



УДК 577.171.3

О НЕКОТОРЫХ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ
МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ НЕЙРОГОРМОНА «С»СРАПИОНЯН Р. М., СААКЯН С. А., КАРАПЕТЯН Р. О., СААКЯН Ф. М.,
МАРКИН В. А., ОДАБАШЯН А. Б., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В предыдущей работе [1] было показано наличие множественных (4-х) форм кардиотропного нейрого르몬а «С» (nC), выделенных из гипоталамической области мозга. Исследование ряда физико-химических, биохимических и функциональных свойств, свидетельствующих о сходстве между этими соединениями, позволило заключить, что название нейрого르몬 «С» является собирательным понятием. Однако к вопросу классификации этих соединений, по-видимому, можно вернуться после выяснения их химической структуры.

В связи с вышесказанным, нам представлялось целесообразным проведение сравнительного изучения первичных характеристик (аминокислотный и углеводный состав) всех форм гипоталамического nC с целью выяснения структурных различий между ними.

Кардиоактивные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта обезжиривающей спирт-хлороформной смесью гипоталамической ткани по методу, описанному ранее [2]. Для сравнения были взяты препараты указанных соединений, диссоциированных от своих белковых носителей [3]. Гель-фильтрацию через сефадексы G-25 и модифицированный G-10, ИОХ на ДЭАЭ-ц проводили по схеме, описанной ранее [1]. ВЭЖХ проводили на аналитических колонках (0,5×30 см) с Ultrasphere ODS C₁₈ (Alltech) в смеси метанол-вода (3:1).

Аминокислотный состав определяли после гидролиза препаратов nC в стандартных условиях (5.7 НСl, 24 ч, 110°) в автоматическом анализаторе «Биотроник», модель LC 5000 (ФРГ). Моносахаридный состав определяли после метанолиза и *ре*-N-ацетилирования и превращения образующихся при гидролизе моносахаридов в N-(4-метилкумарин-7-ил) гликамины (АМК-сахара) по методу Хорлина и соавт. [4]. Дальнейшее разделение и количественное определение АМК-сахаров проводили на жидкостном хроматографе «Du Pont 8800» (Франция), снабженном точным флуориметром FS-970 («Shoefell», ФРГ) и интегратором Du Pont

SF 4100, на колонках (4,6×250 мм), Ultrasphere ODS («Alltech»), в системе 17,5%-ного водного этанола, содержащем 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. Использована защитная колонка (4,6×50 мм), заполненная Silasorb 10µm ODS. Соединения идентифицировали по способности ингибировать активность ФДЭ сАМР, определяемой по методу Pochl [5], модифицированному применением радионуклеотидного микрометода [6, 7]. Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Mogawitz [8].

Используя очистку по схеме, описанной ранее [1], удалось выделить 4 коронарорасширяющих иС-подобных и одно коронаросуживающее соединение, условно обозначенные по параметрам гель-фильтрации иС_{7a}, иС_{10a}, иС_{7b}, иС_{10b} и иС_{7a'}, соответственно. Сравнение некоторых биохимических характеристик, в частности способности ингибировать ФДЭ сАМР, показало, что они отличаются лишь степенью воздействия в одном и том же направлении—ингибируют в основном кальмодулинзависимую ФДЭ сАМР мозга. Подобная аналогия прослеживается и в отношении изменения коронарного оттока у большинства исследуемых соединений. Противоположное действие оказывает лишь иС_{7a}, суживающий в значительной степени коронарные сосуды. Для всех соединений характерно низкое значение рI; они способны сохранять положительный заряд даже при низких значениях рН [3]. Другим отличительным свойством для всех форм иС является отсутствие характерного для пептидных соединений поглощения в области 210 нм.

Таблица 1

Аминокислотный состав множественных форм нейрогормона «С»
(в нмоль/мкг пептида)

Аминокислоты	иС _{7a}	иС _{10a}	иС _{7b}	иС _{10b}
Asp	1,40 (1)	1,20 (1)	1,40 (1)	1,40 (1)
Thr	0,80 (1)	0,80 (1)	0,80 (1)	0,86 (1)
Ser	3,60 (4)	2,48 (2)	2,35 (2)	3,40 (3)
Glu	3,20 (3)	1,12 (1)	1,45 (1)	2,80 (3)
Gly	3,80 (4)	1,25 (1)	1,60 (2)	3,60 (3)
Ala	1,40 (1)	0,68 (1)	1,50 (1)	1,40 (1)
Val	0,48 (1)	0,62 (1)	0,30 (0)	0,47 (0)
Ileu	0,34 (0)	0,70 (1)	0,80 (1)	0
Leu	0,42 (0)	0,80 (1)	0,92 (1)	0
X	0	0,78	0	0
Gln	0	0	0,48	0,48
Gln	0,65	0	0,67	0,78
His	3,20 (3)	0	1,20 (1)	2,3 (2)

Примечание. Met, Cys, Trp не определяли. Количество пептида определено по методу Lowry.

