

УДК 577.112

ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ БЫКА

Паронян З.Х., Срапионян Р.М., Абрамян С.С.,
Григорян Л.А., Галоян А.А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из мозгового слоя надпочечников выделены 8 коронароактивных факторов, ингибирующих ФДЭ сАМР. Исследовано влияние термообработки, протеолиза, а также кислотных и щелочных воздействий на их коронарорасширяющую способность и ингибирование ФДЭ сАМР.

Показано, что большинство из исследуемых соединений не проявляют присущих им указанных свойств в этих условиях. Лишь двое из них частично инактивируются (~ на 40—50%) и сохраняют в значительной степени (~ 75%) эффект ингибирования ФДЭ сАМР.

Установленный факт гликозилирования молекул этих соединений, обеспечивающий их большую стабильность, позволит объяснить определенную резистентность этих соединений к вышеописанным воздействиям, и в частности к протеолизу.

* * *

Впервые в 1973 году в мозговом слое надпочечников были обнаружены и идентифицированы 3 коронароактивных соединения [1]. В последующем из медуллы надпочечников удалось выделить уже 8 подобных соединений, условно обозначенных по параметрам выхода из колонок сефадекса G-10 и ДЭАЭ-ц как факторы М₁, М₁, М₁, М₂, М₃, М₃, М₄ и М₄ (М — медулла) [2]. Была допущена возможность их участия в реализации коронарорасширяющего эффекта гипоталамических нейрогормонов «К» и «С». Исследование возможной корреляции между действием этих соединений на изменение активности ФДЭ сАМР и коронарными эффектами обнаружило, подобно гипоталамическому нейрогормону «С» [3], зависимость коронарорасширяющего влияния этих факторов от степени ингибирования ФДЭ циклических нуклеотидов.

Целью данной работы было изучение физико-химических свойств новых факторов мозгового слоя надпочечников в сравнении с гипоталамическими кардиоактивными нейрогормонами, в частности с нС_{7a} (нейрогормон С_{7a}).

При этом основное внимание уделено трем факторам М₂, М₃, М₄, которые при различных экстремальных условиях (рН, температура) в определенной степени сохраняют коронарные эффекты.

Методы исследования

Коронароактивные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта мозгового слоя надпочечников быка по методу, описанному ранее [4].

Очистку и дифференциацию искомым факторов осуществляли по схеме, приведенной в нашей предыдущей работе [2].

Кислотный и щелочной гидролиз проводили в 6 н. HCl при 110° и NaOH при 90° и комнатной температуре в течение 1—24 ч.

Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в аммоний-бикарбонатном буфере, pH — 8,0 в течение 1—24 ч, поддерживая соотношение фермент/субстрат 1:80.

Активность ФДЭ cAMP мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу Pösch, Kukowetz [5], модифицированному применением радиоизотопного микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей ТСХ на пластинах Silufol UV—254 [6]. В качестве источника ФДЭ cAMP использовали супернатант гомогената (2000 г, 20 мин) мозга крыс. Счет радиоактивности продуктов гидролиза cAMP проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре SL—30 («Intertechnique», Франция). Детально методика описана ранее [3].

Аминокислотный состав кардиоактивных факторов определяли после гидролиза препаратов в стандартных условиях (5,7 н. HCl, 22 ч, 110°) в автоматическом анализаторе «Durrum Model 250» (США).

Биологическое тестирование — проверку на изменение коронарного оттока — проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования зависимости изменения коронарной активности и способности ингибировать активность ФДЭ cAMP (рис. 1), шесть из восьми факторов надпочечников оказались нерезистентными к кислотным (6 н. HCl) и щелочным (1 н. NaOH) воздействиям, теряя полностью свою нативную активность. Факторы же M₃ и M₄ частично инактивировались, вызывая увеличение коронарного оттока на 60 и 20% после кислотного гидролиза. После щелочного гидролиза указанные соединения инактивировались в большей степени, изменяя коронарный отток лишь на 25 и 10%. Инактивация препаратов заметно увеличивалась при повышении температуры до 90°. В этих условиях сохранял коронароактивность только фактор M₃, и то лишь на 20% (рис. 1, а).

