

УДК 577.175.52

БИОХИМИЯ

Р. М. Срапионян, С. А. Саакян, Ф. А. Медведев, Ф. М. Саакян
член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

К вопросу о химической структуре триптического фрагмента кардиоактивного белка гипоталамуса

(Представлено 26/XII 1979)

На протяжении многих лет нами изучаются специфические белки-носители кардиоактивных нейрогормонов гипоталамуса крупного рогатого скота (¹⁻²). Было высказано предположение о том, что эти белки могут быть также предшественниками кардиоактивных начал (³). Для экспериментального доказательства этого предположения возникла необходимость разработки ряда методов, позволяющих выявить активные начала, если таковые имеются, из структуры указанных белков. Из проведенных многочисленных экспериментов интерес представляет протеолиз этих белков под действием трипсина (⁴). После диссоциации коронарорасширяющих соединений от своих белковых носителей (путем длительного диализа против разведенных растворов уксусной кислоты) последние оказались полностью лишенными биологической активности, которая не восстанавливалась ни денатурацией 6—8 М мочевиной, ни температурным воздействием до 90—100°C. Однако под воздействием трипсина удавалось выявить из первичной структуры белка кардиоактивное начало, сходное по многим параметрам с нейрогормоном «С».

Возникла необходимость разработки препаративного метода получения кардиоактивного фрагмента в гомогенном виде и проведения его идентификации, что явилось целью настоящего исследования.

В работе использованы следующие препараты: ссфадексы G-100, G-25, G-10 — фирмы «Pharmacia», ДЕАЕ-целлюлоза — «Whatman», амфолины — «LKB», трипсин — «Warthington». Остальные реактивы фирмы «Reanal» и отечественного производства.

Свежие гипоталамусы крупного рогатого скота очищали от кровеносных сосудов и пленки, промывали в холодной дистиллированной воде и готовили ацетоновые порошки следующим образом. 10 г гипоталамической ткани размельчали и гомогенизировали в 100 мл холодного ацетона в течение 90 сек при —20°C. Ацетон удаляли отсасыва-

нием на воронке Бюхнера. Осадок суспендировали в том же количестве ацетона и процедуру повторяли. Материал высушивали под вакуумом. Полученный ацетоновый порошок суспендировали в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7,36) из расчета 1 г/10 мл и после 18-часовой экстракции на мешалке при -4°C суспензию центрифугировали при 5000 г в течение 30 мин. Прозрачный супернатант фракционировали с помощью сульфата аммония. В качестве источника коронароактивного белка использовали фракцию, выделенную в пределах насыщения 75—100%.

Дальнейшую очистку коронароактивного белка осуществляли по схеме, описанной в наших предыдущих исследованиях (^{2,4}) и включающей в себя гель-фильтрацию через сефадекс G-100, ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе, изoeлектрофокусирование в градиенте амфолинов, рН 5—7.

Диссоциацию комплекса белок — гормон осуществляли путем диализа против 0,1 н. раствора уксусной кислоты на мешалке в течение 48 час.

Водный раствор отдиссоциированного белка денатурировали кипячением в течение 5 мин либо инкубировали с 6 М мочевиной. После охлаждения до 37°C к раствору белка добавляли дважды перекристаллизованный трипсин в борно-боратном буфере, рН 7,8. Соотношение фермент — субстрат поддерживали 1:80 (по весу). Ферментативную реакцию приостанавливали после 18-часовой инкубации и гидролизат лиофилизировали. Продукты триптического гидролизата дифференцировали гелевой фильтрацией через сефадекс G-25 (колонка размерами 3×56 см), уравновешенный борно-боратным буфером, рН 7,8. Элюцию вели тем же буфером или дистиллированной водой со скоростью 20 мл/30 мин. В качестве маркера использовали 0,01%-ный водный раствор голубого декстрана. Активный элюат высушивали лиофильно и подвергали хроматографии на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5). После высушивания хроматограмм активную зону вырезали, элюировали дистиллированной водой и рехроматографировали при тех же условиях. Активные элюаты доочищали гель-фильтрацией через сефадекс G-10, упакованный в колонку размерами 1×50 см и обработанный глицинамидированием по методу Крэга (⁵) с нашими модификациями (⁶). Элюцию вели в дистиллированной водой со скоростью 10 мл/час. Активный элюат лиофильно высушивали.

По ходу очистки тестирование активных начал проводили двумя способами: а) измерением коронарного кровотока в условиях *in situ* по известной методике (⁷) и б) определением фосфоэстеразной активности в мозгу крыс способом, описанным ранее (⁸).

Спектральный анализ проводили на спектрофотометре Unicam SP-800 и СФ 26. Изoeлектрическую точку определяли изoeлектрофокусированием в 3%-ном растворе амфолина с интервалом рН 5—7 в 110 мл колонке фирмы «LKB».

