокортина – 10, 100 или 1000 мкг/кг – содержание КС в надпочечниках не отличалось от контрольного, а через 24 ч снижалось в 3 раза. Показано, что иммунокортин с высоким сродством и специфичностью связывается с рецепторами АКТГ на мембранах коры надпочечников крысы (ингибирует специфическое связывание ¹²⁵I-меченого АКТГ-(11–24)-пептида с K_i 1.2 нМ).

Ключевые слова: адренокортикотропный гормон, глюкокортикоиды, иммуноглобулин G, пептиды, рецепторы, кора надпочечников, эндокринная система.

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные пептиды участвуют в регуляции функций эндокринной, нервной, иммунной, сердечно-сосудистой и других систем организма человека и животных. Большинство пептидных гормонов образуются в результате процессинга неактивных белковых предшественников в клетках эндокринных желез и секретируются в кровеносное русло. В то же время последовательности ряда эндогенных регуляторных пептидов обнаружены в составе биологически активных белков: иммуноглобулине G (тафтсин и р23), гемоглобине (геморфины и киоторфины), казеине (казоморфины), альбумине (кинтензин) и некоторых других белках. В отличие от классических пептидных гормонов эти пептиды образуются в результате специфического ферментативного расщепления родителевских белковых молекул в непосредственной

близости от рецепторных систем клеток-мишеней, поэтому расстояние между точками их образования и действия сопоставимо с размерами клеток.

В начале 1980-х годов американские исследователи Джуллиард и др. [1], Хоук и др. [2] обнаружили в составе тяжелой (H) цепи IgG человека последовательности, подобные β-эндорфину и АКТГ (адренокортикотропному гормону, или кортикотропину). Оказалось, что фрагмент 364–377 константной части H-цепи IgG (SLTCLVKGFYPSD) имеет 40% подобия с антигенной детерминантой β-эндорфина (KSQTPLVTLFKNALKN), а фрагмент 9–22 варибельной части IgG (AEVKKPGSSVKVSC) на 36% подобен фрагменту АКТГ 11–24 (KPVGKKRRPVKVYP) (рис. 1). Ранее нами был синтезирован декапептид VKKPGSSVKV, соответствующий аминокислотной последовательности 11–20 варибельной части H-цепи IgG1 человека (авторское название пептида – иммунокортин, ИМК) [3]. Изучение рецепции и биологической активности ИМК показало, что пептид с высоким сродством связывается с рецепторами к АКТГ на синаптических мембранах головного мозга мыши

Сокращения: АКТГ – адренокортикотропный гормон; ИМК – иммунокортин; КС – 11-оксикортикостероиды.

#Автор для переписки (тел.: (27) 73-66-68; факс: (27) 79-05-27; эл. почта: navolots@fibkh.serpukhov.su).

[3] и на различных типах иммунокомпетентных клеток человека и мыши и активирует аденилатциклазу клеток-мишеней [4–8].

Однако действие ИМК исследовалось в основном в экспериментах *in vitro*, и практически не изучено его влияние на важные биохимические системы на уровне целого организма, т.е. в экспериментах *in vivo*. Известно, что АКТГ стимулирует синтез и секрецию глюкокортикоидов клетками пучковой и сетчатой зон коры надпочечников, внутриклеточным медиатором действия гормона является сАМР [9–11]. Поскольку ИМК с высоким сходством связывается с рецептором к АКТГ и повышает внутриклеточную концентрацию сАМР, представляет интерес исследование влияния этого пептида на уровень глюкокортикоидов в коре надпочечников и плазме крови лабораторных животных *in vivo*.

