

УДК 591.147.1/2

БИОХИМИЯ

Р. А. Свакян, Х. С. Саядян, А. А. Чарчоглян

Хроматографическое разделение экстрактов парашитовидных желез

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР В. Г. Мхитаряном 29/1 1988)

Парашитовидные железы (ПЩЖ) являются одним из главных регуляторов гомеостаза кальция. Наиболее изученным гормоном ПЩЖ является паратиреоидный гормон (ПТГ), долгое время считавшийся единственным гормоном, секретиремым ПЩЖ. Однако после открытия в 1974 г. Кемпером с соавторами паратиреоидного секреторного белка (1), выделенного ими из экстракта ПЩЖ, была доказана секреция паратиреоидными железами и других белков, таких как активатор плазминогена (2), белок Н, сходный с тимическим убиквитинном (3,4). Все они не обладают паратиреоидподобной активностью. В последние годы появились работы, указывающие на возможность непосредственного воздействия гормонов ПЩЖ на метаболические процессы ряда соматических клеток. В частности показана рецепция ПТГ клетками печени, почек, лимфоцитов и т. д. (5-7). В настоящей работе мы попытались подобрать оптимальные условия для очистки экстракта ПЩЖ с целью получения более широкого спектра белков, обладающих иммуномодуляторной активностью, и использовать для хроматографического разделения экстракта гель TOYO PEARL HW-55.

Для получения экстрактов ПЩЖ непосредственно во время убоя скота у половозрелых быков и коров отделяли железы и помещали в среду 199 при 4°C. Не позже чем через 1—1,5 ч железы доставляли в лабораторию, где и проводили их обработку. Для этого отделяли ткань железы от сопутствующего жира и растирали с жидким азотом в фарфоровой ступке до получения гомогенного порошка.

Для получения ацетонового экстракта пудру заливали холодным ацетоном (—20°C) в соотношении вес к объему 1:5, смешивали в течение 20 мин при 4°C, затем центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость сливали, а к осадку приливали этиловый эфир в соотношении 1:2. После 20-минутной инкубации в холодных условиях при постоянном помешивании надосадочную жидкость сливали, а процедуру с эфиром повторяли 2 раза. Полученный осадок высушивали в вакуумной камере и растирали в 0,01 М TRIS HCl буфере рН 7,4 с добавлением 0,001 М ЭДТА и 0,2 М NaCl. Экстракцию проводили в течение 16—24 ч при непрерывном помешивании.

Для получения фосфатного экстракта после растирания в жидком азоте пудру заливали 0,01 М Na-Na фосфатным буфером рН 7,4

с добавлением 0,2 М NaCl и 0,001 М ЭДТА. Экстракция шла 24 ч при температуре 4°C и непрерывном помешивании.

После экстракции образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 40 мин, разливали по аликвотам и хранили при температуре не выше—20°C. Перед употреблением для освобождения от нерастворимых частиц и стерилизации экстракт пропускали через ацетатцеллюлозные фильтры фирмы Millipore (США) марки GS или HA с диаметром пор 0,22 или 0,45 мкм.

Хроматографическое разделение экстрактов проводили в колонках с TOYO PEARL HW—55 длиной 100 см, диаметром 1,6 см (элюцию проводили 0,01 М фосфатным буфером, содержащим 0,2 М NaCl рН 7,4, скорость элюции 30 мл/час), а также в колонках с сефадексом G—100 размером 85×2 (элюирующий буфер—0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,2 М NaCl рН 7,4, скорость элюции 30 мл/ч).

Во всех образцах определяли количество паратиреоидного гормона и кальцитонина при помощи радиоиммунных наборов фирмы Buz Mallinckrodt (ФРГ) и Sogin (Франция). Подсчет активности проводили на фотометре TRACOR (Голландия). Результаты обрабатывали с помощью компьютера Apple—2 с использованием специализированных RIA-программ.

Для получения коммерческих препаратов ПТГ используют горячий HCl—способ, предложенный еще Коллипом в 1925 г. Однако в лабораторных условиях для предотвращения расщепления полипептидной цепи горячим HCl используется множество других, более мягких реагентов. Наиболее удачным для этой цели являются фенол⁽⁸⁾ и мочевино—цистеино—уксусная кислота⁽⁹⁾. Дальнейшее осаждение, высаливание, обработка ТХУ дает грубый экстракт с конечным выходом продукта 5—10%⁽¹⁰⁾.

