



УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

ГЛИКОПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА Ca^{2+} , ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И КАТЕХОЛАМИНОВ

ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изолированы и идентифицированы из гипоталамуса животных множественные формы метаболически активных кардиотропных нейропептидов гликопептидной природы, являющихся внутриклеточными регуляторами активности ферментов обмена циклических нуклеотидов, содержания Ca^{2+} . Нейрогормон «С» и его структурные аналоги являются мощными стимуляторами биосинтеза допамина и норадреналина в гипоталамусе и в полосатом теле.

Из гипоталамуса выделяли новые пептиды, которые активируют фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов и другие Ca^{2+} -кальмодулинзависимые ферменты без участия Ca^{2+} . Результаты этих исследований—новые доказательства пептидной теории регуляции метаболизма и функций висцеральных органов, развиваемой нами за последние 25 лет.

Уже четверть века коллектив руководимой мной лабораторией биохимии нейрогормонов систематически изучает нейроспецифические белки и органотропные нейрогормоны—полипептиды гипоталамо-нейрогипофизарной системы [1]. Особое внимание в наших исследованиях было обращено на белок-гормональные комплексы магнoцеллюлярных ядер гипоталамуса, являющихся нейрохимическими системами регуляции метаболизма и функции не только головного мозга, но и висцеральных органов, главным образом, сердца. Развитое нами представление об органотропных нейрогормонах гипоталамуса оказалось уместным и в отношении рилизинг-гормонов гипоталамуса [2].

Выдвинутые нами на основе экспериментальных данных концепции и теоретические положения легли в основу понимания биохимических механизмов генеза и метаболического влияния, а также функций множества органотропных пептидов гипоталамо-нейрогипофизарной системы мозга. Основные принципы и направления изучения биологии нейропептидов сводятся к следующему.

1. *Прогормональная концепция генеза пептидных гормонов.* В 1963 г. нами было выдвинуто положение о том, что пептидные гормоны гипоталамуса берут начало из общего белкового предшественника, образующегося при

участии рибосомного механизма. Образование же биологически активных пептидов происходит посттрансляционно—под влиянием протеолитических ферментов мозга. Экспериментальные доказательства этого положения мы получили еще в 1964 г. на примере выделенного нами специфического белка гипоталамуса [3]. За последние 15—20 лет в литературе накоплен большой фактический материал о том, что как рилизинг-гормоны, так и другие нейропептиды имеют своих белковых предшественников.

2. *Пептидная теория регуляции метаболизма и функций висцеральных органов.* С 1962 г. в нашей лаборатории накопился огромный экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что образуемые в гипоталамических нейросекреторных ядрах кардиотропные полипептиды, условно названные нами «К», «С» и «Г», их множественные формы, а также рилизинг-гормоны включаются в регуляцию тонких метаболических процессов (превращения нейромедиаторов, окислительное фосфорилирование и др.) в различных органах, в частности в сердце. Эти полипептиды удается выделить из синапсом и нейросекреторных гранул в виде белок-гормональных комплексов, состояющих вместе с протеолитическими ферментами, АТР, ферментами метаболизма циклических нуклеотидов, Ca^{2+} нейрохимические системы регуляции обмена веществ и функции висцеральных органов *in vivo*.

Главный вывод, вытекающий из выдвинутой нами пептидной теории, заключается в том, что обмен специфических белков-предшественников гормонов гипоталамо-нейрогипофизарной системы теснейшим образом связан с метаболизмом и функцией висцеральных органов.

Исследования в этом направлении привели нас к открытию эндокринных элементов сердца [4], имеющих тесные нейрогуморальные взаимоотношения с эндокринным аппаратом гипоталамуса (с механизмами образования и высвобождения гипоталамических нейропептидов в общий кровоток) [1]. Так, например, из предсердий нами выделен ряд метаболически активных пептидных гормонов, органом-мишенью которых является гипоталамус. Сердечные факторы через хеморецепторы каротидного синуса и соответствующие афферентные пути способствуют выбросу из гипоталамуса в общую циркуляцию кардиотропных нейрогормонов.

Между «эндокринным сердцем» и гипоталамусом существует нейрогуморальная обратная связь (короткий *feed-back*). Аналогичная связь обнаружена нами между инкреторным аппаратом поджелудочной железы и гипоталамусом (длинный *feed-back*), направленная на регуляцию метаболизма и функции сердца [5].