Настоящая работа посвящена изучению влияния ИМК на содержание 11-оксикортикостероидов (КС) в надпочечниках и плазме крови крыс *in vivo*, а также получению ¹²⁵I-меченого АКТГ-(11–24)-пептида и исследованию с его помощью связывания ИМК с мембранами коры надпочечников крыс *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из коры надпочечников выделено и получено в кристаллической форме около 50 стероидов. Большинство из них – промежуточные продукты биосинтеза. В качестве основных гормонов, секретлируемых клетками коры надпочечников в кровь, следует рассматривать, по-видимому, только глюкокортикоиды гидрокортизон (другое название – кортизол) и кортикостерон, а также минералкортикоид альдостерон. Кортизон, 11-дезоксикортизол, преднизон и 11-дезоксикортикостерон также принадлежат к числу гормонов коры надпочечников, но уровень их секреции крайне низок. В кро-

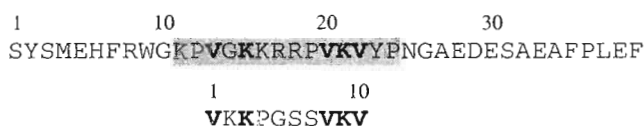


Рис. 1. Аминокислотные последовательности АКТГ человека и ИМК. Цифрами указаны номера аминокислотных остатков. Совпадающие остатки изображены жирным шрифтом. Последовательность АКТГ-(11–24) выделена заливкой.

ви человека, обезьян и морских свинок содержится в основном гидрокортизон, в крови грызунов (крыс, кроликов, мышей) кортикостерон резко преобладает над гидрокортизоном. Ни одно из перечисленных выше соединений не обладает значительной собственной флуоресценцией. Однако при обработке концентрированной серной или фосфорной кислотой кортикостероиды, имеющие ОН-группу в 11-м положении, кроме альдостерона, образуют флуоресцирующие производные [12]. Максимум спектра возбуждения этих производных лежит в области длин волн 470–475 нм, а максимум спектра флуоресценции – в области 520–530 нм. Кортикостерон и гидрокортизон образуют производные с максимумом спектра поглощения при 470 нм, тогда как производное кортизона, образованное в тех же условиях, не поглощает лучей с длиной волны более 410 нм. Исползованный в настоящей работе метод Зенкера и Бернштейна [13] позволяет с достаточной степенью достоверности измерять общее содержание 11-оксикортикостероидов (КС) в различных тканях (кортикостерон, добавленный к плазме, определяется по этому методу на 90%).

Результаты, приведенные в таблице, показывают, что через 1 ч после введения ИМК в дозе 10 мкг/кг содержание КС в надпочечниках крыс снижалось в 2 раза, в плазме, напротив, этот показатель увеличивался примерно вдвое. Мы пред-

Влияние ИМК на уровень КС в плазме крови через 1 ч и в надпочечниках крыс через 1, 4 и 24 ч после внутримышечной инъекции

Доза ИМК, мкг/кг	Уровень КС, опыт/контроль			
	через 1 ч		через 4 ч	через 24 ч
	надпочечники	плазма		
10	0.53 ± 0.09 <i>p</i> < 0.02	1.83 ± 0.24 <i>p</i> < 0.02	0.94 ± 0.23 <i>p</i> < 0.02	0.38 ± 0.02 <i>p</i> < 0.001
100	0.93 ± 0.06 <i>p</i> < 0.001	–	1.05 ± 0.21 <i>p</i> < 0.02	0.33 ± 0.02 <i>p</i> < 0.001
1000	1.61 ± 0.19 <i>p</i> < 0.02	2.24 ± 0.19 <i>p</i> < 0.02	1.07 ± 0.19 <i>p</i> < 0.02	0.32 ± 0.06 <i>p</i> < 0.001

* Контрольные и опытные группы содержали по 10 животных. Достоверность различий между контролем и опытом оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

