



УДК 577.175.52+577.175.73+577.175.82/8

**О СВОЙСТВАХ КОРОНАРОАКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ
НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ГИПОТАЛАМУСА**

СЛАКЯН С. А., СРАПИОНЫАН Р. М., СЛАКЯН Ф. М., ПОПОВА Т. В., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из трипсинового гидролизата двух специфических белков гипоталамуса—носителей нейрогомонов «К» и «Г» выделены гликопептидные соединения, обладающие коронаро-расширяющей активностью.

Наличие углеводного компонента в них подтвердилось качественной реакцией Шифф-перйодная кислота. Аминокислотный анализ этих соединений выявил преобладающее содержание глицина, глутамата, серина, аланина и аспартата. Один из них—ТфБНГ (триптический фрагмент белка-носителя нейрогомона «Г») оказывал ингибирующее действие на фосфодиэстеразу cAMP мозга.

Полученные данные свидетельствуют о наличии биоактивных гликопептидных участков в составе специфических белков гипоталамуса крупного рогатого скота.

В последнее время многих исследователей привлекает одна из важнейших проблем нейрохимии—образование новых эндогенных биоактивных соединений из белковых прогормональных предшественников путем их протеолиза [1—3]. Причем, как утверждают многие авторы, в ряде случаев предшественниками биоактивных соединений являются сами гормоны [4—6].

Внимание к этим нейроактивным соединениям обусловлено, с одной стороны, их преимущественной локализацией в ЦНС, с другой—участием многих из них в регуляции метаболических процессов, происходящих как в нервной, так и в других тканях.

В этом аспекте представляют интерес проводимые в течение ряда лет исследования по изучению обнаруженной семьи гипоталамических кардиоактивных белков и гликопротеинов, оказавшихся предшественниками ряда биоактивных, в том числе и кардиоактивных, соединений [7—9].

Задача настоящей статьи заключается в рассмотрении вопроса об изолировании двух из указанных белков—носителей нейрогомона «К» (БНК) и нейрогомона «Г» (БНГ) и образования из них кардиоактивных фрагментов, принимающих участие в регуляции ряда метаболических процессов в различных органах.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: дважды перекристаллизованный трипси́н («Worthington», США), диметилформамид («Merck», ФРГ), додецилсульфат натрия, какадиловая кислота и водорастворимый карбодимид («Farak», Берлин), глицинамид («Diskinson and Co», США), амфолины («LKB», Швеция), сефадексы G-100, G-50, G-25, G-10 («Pharmacia», Швеция) и ДЭАЭ-целлюлоза («Whatman», Англия), пластинки ДС-Aluminiumoxid 60 F-254 Type E («Merck», ФРГ).

Гель-фильтрацию белков проводили на колонке с сефадексом G-100 (2×50 см), а для триптических фрагментов—на колонках с сефадексом G-25, G-10 и глицинамидированным сефадексом G-10, размерами 2,5×50 см и 1×50 см в зависимости от цели эксперимента. Фракции собирали на коллекторе SF-62 (ЧССР), скорость элюции—10—60 мл/ч. В качестве элюирующего буфера применяли борно-боратный буфер, pH 8 и бидистиллированную воду, pH 5,5, которые подавались микронасосом 6017 (ЧССР). В качестве маркера использовали 0,01%-ный раствор голубого декстрана.

Глицинамидирование сефадекса G-10 осуществляли методом Creig и соавт. [10] с некоторыми модификациями [11].

Ионообменную хроматографию проводили на ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,005 М натрий-фосфатным буфером, pH 6,5. Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме, где значительный градиент концентрации соли сочетался с небольшим понижением pH буфера от 6,5 до 5. Скорость элюции составляла 20 мл/ч.

Диск-электрофорез в ПААГ проводили в системе гелей согласно Мауреру [12] по методу Ornstein, Davis [13]. Продолжительность форе́за обычно составляла 3 ч при силе тока в 4 мА на трубку. Гели окрашивали 0,5%-ным раствором амидошварца 10 В в течение 30 мин.