3. *Принцип кооперативности нейромедиатор — нейропептид.* Под этим подразумевается наличие двусторонних метаболических взаимоотношений (*feed-back*) нейропептид — медиатор, направленных на регуляцию функции мозга и висцеральных органов. Существует функционально-биохимическое взаимоотношение между полипептидными гормонами, входящими в состав нейросекреторного вещества, и специфическими химическими агентами нервной активности (нейромедиаторами).

Существуют интимные функционально-биохимические взаимоотношения как между отдельными «классическими» медиаторами, так и между нейропептидами и медиаторами в микроструктурах нейронов мозга.

Множественные формы кардиоактивных гликопептидов

Как уже было сказано, ранее нами были выделены 3 коронарорасширяющих соединения, условно обозначенных «К», «С» и «Г». Были изучены их биологические и физико-химические свойства, а также установлен их полипептидный характер. Путем гель-фильтрации на глицинамидированном сефадексе, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с ИОХ на ДЕАЕ-целлюлозе и т. д. каждую группу нейрогормонов «К», «С» и «Г» можно разделить на субфракции с биологическими и физико-химическими свойствами, весьма близкими друг с другом [6]. В итоге из каждой группы были изолированы по 4 пептида, условно названных нС_{7a} , нС_{7b} , нС_{10a} , нС_{10b} , нГ_{3a} , нГ_{3b} , нГ_{5a} , нГ_{5b} , нК_{3a} , нК_{3b} , нК_{5a} , нК_{5b} . При этом кардиоактивные гликопептиды были выделены как из состава низкомолекулярных соединений, так и из соответствующих белок-гормональных комплексов, так как гликопептиды оказались электростатически адсорбированными на белках, и эти комплексы удалось разъединить путем специального диализа разведенными растворами уксусной кислоты. С помощью ВЭЖХ все эти пептиды были получены в индивидуальном виде и был проведен их аминокислотный анализ. В состав этих пептидов в значительном количестве входят глицин, серин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, валин, изолейцин, гистидин. В аминокислотном составе нК_{3a} отсутствуют тирозин и пролин. Характерным для них является содержание аминосахаров—глюкозамина и галактозамина, что позволяет считать их гликопептидами. Наличие углеводного компонента в изоформах нейрогормона «С» было подтверждено методами масс-спектрального и ЯМР-анализа. Так, например, при масс-спектрометрии двух коронарорасширяющих форм нС_{7a} и нС_{10a} были выявлены интенсивные пики с m/e 331, 211, 169, 109, свидетельствующие о наличии гликозидных соединений. ЯМР-анализ показал во всех формах нейрогормона «С» наличие углеводного компонента, одновременно выявив отличия между ними, которые сводятся к различному количественному соотношению сахарных остатков в углеводном компоненте. Интересно заметить, что их белковые предшественники, как и можно было ожидать, являются гликопротеинами с типичной олигосахаридной частью.

Характерной особенностью выделенных нами кардиоактивных полипептидов гипоталамуса является то, что они ингибируют активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимых форм фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов.

Нейрогормон «К» сам по себе не оказывает ингибирующего влияния на активность ФДЭ. Но после его частичного гидролиза (6 ч, 6 н. НС1) из состава нК_{3a} и нК_{3b} отщепляются 3 и 4 нейропептида соответствен-

но, которые после разделения путем ВЭЖХ проявляют характерное ингибирующее влияние на ФДЭ. Почти все изученные пептиды являются активаторами фосфорилазы печени, почек и мышц а главным образом сердца и мозга.

Нейрогормональная регуляция содержания Ca^{2+} в клетке

Нейрогормон «С» является уникальным регулятором содержания Ca^{2+} в клетке. Было изучено распределение Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, митохондриях сердца и мозга, изменения различных связывающих Ca^{2+} белков указанных органелл под влиянием нейрогормона «С» в норме и при изопротереноловом некрозе миокарда. Установлено, что внутрибрюшинное введение нейрогормона «С» крысам в дозе 80—100 мЕ ФДЭ [9] не вызывало особо заметных сдвигов в белковом спектре внутриклеточных органелл, однако изменяло средство определенных белков к $^{45}CaCl_2$. Это свойство нейрогормона «С» особенно проявлялось при изопротереноловом некрозе. Показано, что нейрогормон «С» способствовал выводу избыточных количеств Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума как в норме, так и в патологических условиях [7]. Изменение средства специфических белков к Ca^{2+} , вероятно, объясняется фосфорилированием одних и дефосфорилированием других белков под влиянием соответствующих АМР-зависимых протеникиназ и фосфопротеинфосфатаз. Тем самым осуществляется взаимодействие двух систем мессенджеров—циклических нуклеотидов и Ca^{2+} .