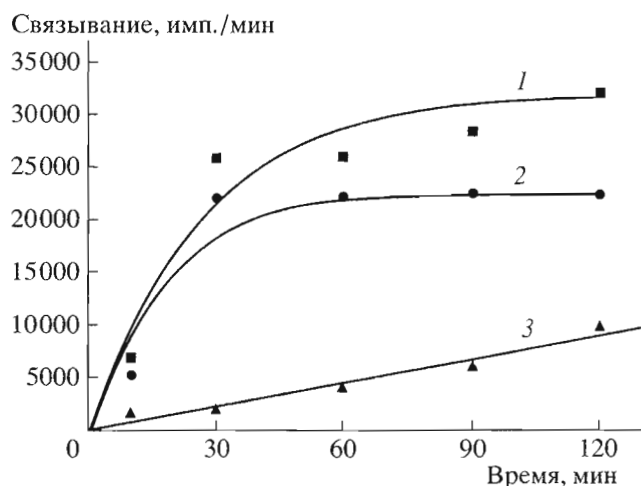


Рис. 2. Зависимость общего (1), специфического (2) и неспецифического (3) связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24)-пептида с мембранами коры надпочечников крысы от времени инкубации.

положили, что снижение содержания КС в надпочечниках в данном случае обусловлено повышением уровня секреции КС клетками коры под действием ИМК.

Как видно из таблицы, через 1 ч после инъекции в дозе 1000 мкг/кг ИМК вызывал повышение уровня КС в надпочечниках в 1.6 раза, а в дозе 100 мкг/кг практически не влиял на содержание КС. В то же время через 1 ч после введения ИМК в дозе 1000 мкг/кг наблюдалось увеличение содержания КС в плазме в 2.24 раза. Известно, что стимулирующим фактором стероидогенеза в клетках коры надпочечников является увеличение уровня сАМР [10]. Так как ИМК является активатором аденилатциклазы [3, 5, 6, 8], можно предположить, что наблюдаемое через 1 ч после введения большой дозы ИМК (1000 мкг/кг) возрастание уровня КС в надпочечниках обусловлено способностью пептида в этой дозе стимулировать синтез КС. Таким образом, по всей видимости, ИМК влияет не только на секрецию, но и на синтез КС.

Из таблицы следует, что через 4 ч после введения любой из трех доз ИМК содержание КС в надпочечниках не отличалось от контрольного, а через 24 ч снижалось в 3 раза. По нашему мнению, падение уровня КС в надпочечниках через 24 ч после введения ИМК свидетельствует о сложном системном действии пептида на организм. Механизмы, лежащие в основе такого действия, не известны. Однако, согласно нашим данным, ИМК связывается с рецепторами к АКТГ и вызывает значительное повышение уровня сАМР в клетках иммунной и нервной системы [3, 5, 6, 8], поэтому можно предположить, что в их реализа-

ции, помимо эндокринной, участвуют также нервная и иммунная системы.

Ранее мы показали, что ИМК с высоким сродством связывается с рецепторами АКТГ на иммунокомпетентных и лейкоцитарных клетках человека и мыши, а также на синаптических мембранах головного мозга мыши [3–8]. Предположив, что действие ИМК на клетки коры надпочечников крысы также может быть опосредовано через рецепторы АКТГ, мы изучили рецепторную активность ИМК. Согласно данным Капас и соавт. [14], АКТГ-(11–24) активно ингибирует связывание ^{125}I -меченого АКТГ с клонированным рецептором АКТГ мыши (МС2-R, меланокортиновым рецептором подтипа 2), но не вызывает достоверных изменений внутриклеточной концентрации сАМР. Результаты наших предыдущих исследований показывают, что ИМК на 100% ингибирует специфическое связывание меченого ^{125}I АКТГ-(11–24) с тимоцитами и перитонеальными макрофагами мыши (соответствующие значения K_i 1.8 и 2.2 нМ) [8], а также синаптическими мембранами головного мозга мыши (K_i 0.9 нМ) [3]. В свою очередь немеченый АКТГ-(11–24) полностью вытеснял ^3H ИМК из комплекса с рецептором на тимоцитах и макрофагах (K_i 1.3 и 1.9 нМ соответственно) [5]. Таким образом, с помощью ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) распознаются все участки связывания ИМК. Поэтому для изучения способности ИМК связываться с мембранами коры надпочечников крыс в качестве меченого лиганда нами был использован ^{125}I -меченый АКТГ-(11–24).

