

М. Ш. МУРАДЯН, А. Н. ЕДИГАРЯН, А. А. ГАЛОЯН

АМИНОКИСЛОТЫ, ИХ АНАЛОГИ И НИНГИДРИН- ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ МОЗЖЕЧКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В составе низкомолекулярных веществ мозжечка обнаружены: фосфосерин, глицерофосфоэтаноламин, мочеви́на, таурин, метионинсульфоксид, оксипролин, аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, цистин, цистатионин, метионин, изолейцин, лейцин, глюкозамин, фенилаланин, тирозин, β -аланин, β -аминоизомасляная кислота, этаноламин, орнитин, 3-метилгистидин, гидроксилизин, лизин, гистидин, NH_3 , путреанин, аргинин, креатинин, ГАМК.

После гидролиза лиофилизированного порошка количество ряда аминокислот увеличивается, что свидетельствует о наличии в мозжечке пептидов.

Мозжечок является вегетативным нервным центром и тесно связан с другими частями мозга, в том числе с гипоталамусом. Большой интерес представляет вопрос о взаимоотношениях между мозжечком и гипоталамусом как общепризнанным главным очагом вегетативной нервной системы. Эти вопросы изучены недостаточно. Не исключена возможность, что мозжечок может являться непосредственным источником возникновения физиологически активных веществ. Изучение химического состава, в том числе и аминокислотного, мозжечка и гипоталамуса может способствовать выяснению некоторых сторон этих вопросов, поскольку свободные аминокислоты играют важную роль в функциональной деятельности нервной системы. Показано, что в критическом периоде морфофункционального созревания мозжечка происходят наиболее существенные изменения его аминокислотного состава [6].

Хроматографический анализ аминокислот экстрактов ткани широко применяется для изучения метаболических процессов нормальной и патологической ткани, поскольку свободные аминокислоты не только являются непосредственным результатом метаболизма белков, но выступают и как биоактивные агенты в ряде процессов обмена веществ.

Имея в виду важную роль мозжечка в регуляции вегетативных функций организма, мы задались целью изучить свободные аминокислоты, их производные и нингидринположительные вещества в нем.

Материал и методика. Низкомолекулярные соединения и аминокислоты мозжечка крупного рогатого скота выделены методом А. А. Галояна следующим образом.

Мозжечок гомогенизировали в 0,25%-ой CH_3COOH (1:5) стеклянным гомогенизатором в течение 30 мин. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 8000 g. К

супернатанту добавляли 96 градусный спирт (1/5 объема) и оставляли в холодильнике на ночь, затем центрифугировали, супернатант отделяли. Осадок дополнительно обрабатывали 2—3 раза 80, 70, 50-градусным спиртом последовательно, а супернатанты объединяли.

Для удаления липидов в эту жидкость добавляли хлороформ (1:5) и оставляли в холодильнике на ночь. Верхний слой декантировали. После удаления спирта и хлороформа водный раствор лиофилизировали на аппарате КС-30. Из этого порошка аминокислоты, а также другие нингидринположительные вещества разделяли на автоматическом анализаторе аминокислот фирмы «Бекман» (тип 120 В) по методу Мура и др. [10]. Вначале была проведена калибровка стандартной аминокислотной смеси, содержащей щелочные, кислые и нейтральные аминокислоты. Для уточнения отдельных производных и неизвестных пиков использовался также ряд компонентов фирмы «Сигма». В качестве ионообменников применяли амберлиты типа 150 А, 50 А, 15 А фирмы Бекман. Для проверки физической потери аминокислот в процессе ионообменного хроматографического анализа использовали внутренний стандарт норлейцин (для кислых и нейтральных аминокислот [11]) и гомоаргинин (для основных аминокислот [4, 5]).

Для выявления кислых и нейтральных свободных аминокислот лиофилизированный порошок, содержащий низкомолекулярные соединения, в количестве 10 мг растворяли в 2 мл 0,2 N цитратного буфера, pH 2,2, центрифугировали и прозрачную жидкость наносили на колонку 150×0,9 см, заполненную смолой амберлит 150 А, с частицами диаметром 40 ± 7 мк. Проводилась градиентная элюция 0,2 N цитратными буферами с pH 3,28 и 4,25; скорость элюции 30 мл/час. Анализ продолжался 23 часа при температуре 50°C.