Нашей задачей являлось изучение несвязанных с паратиреоидподобной активностью белков, поэтому мы применяли более щадящие методы получения и очистки гомогената, чем это описано в литературе. Вследствие этого профиль элюции, полученный нами после гель-фильтрации на сефадексе G—100 fine (колонка размером 85×2, элюирующий буфер—0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,2 М NaCl рН 7,4, скорость элюции 30 мл/час) (рис. 1) несколько отличается от описанного в литературе⁽¹¹⁾. На рис. 2 показан профиль элюции ТХУ-порошка экстракта ПЩЖ, полученный Аурбахом и Поттсом на сефадексе G—100 fine (колонка размером 73×5 см, элюирующий буфер—0,2 М аммоний-ацетатный буфер рН 4,7, скорость элюции 55 мл/ч). Как видно из рис. 2, авторы получили три белковых пика, паратиреоидный гормон выходит во втором пике. Нами получено семь белковых пиков. Наибольшее количество паратиреоидного гормона—46,5% от общего содержания гормона—содержалось в первых двух пиках (фракции 11—15). Четвертый пик (фракции 27—31) содержал в два раза меньше гормона—25,5% от общего содержания гормона, а третий пик (фракции 19—21)—7,8% от общего ПТГ. В шестом пике (фракции 57—58) содержание гормона было незначительным—0,56 нг/мл.

Кальцитонин содержался во всех фракциях. Наибольшее его ко-

личество выходило в пятом пике, а наименьшее—в третьем. Однако количество кальцитонина было на 2 порядка меньше, чем ПТГ.

Применение геля TOYO PEARL HW—55 fine фирмы TOYO SODA (Япония), обладающего той же пропускной способностью, что и сефадекс G—100, дало нам возможность получить не только лучшее раз-

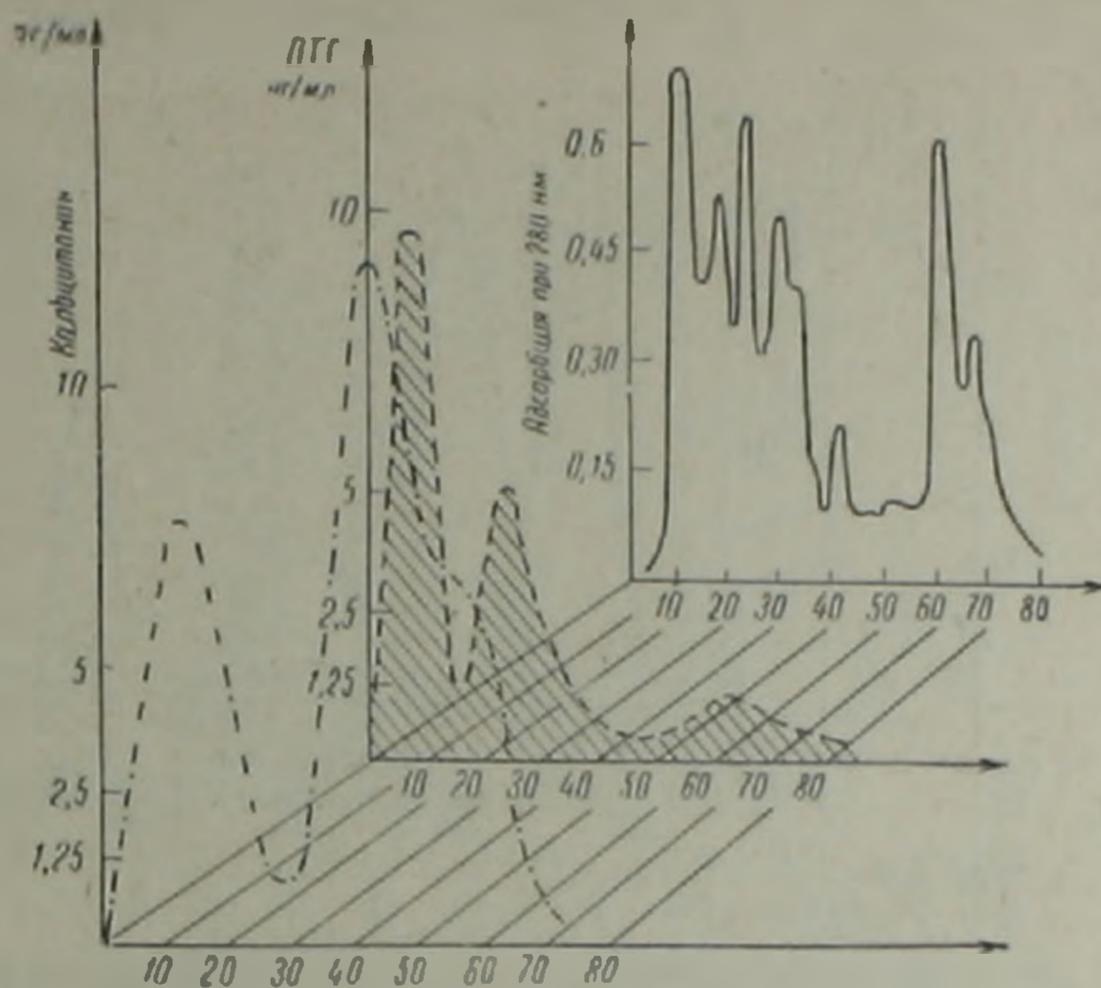


Рис. 1. Профиль элюции экстракта ПЩЖ на сефадексе G—100 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,45, скорость элюции 30 мл/ч, размер колонки 85×2. - - — количество ПТГ. — — — количество кальцитонина