Из рис. 2 видно, что равновесие в системе меченый пептид–рецептор устанавливалось примерно через 1 ч и неспецифическое связывание меченого пептида за это время составляло 14.6% величины его общего связывания. Поэтому реакцию связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) с мембранами мы проводили в течение 1 ч.

График Скэтчарда, приведенный на рис. 3, показывает, что ^{125}I -меченый АКТГ-(11–24) взаимодействует с одним типом рецепторов АКТГ на мембранах коры надпочечников крысы (K_d 1.9 нМ). Для оценки способности ИМК связываться с этими рецепторами была изучена активность пептида в тесте ингибирования связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24). Параллельно в качестве потенциальных ингибиторов связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) были протестированы немеченые АКТГ-(4–10), соматостатин, β -эндорфин, $[\text{Met}^5]\text{Эн-кефалин}$. Оказалось, что из протестированных пептидов только ИМК активно ингибировал связывание ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) с мембранами с K_i 1.2 нМ. Ингибирующая способность остальных пептидов была крайне низкой, $K_i > 10$ мкМ. Таким образом, ИМК с высоким сродством и специфичностью связывается с рецепторами АКТГ на мембранах коры надпочечников крысы, и, следова-

тельно, его действие на синтез и секрецию КС может быть опосредовано через эти рецепторы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали кортикостерон (ICN, США), 1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилгликоурил (Йодоген), фенолметилсульфонилфторид (PMSF) и NaN₃ (Serva, ФРГ); L-глутамин и N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES) (Fluka, США), N-метилпирролидон, диизопропилкарбодиимид, 1-гидроксибензотриазол и тиоанизол (Merck, Германия). *трет*-Бутилоксикарбонильные производные аминокислот получали по ранее предложенным методикам [15].

Остальные реактивы имели квалификацию "ос.ч.". Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Mono-Q (Millipore, США).

АКТГ-(11-24) (KPVGKKRRRPVKVYP) и иммунокортин (VKKPGSSVKV) были синтезированы на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems, модель 430A, США, с использованием Boc/Bzl-тактики наращивания пептидной цепи. Синтез проводили на РАМ*-полимере по ранее предложенной методике *in situ* [14]. Оба пептида были очищены до гомогенного состояния препаративной офВЭЖХ (хроматограф Gilson, Франция, колонка Delta Pack C18, 100 А, 39 × 150 мм, 5 мкм, скорость потока 10 мл/мин, элюент – 0.1% ТФА, градиент ацетонитрила 10–40%). Чистота пептидов после очистки превышала 95%. Молекулярную массу пептидов определяли масс-спектрометрическим методом; прибор Finnigan (США). Данные аминокислотного анализа (гидролиз 6 н. HCl, 24 ч, 110°C; аминокислотный анализатор LKB 4151 Alpha Plus, Швеция): АКТГ-(11-24) – Pro–2.82(3), Gly–1.18(1), Tyr–1.00(1), Val–3.17(3), Lys–4.00(4), Arg–1.89(2); иммунокортин – Pro–0.94(1), Gly–0.97(1), Val–3.40(3), Lys–3.01(3), Arg–2.10(2), Ser–2.02(2).

Определение содержания 11-оксикортикостероидов (КС) в крови и надпочечниках проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 180–210 г. Раствор ИМК в дистиллированной воде в объеме 0.5 мл в дозах 10, 100 и 1000 мкг/кг вводили в икроножную мышцу животного. Через 1, 4 и 24 ч после инъекции крыс декапетировали, забирали кровь и извлекали надпочечники. Контрольная и опытная группы содержали по 10 животных. Уровень КС в крови и надпочечниках определяли по методу [13] отдельно у каждой крысы опытной и контрольной группы. Принцип метода [13] основан на способности КС флуоресцировать после обработки смесью серной кислоты и спирта.

* РАМ – феноциламиндометил.