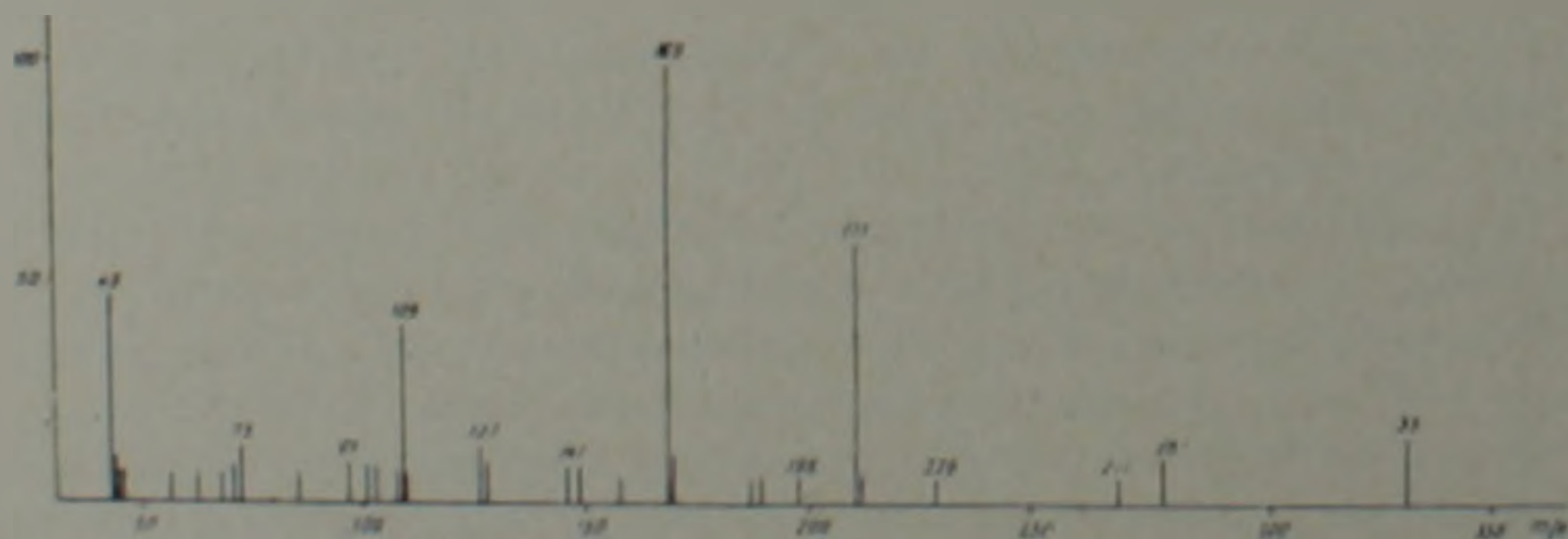
Для проведения масс-спектрального анализа кардиоактивных пре-

паратов последние были предварительно метилированы и ацетилированы по методу, описанному ранее (⁹). После упаривания растворителей образцы анализировали методом газо-жидкостной хроматографии. Работу проводили на квадрупольном хромото-масс-спектрометре фирмы «Finnigan» (США) с автоматической системой обработки данных и стеклянной капиллярной колонкой 0,25 мм × 25 м с фазой Е-30. Температурный режим — 150—290°C, по 6° в минуту: изотерма в течение 30 мин при 290°C, инжектор и переходные линии — 280°C. Газ-носитель — гелий с потоком 1,5 мл в минуту. Масс-спектры получали методом электронного удара при энергии ионизации 70 электрон-вольт в диапазоне массовых чисел 41—420.

В результате применения разработанного нами способа очистки, включающего в себя гелевую фильтрацию на сефадексе G-25, глицинамидированном сефадексе G-10, хроматографию и электрофорез на бумаге, был получен высокоочищенный препарат триптического кардиоактивного фрагмента (условно обозначенного как «С₄» по профилю элюции через сефадекс).

Изоэлектрическая точка «С₄», определяемая методом изоэлектрофокусировки, оказалась близкой к рН 5,7.

Кардиоактивный фрагмент в нативном состоянии характеризуется очень слабой нингидрин-положительной реакцией. Однако после кислотного гидролиза бн. HCl и последующего окрашивания продуктов гидролизата на хроматограмме выявлялись три нингидринположительных соединения, причем реакция окрашивания проходила гораздо интенсивнее. Поскольку результаты этих исследований были воспроизведены неоднократно, то правомочным кажется предположение о том, что при ферментативном гидролизе из первичной структуры специфического белка отщепляется кардиоактивное начало в виде пептидно-гликозидного комплекса. Не исключена возможность, что аминокислоты, входящие в пептидную часть указанного комплекса, циклизованы в гликозидной, и высвобождаются только после кислотного гидролиза при высоких температурных воздействиях; по этой же причине в данном случае усиливается положительная реакция на нингидрин.



Масс-спектр ацетилированного производного кардиоактивного триптического фрагмента «С₄» на оси абсцисс — масса фрагментов вещества (m/e), на оси ординат — относительная интенсивность в %

При высоковольтном электрофорезе на бумаге «С₄» слабо мигрировал при pH 6,2 единственной зоной к аноду.