Для выявления основных свободных аминокислот и их аналогов использовали колонку размерами 15×0,9 см, заполненную смолой амберлит 15 А, с частицами диаметром 16 ± 4 мк. Для элюции применяли 0,35 N цитратный буфер, pH 5,28, при 50°C; скорость элюции 30 мл/час. Анализ в этом случае продолжается 8 часов. Для разделения основных свободных аминокислот и родственных соединений использовали также колонку 50×0,9 см, заполненную смолой амберлит 50 А, с частицами диаметром 25 мк. Элюция производится 0,38 N цитратным буфером pH 4,26 при 30—50°C, скорость элюции 30 мл/час. Анализ длился 22 часа.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований в составе низкомолекулярных соединений мозжечка крупного рогатого скота удалось выделить и идентифицировать 36 кислых, нейтральных и основных свободных аминокислот, их аналогов и нингидринположительных веществ. Среди них: цистеиновая кислота (следы), фосфосерин, глицерофосфоэтаноламин, фосфоэтаноламин, таурин, мочеви́на, гидроксипролин, метионинсульфоксид, аспарагиновая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, цистин, цистатионин, аллоизолейцин, глюкозамин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, тирозин, 3-метилгистидин, β-аланин, β-аминоизомасляная кислота, этаноламин, орнитин, карнозин, ГАМК, гидроксизин, гистидин, NH₃, путреанин, аргинин, треонин, серин.

Очередность кислых, нейтральных и щелочных свободных аминокислот указана в табл. 1. Как видно из табл. 1, в мозжечке в наибольших количествах содержатся глутаминовая кислота, 3-метилгистидин, таурин, серин, фосфоэтаноламин, мочеви́на, β-аминоизомасляная кислота. Содержание метионинсульфоксида, гидроксипролина, метионина, изолейцина, фенилаланина, орнитина, гистидина, аргинина, наоборот, весьма незначительно. В мозжечке сравнительно с другими

аминокислотами содержится большое количество таурина. По мнению некоторых исследователей, высокое содержание таурина в мозжечке можно объяснить тем, что он действует как ингибитор передачи в этих отделах [7].

Таблица 1

Количество свободных аминокислот, их производных и ингибиторно-положительных соединений мозжечка крупного рогатого скота

Вещество	мкмоль/г сырого веса	Вещество	мкмоль/г сырого веса
Фосфосерин	0,543	Метионин	0,21
Глицерофосфотанол-амин	2,28	Изолейцин	0,24
Фосфотаноламин	3,3	Лейцин	0,75
Мочевина	1	Глюкозамин	0,039
Таурин	3	Фенилаланин	0,066
Метионинсульфоксид	следы	Тирозин	0,33
Гидроксипролин	0,54	В-аланин	0,75
Аспарагиновая кислота	1,14	В-аминоизомасляная кислота	3,72
Треонин	0,51	Этаноламин	следы
Серин	3,36	Орнитин	0,21
Глутаминовая кислота	7,1	3-метилгистидин	3
Пролин	1,23	Гидроксилизин	2,5
Глицин	1,17	Лизин	0,348
Аланин	2,86	Гистидин	0,12
Валин	0,63	Аммиак	2,1
Цистин	следы	Путреанин	следы
Цистатионин	0,42	Аргинин	0,27
ГАМК	0,68	Карнозин	следы

Перри и его сотрудники исследовали свободные аминокислоты и их производные в пяти отделах головного мозга кошки, в том числе и в мозжечке [7]. Была выявлена разница в содержании аминокислот между корой головного мозга, мозжечка и других отделов мозга кошки. Концентрация таурина, например, в мозжечке в два раза выше, чем в головном мозге, что подтвердил в своих работах Батистин [3]. Существует количественная разница в содержании аминокислот в мозжечке кошки и крупного рогатого скота. Так, фосфотаноламин, глицерофосфотаноламин, глицин, аланин, лейцин, орнитин, почти в два раза больше в мозжечке крупного рогатого скота, чем у кошки.

Интересно, что концентрация некоторых аминокислот в мозжечке крупного рогатого скота аналогична таковой в мозге человека и кошки (глутаминовая кислота, ГАМК, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин) [8, 9]. Концентрация таурина, аспарагиновой кислоты, серина, пролина, глицина, аланина, изолейцина, лейцина, и гистидина выше в коре головного мозга кошки, чем человека. Однако существует также количественная разница в аминокислотном составе различных отделов головного мозга одного и того же животного (треонин, глицин, цистин, цистатионин и т. д.) [9].

В предыдущих работах мы показали, что состав и количество ингибиторно-положительных соединений нейрогипофиза и гипоталамуса (одного и того же животного) различны [1, 2]. В нейрогипофизе имеется большое количество таурина, оксипролина, глицерофосфотаноламина,

метионина, лейцина, в то время как в гипоталамусе и мозжечке их сравнительно меньше. В гипоталамусе, в сравнении с мозжечком и нейрогипофизом, имеется большое количество фосфосерина, аспарагиновой кислоты, глицина, β -аминоизомасляной кислоты. В мозжечке и нейрогипофизе содержатся глюкозамин, цистатионин, метионинсульфоксид, которые не были обнаружены в гипоталамусе. В мозжечке обнаружены карнозин, путреанин, гидроксизин, которые отсутствуют в нейрогипофизе и гипоталамусе.