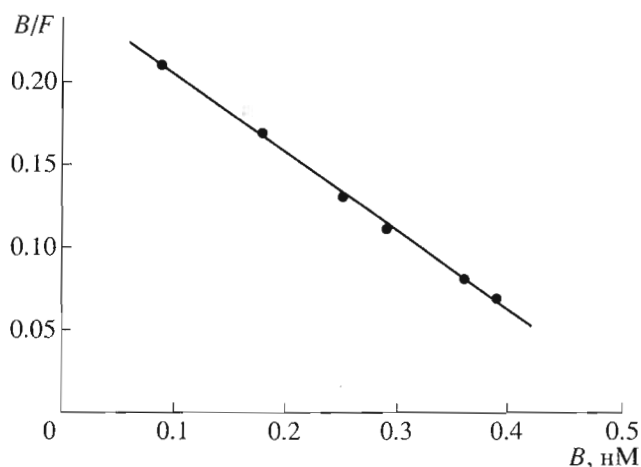


Рис. 3. Анализ в координатах Скэтчарда специфического связывания ¹²⁵I-меченого АКТГ-(11–24) с мембранами коры надпочечников крысы. B и F – молярные концентрации связанного и свободного меченого пептида соответственно.

Плазму (3 мл) помещали в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл с притертой пробкой и добавляли 15 мл хлороформа, пробирку встряхивали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Верхнюю водную фазу удаляли, нижнюю (хлороформную) использовали для дальнейшего исследования. Затем для удаления фенольных эстрогенов исследуемый материал переносили в пробирки и добавляли 4.5 мл 0.1 н. NaOH, встряхивали в течение 15 с и центрифугировали. Щелочную фазу удаляли, а две порции раствора стероидов в хлороформе (по 15 мл каждая) переносили в чистые центрифужные пробирки объемом 50 мл с притертой пробкой, содержащие по 3 мл предварительно приготовленного реактива (2.4 объема концентрированной H₂SO₄ на 1 объем 50%-ного этанола). Пробирки встряхивали 15 с и центрифугировали, верхнюю фазу переносили в кювету и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2 ч. Флуоресценцию образовавшихся флуорофоров измеряли на флуориметре Hitachi (Япония) при длине волны 530 нм (длина волны возбуждающего света 470 нм). Стандарты и контроль готовили, заменяя плазму водой или раствором кортикостерона известной концентрации. Показано, что вещество, полученное таким образом из плазмы крысы, обладает теми же флуоресцентными свойствами, что и кортикостерон, и интенсивность флуоресценции его возрастает при обработке серной кислотой так же, как у стандартного раствора [12].

Надпочечник взвешивали и растирали в 5 мл хлороформа, переносили в центрифужную пробирку, добавляли 10 мл хлороформа и оставляли стоять 15 мин, а затем центрифугировали при

4000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант отбিরали и обрабатывали как описано выше.

Содержание КС рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{\Phi_{\text{оп}} C_{\text{ст}}}{\Phi_{\text{ст}} M},$$

где X – содержание КС в пробе, мкг/г ткани; $\Phi_{\text{оп}}$ – флуоресценция опытной пробы; $C_{\text{ст}}$ – содержание КС в стандартной пробе, мкг; $\Phi_{\text{ст}}$ – флуоресценция стандартной пробы; M – вес надпочечника, г.

Содержание КС в плазме и надпочечниках контрольных животных составляло в среднем 0.3 мкг/мл и 35 мкг/г ткани соответственно. Достоверность различий экспериментальных данных между контролем и опытом оценивали по критерию Стьюдента.