Идентификацию гликопротеинов осуществляли по методу Zacharius и соавт. [14] с некоторыми изменениями. ПААГ обрабатывали 10%-ной ТХУК в течение 30 мин, отмывали несколько раз дистиллированной водой, окисляли углеводы 1%-ным раствором KIO_4 в 3%-ной CH_3COOH 30 мин при 0°, после чего промывали длительное время под текущей водной струей и оставляли на ночь в 7%-ном растворе CH_3COOH . Отмытые гели окрашивали реактивом Шиффа (0,5 М $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в 1 н. HCl) в течение 1 ч в темноте при 20°. Затем 3—4 раза промывали 1%-ным раствором Na-м-бисульфита в 0,1 н. HCl . О наличии гликопротеинов судили по появлению окрашенных в малиновый цвет зон. Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [15].

Изоэлектрофокусирование проводили на приборе фирмы «LKB» в колонке объемом 110 мл при температуре 4°. Испытуемые образцы переводили в 3%-ный раствор амфолинов с интервалами pH 5—7. Продолжительность фокусирования составляла 48 ч, конечное напряжение—500 В, сила тока—0,8 мА.

Ферментативный гидролиз трипси́ном и химотрипси́ном проводили

в аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8, в течение 18 ч; пепсином — в буферной смеси растворов муравьиной и уксусной кислот, pH 2. Соотношение фермент—субстрат поддерживали 1 : 80.

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5).

Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Mogawitz, Zahn [16].

Аминокислотный анализ выполняли на автоматическом анализаторе «Liquimat» (ФРГ).^{*} Гидролиз протекал в 5,7 н. HCl в запаянных ампулах при 110° в течение 24 ч. Используемый ионообменник ДС-6А «Duggit», колонка размерами 0,45×35 см. Анализ осуществляли в ступенчатом градиенте Na-цитратного буфера: 0,2 М, pH 3,25; 4,25 и 1,1 М, pH 7,9. Скорость элюции—20 мл/ч.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе Varian-8500 в колонке RP-8, используя градиентную элюцию следующими буферами: раствор А—ацетат аммония, pH 4,0 и раствор В—ацетат аммония—ацетонитрил, pH 4,0 в соотношении 20 : 80. Фракции собирали со скоростью 0,5 мл/мин. Хроматография проходила под давлением 240 атм. Продолжительность анализа—40 мин. Оптическую плотность измеряли при 210 нм.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинке с окисью алюминия размерами 20×20 см, толщиной 0,2 мм, используя систему растворителей н-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:12).

Результаты и обсуждение

Электрофоретически гомогенные коронароактивные белок-гормональные комплексы (БНК и БНГ) изолировали из гипоталамуса крупного рогатого скота по схеме, описанной ранее [9].

После того, как низкомолекулярные соединения отделяли от белков в результате диализа против 0,1 М раствора уксусной кислоты в течение 48 ч при постоянном встряхивании, полученные так называемые «инертные» белки (лишенные присущей им способности расширять коронарные сосуды) денатурировали кипячением или инкубированием с 6 М мочевиной.

Одной из основных задач на этом этапе был поиск оптимальных условий для эффективного выявления кардиоактивных фрагментов, для этого исследовали различные температурные режимы, фермент-субстратные соотношения, время гидролиза, тестируя одновременно изменение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца.

На диаграмме (рис. 1) изображено изменение оттока крови в зависимости от температуры, времени инкубации и фермент-субстратного соотношения. В результате инкубации исследуемых белков с ферментом в соотношении 1:80 при температуре 37° в течение 8—12 ч выявлялось ак-

^{*} Эта часть работы выполнена в лаборатории химии белка Института белка АН СССР (Пушино-на-Оке).