Действие нейрогормона «С» на синтез катехоламинов в мозгу крыс

Установлено, что нейрогормон «С» оказывал дозозависимое (2—40 мЕ ФДЭ) разнонаправленное действие на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина в срезах гипоталамуса мозга крыс [8]. Нейрогормон «С» (1,6 мЕ/мл) увеличивал скорость синтеза дофамина и норадреналина в 7,3 и 6,4 раза соответственно. С увеличением дозы нейрогормона «С» (16 мЕ/мл) наблюдали ингибирование синтеза как дофамина, так и норадреналина в 7,4 и 5,9 раза соответственно.

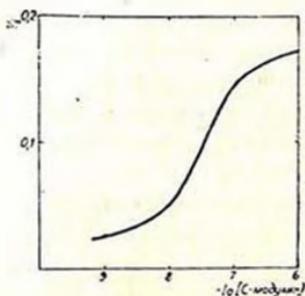
При изучении синтеза ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина под действием нейрогормона «С» в срезах полосатого тела мозга крыс была выявлена однонаправленность влияния препарата в зависимости от дозы.

Было обнаружено, что нейрогормон «С» в зависимости от дозы (1,6 и 16 мЕ/мл) увеличивал синтез ^{14}C -дофамина в 1,7 и 16 раз соответственно. Синтез ^{14}C -норадреналина под влиянием этого гормона в тех же дозах увеличивался в 2,1 и 48 раз соответственно. При этом нейрогормон «С» не влиял на захват и высвобождение катехоламинов. Таким образом, получены убедительные доказательства роли нейрогормона «С» именно в биосинтезе катехоламинов.

Эти процессы мы связываем с изменением содержания Ca^{2+} и циклических нуклеотидов в органеллах клетки.

Ca²⁺-независимая пептидная система активации ФДЭ циклических нуклеотидов мозга

Наличие большого числа Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов (Ca²⁺-КМ), компартиментализация Ca²⁺-КМ ферментных систем, лимитирование концентраций кальмодулина или изменение содержания Ca²⁺-связывающих белков в мозгу и других органах предполагает существование кальмодулинподобных, но Ca²⁺-независимых регуляторов в клетке.



Активирование гидролиза (V₁)
сАМР С-модулином в
отсутствие кальмодулина

Стимуляция ФДЭ проявлялась в повышении величины V₁ без изменения K_m для сАМР. Кинетический анализ не выявил непосредственного взаимодействия активатора с субстратсвязывающими центрами ФДЭ. Связывание его с аллостерическими центрами ФДЭ характеризуется высоким сродством к ферменту и носит выраженный кооперативный характер (рисунок).

Действие активатора на ФДЭ не проявлялось после его инкубации с трипсином, что подтверждает пептидный характер этих соединений. Выделенные пептиды отличаются термостабильностью. Чувствительность ФДЭ к активатору изменялась в зависимости от степени очистки фермента, определяющей, вероятно, конформационное состояние его молекулы, доступность ее аллостерических центров, наличие в препаратах фермента соединений—антагонистов активатора и других эффекторов.

Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что пептидные активаторы ФДЭ сопровождают нейрогормон «С» на всех этапах его очистки, включающих гель-фильтрацию, ионообменную и тонкослойную хроматографии. Лишь с помощью обратнoфазовой жидкостной хроматографии при высоком давлении удалось разделить активаторы и ингибиторы ФДЭ. На основании этих результатов в совокупности с данными, полученными ранее, можно предположить, что стимулирующий и ингибирующий ФДЭ факторы образуют высокоэффективный комплекс в составе препарата нейрогормона «С», регулирующий проявление его кардиотропного действия.

Обнаруженный Ca^{2+} -независимый активатор ФДЭ циклических нуклеотидов был нами назван С-модулином. По кинетическим данным, в ФДЭ имеются, по крайней мере, два центра для С-модулина ($n_{11} = 2$). Нейрогормон же «С», по нашим данным, является конкурентным ингибитором ФДЭ сАМР [9]. Нами накоплен значительный материал, свидетельствующий о наличии ряда пептидов (С-модулинподобных), которые, связываясь с W-7 и трифторпиразином (ингибиторами кальмодулина), теряют Ca^{2+} -независимый стимулирующий эффект на активность ФДЭ сАМР гипоталамуса (Гурвиц, Абрамян, 1986).