Коррелирующие с изменением коронарорасширяющей активности данные были получены при изменении ингибирующего ФДЭ cAMP действия указанных факторов, подвергнутых кислотному гидролизу, проводимому в тех же условиях. Как видно из диаграммы (рис. 1, б), ингибирующая активность M₃ и M₄ факторов на ФДЭ cAMP уменьшалась от 33 (1,1E) до 25% (0,7E) и от 48,2 (1,6E) до 44% (1,2E) соответственно. При щелочном гидролизе ингибирующая ФДЭ cAMP активность M₄ фактора заметнее понижалась до 18,2 (0,3E), а у M₃ — до 20% (0,5E).

В отдельной серии экспериментов была изучена зависимость изменения коронароактивности искомым факторов мозгового слоя надпочечников от действия протеолитических ферментов — трипсина и химотрипсина. Поскольку получены аналогичные результаты, на диаграмме (рис. 2)

приведены данные трипсинолиза. Как оказалось, в зависимости от продолжительности действия этих ферментов, фактор M2 значительно инактивировался (1 ч) либо полностью (5—24 ч) терял способность расширять коронарные сосуды. Активность факторов M3₁ и M4₁ уменьшалась вдвое через 1 ч после начала протеолиза, оставаясь почти на таком же уровне в последующие 24 ч. Остальные факторы (M1₁, M1₂, M1₃, M3₂ и M4₂) полностью теряли нативную коронароактивность через 1 ч после начала протеолиза.

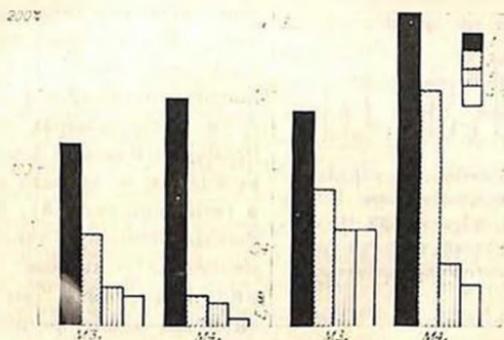


Рис. 1. Биологическая активность кардиоактивных факторов мозгового слоя надпочечников быка при воздействии различных факторов (а), ингибирующая ФДЭ сАМР мозга активность факторов надпочечника (б). За единицу активности принято то количество препарата, которое ингибирует 1 мЕ ФДЭ сАМР мозга за 1 мин. 1 — нативная форма препарата, 2 — гидролиз 6 н. НСl при 110°, 3 — щелочной гидролиз 1 н. NaOH при 22°, 4 — то же при 90°

Ингибирующая ФДЭ сАМР способность фактора M2 не изменялась в течение первого часа трипсинолиза (рис. 3), в последующие 5 ч она уменьшалась вдвое (от 0,4Е до 0,2Е) и исчезала полностью к концу протеолиза (24 ч). Таким же резким изменениям подвергался фактор M4₁, однако, в отличие от фактора M2, исчезновение его ингибирующего ФДЭ эффекта наблюдалось уже через 5 ч после начала протеолиза, а ингибирующий эффект фактора M3, в течение всей продолжительности трипсинолиза изменялся очень незначительно (от 0,7Е до 0,6Е).

При химотрипсинолизе (рис. 3) выявились различные сдвиги в изменении ингибирующей ФДЭ активности. Так, активность фактора M2 в течение первых 5 ч изменялась незначительно (от 0,4Е до 0,3Е), а ингибирующий эффект уменьшался вдвое лишь к концу протеолиза. Фактор M3₁ в течение 1 ч, как и при трипсинолизе, не подвергался изменениям, его ингибирующий эффект значительно уменьшался по сравнению с трипсинолизом в течение 5 ч и сохранялся до конца протеолиза. Действие химотрипсина на ингибирующее ФДЭ действие фактора M4, несколько слабее выражено по сравнению с трипсином в первый час после начала протеолиза. Если указанный фактор в последующие 5 ч и далее при трипсинолизе оказывался полностью нерезистентным к действию фермента, то при химотрипсинолизе он сохранял свою ингибирующую активность на