тивное начало, которое увеличивало объемную емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца лишь на 30%, причем действие его было весьма непродолжительным. 13—18-часовой гидролиз уже при комнатной температуре, равной 20°, позволял выявить кардиоактивное начало, которое увеличивало объемную емкость крови на 60%. Увеличение температуры до 37° с сохранением 1:80 фермент-субстратного соотношения способствовало обнаружению фрагмента, расширяющего коронарные сосуды на 100%. Оптимальными условиями протеолиза, как видно из диаграммы, явились 19—22-часовая инкубация при 37° и фермент-субстратное соотношение 1:80. После приостановки ферментативной реакции на холоду триптический гидролизат лиофилизировали. Кардиоактивные соединения выделяли и очищали до гомогенного состояния по приведенной схеме (рис. 2). Аналогично был очищен и фрагмент белка-носителя нейрого르몬а «К» с некоторыми изменениями.

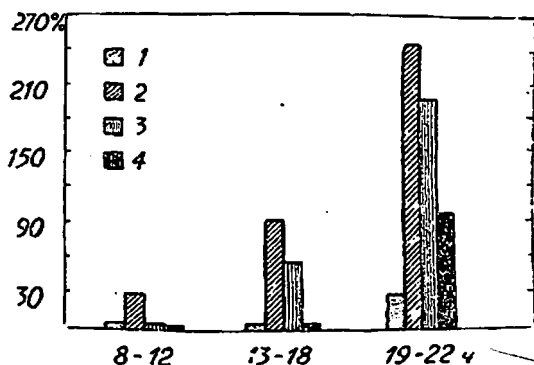


Рис. 1. Диаграмма изменения биологической активности триптических фрагментов (в %) под воздействием различных условий трипсинолиза: 1—фермент-субстратное соотношение 1:50, температура 20°; 2—фермент-субстратное соотношение 1:80, температура 37°; 3—фермент-субстратное соотношение 1:80, температура 20°; 4—фермент-субстратное соотношение 1:50, температура 37°

На первом этапе очистки была использована гель-фильтрация триптического гидролизата БНГ на сефадексе G-25, при этом были получены четыре фракции с максимумами поглощения в диапазоне 220, 258, 272 и 282 нм. По данным биологического тестирования, коронарорасширяющая активность была сосредоточена в третьем пике с максимумом поглощения при 272 нм. Фракцию условно обозначали как ТфБНГ (триптический фрагмент белка-носителя «Г»).

При гель-фильтрации триптического гидролизата БНК также было выявлено четыре фракции, первые две отличались от ТфБНГ по максимумам поглощения, отмеченным в районе 248 и 262 нм. Коронарорасширяющая активность, условно обозначенная как ТфБНК (триптический фрагмент белка-носителя нейрого르몬а «К»), была обнаружена в четвертом пике с максимумом поглощения в зоне 278 нм.

Разделенные кардиоактивные фракции, подвергнутые нисходящей

распределительной хроматографии, выявляли различные величины R_f : 0,35 для ТфБНК, 0,46 для ТфБНГ. При рехроматографии в аналогичных условиях разделения указанные начала сохраняли те же величины R_f .

В процессе работы была выявлена исключительная способность этих соединений сорбироваться при гель-фильтрации через сефадексы, для предотвращения чего была применена колонка, заполненная глицинамидированным сефадексом G-10 [11]. Удалось достичь не только адекватного выхода препаратов ТфБНК и ТфБНГ, но и диссоциировать каждый из них на две активные формы, которые обозначили по порядку элюирования из колонки как ТфБНГ₃, ТфБНГ₄ (рис. 3) и ТфБНК₃, ТфБНК₄ соответственно.

БЕЛОК - ГОРМОНАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС

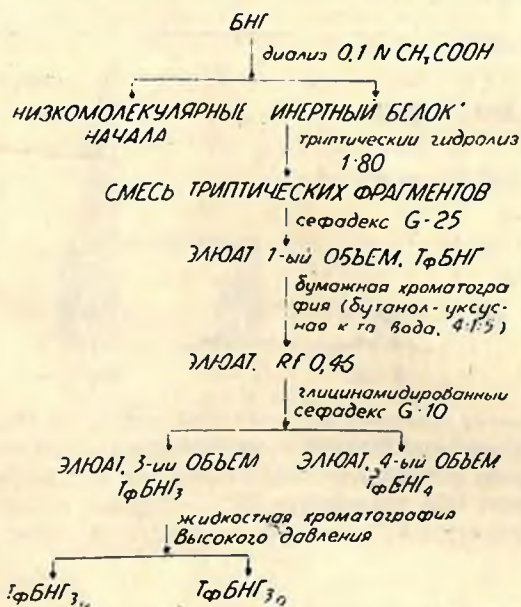


Рис. 2. Схема выделения и очистки кардиоактивного триптического фрагмента белка-носителя нейрого르몬а «Г» (БНГ)