В настоящее время известен ряд факторов, вызывающих Ca^{2+} -независимую активацию не только ФДЭ, но и других кальмодулинзависимых систем. К их числу относятся жирные кислоты и фосфолипиды, бактериомодулин [10, 11]. Однако сродство этих соединений к ФДЭ на 4—5 порядков ниже по сравнению с кальмодулином. Можно предположить, что при лимитированной концентрации последнего или же Ca^{2+} взаимодействие с ним каждого из множества кальмодулинзависимых белков будет затруднено. В этом случае решающую роль играют компартиментализация того или иного фермента, изменения концентрации субстрата и Ca^{2+} , регулирующих чувствительность фермента к кальмодулину и другие факторы. Особый интерес в этой связи привлекают кальмодулинподобные, но Ca^{2+} -независимые регуляторы в клетке, которые, как С-модулин и его множественные формы, могут стимулировать ФДЭ сАМР в гораздо меньших концентрациях, чем кальмодулин. Видимо, этим можно объяснить исключительно высокую активность ФДЭ мозга, когда концентрация Ca^{2+} составляет всего $\sim 10^{-7}$ М (то есть тогда, когда Ca^{2+} еще не в состоянии связываться с кальмодулином). Можно полагать, что С-модулин является также регулятором других Ca^{2+} -КМ-зависимых ферментов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что имеются функционально-биохимические интимные взаимоотношения между указанными выше мессенджерами в клетке (Ca^{2+} , катехоламины, циклические нуклеотиды). Эти процессы, как показывают наши данные, тонко регулируются гликопептидными соединениями гипоталамуса. Вместе с тем, удалось установить наличие Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} -независимых пептидов—регуляторов активности ФДЭ сАМР в мозгу.

INVOLVEMENT OF GLYCOPEPTIDE HORMONES FROM HYPOTHALAMUS IN THE REGULATION OF METABOLISM OF Ca^{2+} , CYCLIC NUCLEOTIDES AND CATECHOLAMINES

GALOYAN A. A.

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

Multiple forms of metabolically active cardiotropic neurohormones have been isolated from mammalian hypothalamus. These glycopeptides regulate the activity of enzymes involved in cyclic nucleotides metabolism

and the intracellular concentration of Ca^{2+} . Neurohormone "C" and its structural analogs essentially stimulate biosynthesis of dopamine and noradrenaline in hypothalamus and noradrenaline in hypothalamus and corpus striatum.

Novel peptides have been purified from hypothalamus that activate cyclic nucleotides PDE and other Ca^{2+} , calmodulin-dependent enzymes in the absence of Ca^{2+} . Data obtained support the peptide theory of regulation of metabolism and function of visceral organs that has been put forward 25 years ago.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, №6, p. 769—789, 1986.
2. Галоян А. А. Биол. журн. Армении, т. 28, № 12, с. 61—64, 1975.
3. Галоян А. А. Докл. АН Арм.ССР, т. 38, с. 305—308, 1964.
4. Галоян А. А., Ростомян М. А. Биол. журн. Армении, т. 20, № 9, с. 3—7, 1967.
5. Galoyan A., *Ergebn. d. experiment. Mediz.*, V. 29, S. 99—115, 1978.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абсляян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф. Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—364, 1986.
7. Galoyan A. A., Kevoorkian G. A., Voskantan L. H., Alexanian S. S., Muradian M. Sh. Neurochem. Res., 1987.
8. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Елизарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—48, 1986.
9. Galoyan A. A., Gurvitz B. Ja., Saribekian G. A., Kirakosova A. S. Adv. Biosci. (eds. Selowie G., Robison G. A.), v. 24, p. 165—181, 1979.
10. Wolff D. V., Broström C. O. Arch. Biochem. and Biophys., 173, p. 720—731, 1976.
11. Alakhov V. Yu., Emelyanenko E. L., Shakhparonov M. L., Dudkin S. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 132, p. 591—597, 1985.

Поступила 9. IX 1986

УДК 577.175.82+577.112.387+612.82

СЛЕДОВЫЕ АМИНЫ КАК НЕЙРОТРАНСМИТТЕРЫ И НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ

БОУЛТОН А. А.

Отдел психических исследований Саскачеванского университета, Саскатун, Канада

В настоящем сообщении представлены доказательства, подтверждающие представление, что так называемые следовые амины могут выступать в роли трансмисмиттеров и нейромодуляторов. Рассмотрены свойства фенилэтиламина (ФЭА), м-тирамина (мТА), п-тирамина (пТА) и триптамина (Т), которые на совещании, проведенном под эгидой Американи-