Введение ^{125}I в АКТГ-(11–24)-пептид (10 мкг) проводили с помощью $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ (1 мКи) и Йодогена по методике [16]. Для выделения иодированного пептида реакционную смесь наносили на колонку (0.9×10 см) с сефадексом G-10. Элюирование проводили 50 мМ фосфатным буфером, pH 7.4, со скоростью 5 мл/ч. Зону выхода меченого пептида определяли в контрольном опыте с немеченым пептидом. Радиоактивность фракций измеряли с помощью счетчика Mini-Gamma Counter (ЛКВ, Швеция). Фракции с максимальной радиоактивностью, позиция которых соответствовала позиции пика немеченого пептида в контроле, объединяли и определяли суммарную и удельную активности полученного препарата. Оценку чистоты иодированного пептида осуществляли с помощью ТСХ (окись алюминия на стекле) в системе n -бутанол– CH_3COOH – H_2O (4 : 1 : 1). Хроматографическую пластинку автордиографировали. Удельная активность ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) после очистки составляла 98 Ки/ммоль.

Мембраны из коры надпочечников крыс выделяли согласно методике [17], концентрацию белка определяли по Лоури [18], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Реакцию связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) с мембранами коры надпочечников крысы проводили в Трис-НСI-буферном растворе, содержащем фенолметилсульфонилфторид (0.6 мг/мл), pH 7.5, в соответствии со следующей схемой: в силиконизированные пробирки вносили 100 мкл меченого пептида (10^{-10} – 10^{-7} М, три параллельные пробы для каждой концентрации), 100 мкл буфера (общее связывание) или 100 мкл 10^{-3} М раствора немеченого пептида в буфере (неспецифическое связывание) и 800 мкл суспензии мембран (2 мг белка). Пробирки инкубировали при 4°C в течение 1 ч. По окончании инкубации реакционную смесь фильтровали через стекловолоконистые фильтры GF/B (Whatman, Англия). Фильтры трижды промывали 5 мл ледяного буферного раствора. Радиоактивность на фильтрах подчи-

тывали с помощью гамма-счетчика Mini-Gamma Counter (ЛКВ, Швеция). Величину специфического связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) с мембранами определяли по разности между его общим и неспецифическим связыванием. Результаты трех независимых экспериментов анализировали по методу [19].

Для оценки способности немеченых пептидов ингибировать специфическое связывание ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24) мембраны (800 мкл, 2 мг белка) инкубировали с меченым пептидом (100 мкл, 5 нМ) и немеченым пептидом (100 мкл, диапазон концентраций 10^{-10} – 10^{-6} М, три повтора для каждой концентрации) как описано выше. Константу ингибирования (K_i) определяли по формуле $K_i = \frac{[I]_{50}}{1 + [L]/K_d}$ [20], где $[L]$ – молярная концентрация ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24); K_d – равновесная константа диссоциации комплекса ^{125}I -меченый АКТГ-(11–24)–рецептор; $[I]_{50}$ – концентрация немеченого пептида, вызывающая 50%-ное ингибирование специфического связывания ^{125}I -меченого АКТГ-(11–24). Величину $[I]_{50}$ определяли графически на основании кривой ингибирования (график зависимости ингибирования (%) от молярной концентрации ингибитора). Значение K_d определяли как описано выше.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48032) и Международного научно-технического центра (грант № 1462).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Julliard J.H., Shibasaki T., Ling N., Guillamin R. // Science. 1980. V. 208. P. 183–185.
2. Houck J.C., Kimball C., Chang C., Pedigo N.W., Yamamura H.I. // Science. 1980. V. 207. P. 78–79.
3. Mitin Y.V., Navolotskaya E.V., Vasilenko R.N., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. // Int. J. Peptide Protein Res. 1993. V. 41. P. 517–521.
4. Lepikhova T.N., Zargarova T.A., Nurieva R.I., Navolotskaya E.V., Kostanyan I.A., Lipkin V.M. // Rus. J. Immunol. 1998. V. 3–4. P. 266–269.
5. Наволоцкая Е.В., Заргарова Т.А., Лепихова Т.Н., Туробов В.Л., Нуриева Р.И., Малкова Н.В., Липкин В.М., Завьялов В.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 42–49.
6. Наволоцкая Е.В., Заргарова Т.А., Лепихова Т.Н., Туробов В.Л., Нуриева Р.И., Малкова Н.В., Завьялов В.П., Липкин В.М. // Биооргани. химия. 2000. Т. 26. С. 46–53.
7. Lepikhova T.N., Navolotskaya E.V., Zargarova T.A., Nurieva R.I., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. // Peptides. 2000. V. 21. P. 353–357.
8. Navolotskaya E.V., Zargarova T.A., Lepikhova T.N., Nurieva R.I., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. // Immunol. Lett. 2000. V. 72. P. 95–98.
9. Haynes R.C., Jr. // J. Biol. Chem. 1958. V. 233. P. 1220–1222.