Исследование некоторых биологических, физико-химических и биохимических свойств активных форм ТфБНК проводили после указанного этапа очистки. Препараты ТфБНГ, в частности ТфБНГ₃, были подвергнуты тонкослойной хроматографии на пластинках с окисью алюминия, где было выявлено два нингидринположительных и одно нингидринотрицательное соединения. Последнее по R_f оказалось сходным с соединением, относящимся к ряду нейтральных сахаров. Нингидринположительные соединения, которые были также обнаружены и при жидкостной хроматографии высокого давления параллельного образца ТфБНГ₃ отличались лишь различным действием на фосфодиэстеразу

(ФДЭ) сАМР мозга. По этому принципу их условно обозначали как ТфБНГ_{за} (активирующий) и ТфБНГ_{зи} (ингибирующий).

Эксперименты, проведенные на кошках в условиях *in situ*, выявили различие фармакологических свойств между триплическими фрагментами ТфБНГ и ТфБНК. Так, например, внутривенное введение кошкам элюатов ТфБНГ вызывало увеличение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца приблизительно на 200—250% по сравнению с нормой (рис. 4). Коронарорасширяющий эффект отмечался через 10 мин после введения препарата и достигал своего максимума на 30-й мин. Нарастание эффекта не было ярко выражено, кровяное давление не претерпевало особых изменений. По своему воздействию ТфБНГ сходен с действием вещества «Г», выделенным из состава низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта гипоталамической ткани. На рис. 4 представлена также диаграмма воздействия препарата ТфБНК на отток крови. При сравнении с действием ТфБНГ видно, что введенный препарат увеличивал объемную емкость крови приблизительно на 200% по сравнению с нормой. Максимум коронарорасширяющего эффекта был достигнут на 10-й мин и лишь через 2,5 ч возвращался к исходному уровню, аналогично воздействию нейrogормона «К». Между указанными формами каждого из фрагментов не были выявлены какие-либо различия в отношении биологической активности.

Исследования некоторых биохимических и физико-химических свойств также обнаружили ряд различий между ТфБНГ и ТфБНК. Так, например, если ТфБНГ ингибировал активность ФДЭ сАМР мозга, то ТфБНК не вызывал никаких изменений. Далее указанные фрагменты, оказывая незначительное влияние на активность фосфорилазы почек и печени, весьма существенно повышали активность этого фермента в мозгу, сердце и скелетной мышце. Однако каждый из них оказывал преимущественное влияние на активность фермента какого-либо одного органа: ТфБНГ активировал фосфорилазу сердца и скелетной мышцы на 170 и 163% соответственно, в то время как ТфБНК повышал активность фосфорилазы мозга на 100% [17].

Показано, что при одинаковых количествах взятых образцов фракция ТфБНГ отличалась более высоким содержанием белка по сравнению с ТфБНК (рис. 5). Отличались они и по электрофоретической подвижности, располагаясь по направлению к аноду в соответствии с R_f , равным для ТфБНК 0,08, а для ТфБНГ—0,18.

В отношении воздействия различных форм гидролиза (щелочной—1 н. NaOH и кислотный—6 н. HCl) оба фрагмента проявляли одинаковое свойство—при описанных условиях они полностью теряли присущую им биологическую активность.

Изучение растворимости указанных фрагментов показало, что они легко растворяются в воде (рН 5,5), кислых растворителях [2—4], проникают через полупроницаемую мембрану, нингидринположительны.