Как оказалось, по аминокислотному составу (табл. 1) изоформы очень близки и характеризуются высоким (40—77%) содержанием, как и их предшествующие молекулы [9], определенной группы полярных аминокислотных остатков Asp, Ser, Glu, Gly, Ala и в особенности двух из них—Ser и Gly (23—43%). Процент кислых аминокислотных остатков

не компенсируется основными аминокислотами, что и обуславливает, по-видимому, их быстрое анодальное мигрирование. Кроме того, во всех указанных соединениях обнаруживается значительное количество аминосугаров GalN и GlcN, свидетельствующих о том, что молекулы их гликолизированы. Сопоставляя полученные данные, можно заключить, что, поскольку особых отличий в аминокислотном составе различных иС-форм не было обнаружено, сделать какие-либо окончательные выводы о различии в пептидной компоненте не представляется возможным. Ни для одного из этих соединений не удалось определить N-концевой аминокислотный остаток с помощью дансильирования, что позволило предположить блокирование аминогрупп в этих остатках определенными заместителями. Наличие углеводного компонента в некоторых из этих соединений (иС_{7a} и иС_{10a}) было установлено ранее данными масс-спектрального и ЯМР

Таблица 2.

Моносахаридный состав кардиоактивных множественных форм нейрогормона «С»

Сахары	Кардиоактивные гликопептиды, пмоль/моль Man			
	иС _{7a}	иС _{10a}	иС _{7b}	иС _{10b}
Gal	266,8	266,8	75,5	273,8
Man	245,2	287,9	54,9	241,7
GlcNAc	69,02	68,5	0	93,2
Fuc	61,05	50,7	0	49,0
GalNAc	38,09	37,5	51,5	23,2

Примечание. В качестве стандарта использовали ManN.

анализа. Так например, при масс-спектроскопии двух коронарорасширяющих форм иС и суживающего «спутника» иС_{7a}—иС_{7a'}, хотя и были выявлены определенные отличия по интенсивности основных пиков, однако в целом пики с *m/e* 331, 211, 169, имеющиеся во всех соединениях, свидетельствовали об их гликозидной природе [10]. Интерпретация полученных ПМР-спектров нативных молекул всех форм иС подтвердила заключение о том, что исследуемые соединения являются гликопептидами, различающимися в основном по количественному соотношению сахарных остатков в углеводном компоненте. Применение этих методов при структурном анализе углеводных компонентов гликоконъюгатов из-за недостаточной их чувствительности (наимольный уровень) оказалось неприемлемым для наших конкретных задач. Использование же метода, определяющего флуориметрически АМК-производные сахаров [4], позволяло получить, в частности, информацию о моносахаридном составе кардиоактивных гликопептидов (табл. 2). Полученные данные позволили соотнести кардиоактивные иС-формы к типу N-гликозидносвязанных, маннозобогатых гликопептидов. Можно было бы допустить также наличие О-цепей, связанных с остатками Ser, имея в виду достаточное количество Gal и GalNAc и высокое содержание Ser (29%). Впрочем, окон-

чательного вывода пока нет, так как выдвинутая гипотеза основывается только на одном косвенном и, по сути, формальном признаке—присутствии GalNAc. С другой стороны, за последние годы появились сведения об аналогичном факте (11), свидетельствующем о наличии GalNAc, заменяющего GlcNAc во «внутренней коре» N-гликана ряда гипофизарных гормонов (лютеотропина, фолликулотропина и тиреотропина). Проведенное сравнительное изучение периферичной характеристики множественных форм иС и выявленное сходство, в частности по аминокислотному составу, в некоторых случаях позволяет заключить, что эти формы произошли, по-видимому, от общего предшественника и подвергались в дальнейшем пост-трансляционной модификации. Безусловно, дальнейшие исследования, проводимые в этом направлении, представляются весьма важными, поскольку они сделают правомочным это допущение.

ON THE CERTAIN CHEMICAL PROPERTIES OF THE MULTIPLE FORMS OF NEUROHORMONE "C"

SRAPIONIAN R. M., SAAKIAN S. A., KARAPETIAN R. O., SAAKIAN F. M., MARKIN V. A., ODABASHIAN A. B., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Acad. Sci., Yerevan

Amino acid and monosaccharide composition of the multiple forms of hypothalamic neurohormone "C" has been investigated. The similarity of the forms by their amino acid composition has been revealed. The blocking of N-terminal amino acid residues of the all tested compounds has been established. The data obtained demonstrate that all the compounds being under investigation appertain to N-glycoside-bound, mannose-rich type of glycopeptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Срапионян Р. П., Карапетян Р. О., Абесян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян А. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф. Нейрохимия, т. 5, с. 354—365, 1986.
2. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 37, с. 157—160, 1963.
3. Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А. Вспр. биохимии мозга, т. 6, с. 157—160, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
4. Хорлян А. Я., Шиян С. Д., Маркин В. А., Насонов В. В., Мирзоянова М. Н. Биоорг. химия, т. 12, с. 1203—1212, 1986.
5. Poch G., Kukowitz W. R. Life Sci., v. 10, p. 133—141, 1971.
6. Беритацивили Д. Р., Кафиани К. А. Вспр. мед. химии, т. 21, с. 322—329, 1975.
7. Галоян А. А., Гурвич Б. Я., Полюсян М. А. Вспр. биохимии мозга, т. 11, с. 89—97. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
8. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsch. Klin. Med., v. 115, p. 364—397, 1914.
9. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
10. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Медведев Ф. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 302—305, 1978.
11. Parsons T. F., Pierce J. G. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci., v. 77, p. 7089—7093, 1980.

Поступила 2. II 1988