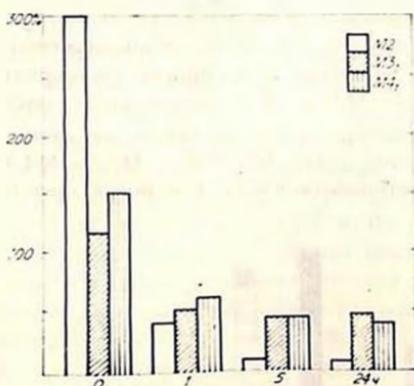


Рис. 2. Биологическая активность кардиоактивных факторов при трипсинолизе (в%), соотношение фермент/субстрат 1:80. По оси абсцисс — время инкубаций, ч; по оси ординат — изменение биологической активности, %

торов надпочечников, по-видимому, обусловлены их структурными различиями.

Безусловно, такое предположение нуждалось в экспериментальной аргументации. Определенный интерес в этой связи представляло изучение аминокислотного состава описанных кардиоактивных факторов. Сопоставление данных аминокислотного анализа факторов М2, М3, М4, свидетельствовало прежде всего об их сильно кислой природе. Остатки кислых

0,5Е, уменьшая ее к концу протеолиза до 0,3Е.

При интерпретации полученных данных, свидетельствующих о высокой резистентности кардиоактивных факторов надпочечников к описанным щелочным, кислотным воздействиям и протеолизу, необходимо отметить также ранее выявленные разнонаправленные действия этих соединений в отношении активности гликогенфосфорилазы в мозгу и висцеральных органах [7] и пресинаптической регуляции высвобождения и захвата катехоламинов в гипоталамусе [8]. Все описанные факты позволяют заключить, что выявляемые отличные биологические, биохимические, метаболические свойства идентифицированных факторов

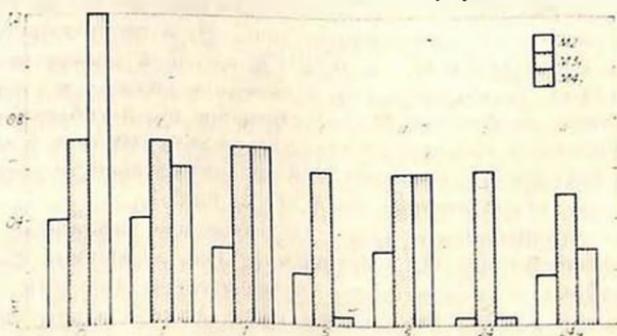


Рис. 3. Изменение инактивирующей ФДЭ сАМР мозга активности факторов надпочечника при воздействии трипсина (I) и химотрипсина (II). Обозначения те же, что на рис. 2

аминокислот в этих факторах составляют примерно 20, 33 и 38 моль/%, в то время как на долю основных аминокислот приходится примерно 9, 19 и 8 моль/% соответственно. Обращает на себя внимание, также как и в аминокислотном составе гипоталамического кардиотропного нейрогормо-

на «С», высокое содержание определенной группы аминокислот— глицина, серина, глутаминовой кислоты, составляющих в сумме примерно 50% от общей суммы аминокислотных остатков. В целом аминокислотный анализ выявил различия между факторами М₂, М₃ и М₄, по трем аминокислотным остаткам — пролину, метионину и цистину. Все три аминокислоты имеются в составе фактора М₄, и, наоборот, отсутствуют в составе фактора М₂. Фактор М₃ не содержит остатков пролина и цистеина. Ароматические аминокислоты, фенилаланин и тирозин представлены главным образом в составе факторов мозгового слоя надпочечников, но выявляются также и в составе кардиотропного нейрогормона «С».