Результаты анализа аминокислотного состава двух биоактивных фракций ТфБНГ, ТфБНГ₃ и ТфБНГ₄, полученных, как было описано выше, после гель-фильтрации через глицинамидированный сефадекс G-10, представлены в табл. 1 (приведенные цифры представляют собой усредненное значение трех определений после предварительного гидролиза 5,7 н. HCl в течение 24 ч, триптофан не определяли).

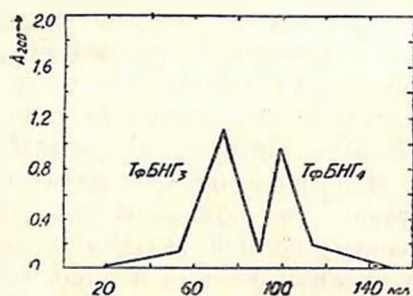


Рис. 3. Профиль элюции ТфБНГ через глицинамидированный сефадекс G-10 (колонка размерами 1×50 см, скорость элюции 10 мл/ч). По оси абсцисс—объем элюата.

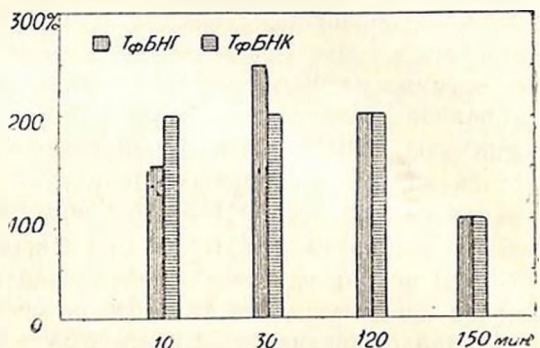


Рис. 4. Изменение объемной емкости крови (в %) при внутривенном введении кошкам элюатов ТфБНГ и ТфБНГК за единицу времени. По оси абсцисс—время введения препаратов. Объемная емкость крови в норме принята за 100%. Наркоз—уретан с хлоралозой.

Таблица 1

Аминокислотный состав
активных форм ТфБНГ

Аминокислоты	Содержание аминокислотных остатков, в ммоль	
	ТфБНГ ₃	ТфБНГ ₄
Asp	0,375	0,317
Thr	0,223	0,154
Ser	0,496	0,323
Glu	0,579	0,593
Pro	0,145	0,237
Gly	0,701	0,480
Ala	0,512	0,382
Val	0,341	0,269
Met	0,037	0,037
Ile	0,176	0,141
Leu	0,361	0,275
Tyr	0,164	0,080
Phe	0,167	0,118
His	0,092	0,078
Lys	0,247	0,226
Arg	0,198	0,105

Таблица 2

Аминокислотный состав
двух активных форм ТфБНГ₃

Аминокислоты	Содержание аминокислотных остатков, в ммоль	
	ТфБНГ _{3a}	ТфБНГ _{3н}
Asp	0,043	0,122
Thr	0,034	0,059
Ser	0,128	0,223
Glu	0,092	0,159
Pro	0,000	0,014
Gly	0,205	0,314
Ala	0,060	0,121
Val	0,046	0,059
Ile	0,017	0,031
Leu	0,014	0,033
Tyr	0,006	0,013
Phe	0,014	0,020
Lys	0,025	0,036
Arg	0,029	0,008

Как видно из приведенных данных, в аминокислотном составе ТфБНГ₃ преобладает содержание определенной группы аминокислот—глицина, глутамата, аланина, серина, аспартата, лейцина и валина.

В составе ТфБНГ₄ эти аминокислоты также являются преобладающими, однако количество глутамата, превосходит содержание глицина.

Приведенные данные свидетельствуют о некотором сходстве между ТфБНГ₃ и ТфБНГ₄ по аминокислотному составу, однако по количественному содержанию аминокислот доминирует ТфБНГ₃.