10. Haynes R.C., Jr., Koritz S.B., Peron F.G. // *J. Biol. Chem.* 1959. V. 234. P. 1421–1423.
11. Grahame-Smith D.G., Butcher R.W., Ney R.L., Sutherland E.W. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 5535–5541.
12. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине: Пер. с англ. М.: Мир, 1965. С. 340–346.
13. Zenker N., Berstein D.E. // *J. Biol. Chem.* 1958. V. 231. P. 695–701.
14. Karas S., Cammas F.M., Hinson J.P., Clark A.J. // *Endocrinology.* 1996. V. 137. P. 3291–3294.
15. Гершкович А.А., Кибурев В.К. Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.
16. Salacinski P.R.P., Lean C.M., Sykes J.E.C., Climent-Jones V.V., Lowry P.J. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 136–146.
17. Cote M., Payet M.D., Rousseau E., Guillon G., Gallo-Payet N. // *Endocrinology.* 1998. V. 140. P. 3594–3601.
18. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr O.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
19. Chang K.-J., Jacobs S., Cuatrecasas P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975. V. 406. P. 294–303.
20. Chang Y.C., Prusoff W.H. // *Biochem. Pharmacol.* 1973. V. 22. P. 3099–3108.

An ACTH-Like Peptide Immunocortin: Effect on the Activity of Cells from the Rat Adrenal Cortex

E. V. Navolotskaya^{##}, V. I. Vanina^{*}, T. A. Zargarova^{*}, E. N. Goncharenko^{},
N. Yu. Kudryashova^{**}, M. Ya. Akhalaya^{**}, V. B. Sadovnikov^{*}, S. G. Semushina^{*},
A. A. Kolobov^{***}, E. A. Kampe-Nemm^{***}, V. V. Yurovskii^{****}, and V. M. Lipkin^{*}**

[#]Phone: (27) 73-6668; fax: (27) 79-0527; e-mail: navolots@fibkh.serpukhov.su

^{*}*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch), Russian Academy of Sciences,
pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

^{**}*Faculty of Biology, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

^{***}*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Pudovskaya ul. 7, St. Petersburg, 197110 Russia*

^{****}*Department of Medicine, University of Maryland,
Baltimore, MD, 21201 USA*

The effect of immunocortin, an ACTH-like decapeptide VKKPGSSVKV corresponding to the 11–20 sequence of the variable part of the human IgG1 heavy chain on the content of 11-hydroxycorticosteroids (CS) in rat adrenal glands and blood serum *in vivo* was studied. An intramuscular injection of immunocortin at a dose of 10 µg/kg was found in an hour to induce a twofold decrease in CS content in the adrenal glands and a 1.8-fold increase in the blood serum CS content. At the same time, an immunocortin dose of 100 µg/kg exerted practically no effect on the CS content and its dose of 1000 µg/kg increased the CS content both in adrenal glands and in blood serum by 1.6 and 2.2 times, respectively. Four hours after the injection of any of the three doses of immunocortin, the CS content in adrenal glands did not differ from the control value, and after 24 h the content decreased threefold. Immunocortin was shown to be bound by the ACTH receptors in the membranes of the rat adrenal cortex with a high affinity and specificity (inhibiting the specific binding of ¹²⁵I-labeled ACTH-(11–24) peptide with K_i of 1.2 nM). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: adrenal cortex, adrenocorticotrophic hormone, endocrine system, glucocorticoids, immunoglobulin G, peptides, receptors