Величины М_r, скорректированные с помощью аминокислотного анализа, оказались примерно равными для М₂, М₃ и М₄ факторов (900, 3600 и 3800 Д), которые коррелировали с полученными гель-фильтрацией на сефадексе G-10 данными (1200, 4100 и 4200 Д). Несколько заниженные величины М_r для факторов М₂, М₃ и М₄ путем коррекции данных его аминокислотного анализа можно объяснить, по-видимому, наличием небелковых, в частности, углеводных групп в молекуле этих соединений. Такое предположение подтвердилось при анализе М₃ фактора в присутствии стандартных аминсахаров, выявившего наличие глюкозаминов и галактозаминов. Наличие последних свидетельствовало о том, что молекулы этих факторов гликозилированы, чем и обусловлена, по-видимому, в определенной степени их резистентность к воздействию кислот, щелочей и протеолитических ферментов.

Полученные данные позволяют считать, что некоторые из обнаруженных в мозговом слое надпочечников кардиоактивных факторов, в частности М₃ фактор, являются родственными гипоталамическому нейрогормону «С». Однако относительно абсолютной идентичности можно будет утверждать после полной расшифровки химической структуры названных соединений.

CHARACTERISTICS OF CARDIOACTIVE COMPOUNDS FROM BOVINE ADRENAL MEDULLA

Paronyan Z.Kh., Srapionyan R.M.,
Abramyan S.S., Grigoryan L.A., Galoyan A.A.

*Institute of Biochemistry, Academy of
Sciences of Armenian SSR, Yerevan*

Eight coronaro-active compounds inhibiting cAMP PDE were isolated from the bovine adrenal medulla. Their capacity to dilate coronary vessels and to inhibit cAMP PDE was studied as a function of temperature, proteolytic cleavage and pH. The majority of the studied compounds were inactivated under these conditions. Only two substances retained 40—50% of their initial activity and inhibited (75%) cAMP PDE. Glycosylation of these compounds resulting in higher stability could explain the experimental data, specifically partial resistance to proteolysis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А.А., Срапионян Р.М., Саакян С.А. Докл. АН АрмССР, т.56, N2, с.102—105, 1973.
2. Срапионян Р.М., Паронян Э.Х., Абрамян С.С., Григорян Л.А., Карапетян Р.О., Галоян А.А. Нейрохимия, т.7, N2, с.61—68, 1988.
3. Галоян А.А., Гурвиц Б.Я., Погосян М.А. Вопр. биохимии мозга, т 11, с. 89-97, Ереван Изд-во АН АрмССР, 1976.
4. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, т. 8, с. 107—126, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1973.
5. Rösch G., Kukrweitz W. R. Life Sci., v. 10, p. 133—141, 1971.
6. Бериташвили Д. Р., Кафяни К. А. Вопр. мед. химии, т. 21, с. 322—329, 1975.
7. Абелян Ж. Г., Паронян Э. Х., Срапионян Р. М. Биол. Журн. Армении, т. 41, N 11, с. 928—931, 1988.
8. Арменян А. Р., Аракелян Л. Н., Паронян Э. Х., Абрамян С. С., Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 7, № 2, с. 78—82, 1988.

Поступила 19.03.1989

БЕРЕЗИН В.А., БЕЛИК Я.В. Специфические белки нервной ткани. — Киев: Наук. думка, 1990 (ПН). — 202 с. ил. — ISBN 5-12-001413-5 (в пер.): 4р. 30к.

В монографии обобщены новейшие литературные данные и результаты исследований авторов по идентификации, очистке, физико-химическим свойствам, тканевому и клеточному распределению, субклеточной локализации, функциональной роли различных специфических белков нервной ткани. Рассматриваются основные иммунохимические и физико-химические методы идентификации, очистки, изучения и количественного определения нейроспецифических белков. Особенностью монографии является то, что в ней тщательно анализируется теоретическое и практическое значение нейроспецифических белков в нейробиологии и нейропатологии. Рассматриваются особенности экспрессии нейроспецифических белков при малигнизации клеток мозга и проблемы применения этих белков в качестве маркеров при иммунохимической послеоперационной диагностике опухолей мозга. Подчеркивается перспективность использования моноклональных антител к нейроспецифическим маркерам в диагностике и иммунотерапии опухолей.