О гомогенности препарата свидетельствовали также результаты, полученные при газожидкостной хроматографии (ГЖХ) кардиоактивного фрагмента. На рисунке показан масс-спектр фрагмента «С₄». С помощью реконструкции по максимальному в спектре иону с m/e 169 выявлен пик аналога нейрого르몬а «С» со временем удерживания 34,15. Как видно из рисунка, интенсивные пики m/e 109, 127, 169, 211, 229, 271, 331 указывают на наличие в веществе гексапиранозильного остатка (9).

При прямом вводе образца непосредственно в источник ионов и прогрева до 300°C относительные соотношения по m/e S₃₃₁/S₁₆₉ и S₂₁₁/S₁₆₉ сохраняются (таблица), но абсолютные количества не совпадают. Возможно потому, что при прямом вводе концентрация образца увеличивается почти в три раза.

Выше мы говорили о том, что триптический кардиоактивный фрагмент после кислотного гидролиза выявил три нингидринположительных соединения. При ГЖХ того же фрагмента гидролизованного препарата «С₄» основная масса вещества с m/e 169 была сосредоточена в зоне со временем удерживания 34,83 мин. Кроме пиков, характерных для полностью ацетилированного гексапиранозильного остатка, в масс-спектре отмечены маленькие пики с m/e 94, 168, 191, 266, 288, по-видимому, относящиеся к гидролизованным продуктам.

Масс-спектрометрическая характеристика нативного и гидролизованного препаратов «С₄», полученная при прямом вводе проб

Название фракции	Время удерживания, мин	Величина площадей условных единиц по m/e			Отношение величин площадей, %	
		S ₃₃₁	S ₁₆₉	S ₂₁₁	S ₂₁₁ /S ₁₆₉	S ₂₁₁ /S ₃₃₁
Нативный «С ₄ »	34.15	9558	63400	37000	15.2	58.6
Гидролизованный «С ₄ »	34.83	13400	107000	78000	12.5	72.9

При прямом вводе образца появляется новый пик с m/e 407. Отмечается в этом случае увеличенное соотношение S₂₁₁/S₁₆₉ (таблица), обусловленное наличием макрокомпонента с m/e 210.

Так как при одинаковых условиях анализа площадь под этими кривыми можно считать мерой концентрации данного вещества, следовательно, сопоставление величин измеряемых площадей нативного и гидролизованного препаратов «С₄» свидетельствует об относительном максимальном содержании кардиоактивного соединения в гидролизованном препарате.

В результате проведенных нами исследований получены экспериментальные доказательства о том, что по ряду физико-химических

свойств указанное соединение проявляет большое сходство с нейрогормоном «С» (⁹).

Таким образом, основной вывод заключается в следующем: качественное сходство масс-спектров нейрогормона «С» и коронароактивного триптического фрагмента «С₄», одинаковое время удерживания основного вещества может свидетельствовать о наличии в составе белкового носителя структурного изомера нейрогормона «С».

Институт биохимии

Академии наук Армянской ССР

Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Ո. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Յ. Ա. ՄԻՆՎԵՐԵՎ, Յ. Մ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ,

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ բժշկական-առողջապահության ԳԱԼՈՅԱՆ

Հիպոթալամիկ կադրիոսկոպիկ սպիտակուցի տրիպտիկ ֆրագմենտի հիմնական կառուցվածքի հաբցի մասին

Հիպոթալամիկ սպիտակուցի տրիպտիկ հիդրոլիզատից անջատված է սրտի պսակաձև անոթները լայնացնող ֆրագմենտ, որն իր ֆիզիկա-քիմիական որոշ հատկություններով զգալիորեն նման է նեյրոհորմոն «С»-ին: Այս նմանությունը հաստատվել է նաև մասն-սպիտակ անալիզի տվյալներով:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- Ք. Մ. Տրափոնյան, Դ. Յ. Ժամբաջյան, Ա. Ա. Գալոյան, Вопросы биохимии мозга. Изд-во АН АрмССР, Ереван, вып. 6 (1970).² Ք. Մ. Տրափոնյան, Տ. Ա. Տափոնյան, Ա. Ա. Գալոյան, Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, Ереван, вып. 11 (1976).³ Ա. Ա. Գալոյան, в кн «Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции», Изд-во «Айастан», Ереван, 1965.⁴ Ք. Մ. Տրափոնյան, Փ. Մ. Տափոնյան, Տ. Ա. Տափոնյան, Ա. Ա. Գալոյան, Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, Ереван, вып. 13 (1978).⁵ С. Hao-Chia, С. Lyman, Creig, S. Stoner, Biochemistry, 11, 19 (1972).⁶ Ա. Ա. Գալոյան, Ք. Մ. Տրափոնյան, Ք. Օ. Կարապետյան և օր., ДАН АрмССР, т. 67, № 3 (1978).⁷ P. Z. Marawitz, A. Zahn, Deutsch. Arch. Klin. Med., 116, 364 (1934).⁸ Ա. Ա. Գալոյան, Բ. Ե. Գուրաշ, Մ. Ա. Սոգոսյան, Вопросы биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, Ереван, вып. 11 (1976).⁹ Ա. Ա. Գալոյան, Ք. Մ. Տրափոնյան, Փ. Մ. Մեծաբեկ, ДАН АрмССР, т. 66, № 5 (1978).