Чтобы решить вопрос о наличии полипептидов в составе низкомолекулярных соединений мозжечка крупного рогатого скота, такое же количество (10 мг) лиофилизированного порошка подвергали кислотному гидролизу (6 н. HCl при 105°—110°C в течение 24 часов) в запаянных ампулах. После окончания гидролиза HCl удаляли в вакуум эксикаторе над KOH. Для выявления нингидринположительных веществ гидролизат (сухой остаток) растворяли в 2 мл цитратного буфера (pH 2,2) и использовали для анализа аминокислот. Гидролизат разделяли на обе (150 см и 15 см) указанные колонки. Очередность кислых, нейтральных и основных аминокислот после гидролиза первичного порошка указаны в табл. 2.

Таблица 2

Количество кислых, нейтральных и щелочных аминокислот, их производных и нингидринположительных соединений в мозжечке крупного рогатого скота после гидролиза

Вещество	мкмоль/г сырого веса	Вещество	мкмоль/г сырого веса
Метионинсульфоксид	следы	Метионин	0,21
Гидроксипролин	следы	Изолейцин	0,8
Аспарагиновая кислота	2,2	Лейцин	0,69
Треонин	1	Тирозин	0,51
Серин	1,36	Фенилаланин	0,6
Глутаминовая кислота	1,9	Лизин	3,7
Пролин	1,72	Гистидин	1,11
Глицин	2,1	3-метилгистидин	0,6
Аланин	1,62	NH ₃	4,38
Валин	2,1	Аргинин	3,2
Цистатионин	следы		

При изучении аминокислотного состава лиофилизированного порошка мозжечка крупного рогатого скота в составе основных соединений после гидролиза было выявлено значительное увеличение количества лизина, аргинина, гистидина (почти 10 раз) и аммиака (2 раза). Эти данные, по-видимому, свидетельствуют о наличии в мозжечке пептида с основными свойствами.

Полученные нами данные дают возможность заключить, что мозжечок заметно отличается от гипоталамуса, нейрогипофиза и других частей мозга по количеству и качеству нингидринположительных веществ.

Մ. Շ. ԽՈՐԱԿՅԱՆ, Ա. Ն. ԵՊԻՍԿՈՎՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋՆՐԱՎՈՐ ԿՆՆԴԱՆՈՒՆԵՐԻ ՈՒՂՆՂԻՍԻ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆՆԵՐԸ,
ՆՐԱՆՑ ԱՆԱԼՈՂՆԵՐԸ ԵՎ ՆԻՆՀԻԿՐԻՆ ԴՐԱԿԱՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուղեղիկից անջատված ցածր մոլեկուլային կշիռ ունեցող միացությունների կազմում հայտնաբերված են հետևյալ միացությունները՝ ֆոսֆոսերին, դիցերոֆոսֆոլիանոլամին, ֆոսֆոլիանոլամին, միզանյութ, տաուրին, մեթիոնին, սուլֆոբսիդ, հիդրոկսիպրուլին, ասպարադինաթթու, տրեոնին, սերին, գլուտամինաթթու, պրուլին, դիցին, ալանին, վալին, ցիստեին, ցիստատիոնին, մեթիոնին, իզոլեյցին, լեյցին, գլուկոզամին, ֆենիլալանին, տիրոզին, Խ-ալանին, Խ-ամինաիզոկարադաթթու, լիանոլամին, օրնիտին, 3-մեթիլ-հիստիդին, հիդրոբսիլիդին, լիզին, հիստիդին, ամոնյակ, պուտրեանին, արգինին, կրեատինին, ԳԱԿԹ:

Ընթացրվում է, որ ուղեղիկի ցածր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող նյութերի կազմում կան սյուրիպակտիդներ, որոնց հիդրոլիզը բերում է նշված ամինաթթուների քանակի ավելացման:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. и Мурадян М. III. Биохимия, 37, 1, 1971.
2. Галоян А. А. и Мурадян М. III. Вопросы биохимии мозга, 6, 29, 1970.
3. Battistini L., Grynbaum A. and Lajtha A. J. Neurochem., 16, 1459, 1969.
4. Keutman H. T. and Potts I. R. Anal. Biochem., 29, 175, 1969.
5. Linn S. Batters. Anal. Biochem., 41, 158, 1971.
6. Oja S. S. Brain. Res. 11, 3, 1968.
7. Perry T. L., Berry K., Hansen S., Diamond S. and Mok C. J. Neurochem., 18, 513, 1971.
8. Perry T. L., Hansen S., Berry K., Mok C. and Lesk D. J. Neurochem., 18, 521, 1971.
9. Perry T. L., Sanders H. D., Shirley Hansen, Dinna Lesk, Marlene Kloster and Linga Gravlin. J. Neurochem., 19, 2651, 1972.
10. Speacman D. H., Stein W. H. and Moore S. Anal. Chem., 30, 1185, 1958.
11. Stetel F. L., Roach M. K. Anal. Biochem., 41, 158, 1971.