После жидкостной хроматографии высокого давления из этой фракции, как уже отмечалось, были получены две подфракции, оказывающие различное влияние на активность ФДЭ сАМР. Подфракция ТфБНГ_{3и}, элюировавшаяся из колонки RP-8, ингибировала активность ФДЭ сАМР на 51%, что значительно превышало способность ингибировать этот фермент у ТфБНГ₃ до разделения (28%). Подфракция ТфБНГ_{3а} обладала противоположным действием, активируя ФДЭ сАМР на 57,2%. Этот факт объясняет, по-видимому, противоречивые данные о том, что ТфБНГ_{3и} превосходит ТфБНГ₃ по способности ингибировать активность ФДЭ сАМР почти в два раза.

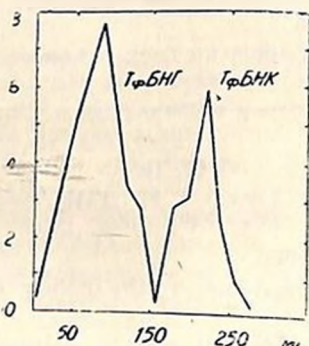


Рис. 5. Содержание белка, определенное в элюатах триптических фрагментов после гель-фильтрации через сефадекс G-25. По оси абсцисс—объем элюата в мл, по оси ординат—содержание белка в мг

Исследование аминокислотного состава указанных подфракций показало, что 68% от общего количества аминокислотных остатков составляют аспарагиновая кислота, серин, глутаминовая кислота, глицин и аланин, среди них превалирует содержание серина и глицина. Эти же аминокислоты преобладают в ТфБНГ_{3а}, составляя около 47% от общей суммы аминокислотных остатков. Превалирует также содержание аргинина по сравнению с ТфБНГ_{3и}, где он находится в следовых количествах.

Поскольку идентификация этих соединений не завершена, сделать окончательный вывод относительно изменения функциональных свойств в зависимости от химической структуры активных форм ТфБНГ₃ пока не представляется возможным.

SOME PROPERTIES OF CORONARODILATORY FRAGMENTS OF HYPOTHALAMIC NEUROSPECIFIC PROTEINS

SAAKYAN S. A., SRAPIONYAN R. M., SAAKYAN F. M., POPOVA T. V., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Arm. SSR Academy of Sciences, Yerevan

Coronarodilatory glycopeptides have been isolated from the trypsin hydrolysate of two specific proteins--the carriers of "K" and "G" neurohor-

mones. The existence of carbohydrate moiety has been proved by Schiff-periodic acid reaction. Glycine, glutamic acid, serine, alanine and aspartic acid residues prevail in the peptide moiety.

The tryptic fragment of neurohormone "G" protein-carrier inhibits brain cAMP phosphodiesterase. Data obtained point to the existence of biologically active glycopeptides—the components of bovine hypothalamus-specific proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Border J. L. South Med. J., 73, 473—476, 1980.
2. Bornstein J., Armstrong J. Mc. D., Padde B. M., Miskont L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 2—7, 1971.
3. Bohlen F., Brazeau P., Benott R., Ling N. Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, 725—734, 1980.
4. Estivartiz F., Hope J., Mc Lean C., Lowry P. J. Biochem. J., 191, 125—132, 1980.
5. Hakanson K., Ekman R., Sundler F., Nilsson R. Nature, 283, 799—792, 1980.
6. Coch B. M., Goldstein A., Li C. H. Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1821—1823, 1976.
7. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 6, 38, 305—307, 1964.
8. Срапионян Р. М., Джембазян Т. В., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 6, 157—160, 1970.
9. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, 11, 97—104, 1976.
10. Chen M., Creig S., Stoner J. Biochemistry, 19, 3559—3563, 1972.
11. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. ДАН АрмССР, 67, 176—179, 1978.
12. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., Мир, с. 248, 1971.
13. Davies B. J., Ornstein L. Disk-electrophoretic reprinted by Distillation Product. Ind., N. Y., 1962.
14. Zacharius R., Zell T. Anal. Biochem., 30, 148—152, 1969.
15. Lowry O. H., Rosenbough N. J., Farr A. L. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
16. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsh. Klin. Med., 116, 364, 1914.
17. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, 1, 36—42, 1982.

Поступила 20. XII 1982