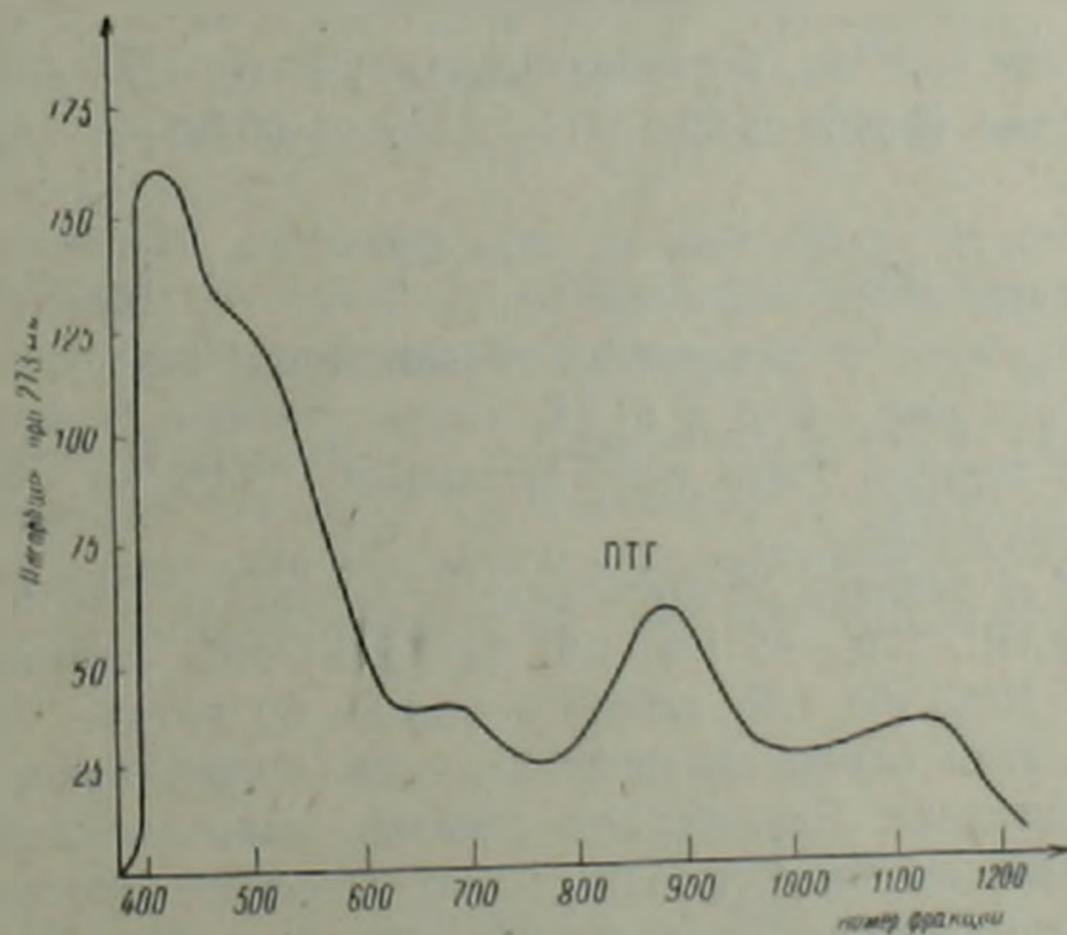


Рис. 2. Сефадекс G100, колонка 5×73 см. 0,2 М аммоний ацетатный буфер, pH 4, 7, скорость элюции 55 мл/ч (11)

решение во фракционировании экстракта ПЩЖ, но и фракции экстракта, свободные от присутствия вышеупомянутых гормонов. На рис. 3 показан профиль элюции экстракта ПЩЖ на колонке с TOYO PEARL HW—55. Из рисунка видно, что фракционирование дает четы-

ре четко отделенных друг от друга пика. Определение кальцитонина проводили при помощи наборов фирмы Byg—Mallinckrodt, а ПТГ— наборов фирмы Sogin, что дает слабый перекрест с бычьей сывороткой, поэтому общее количество ПТГ по сравнению с предыдущим исследованием было ниже. В первом пике (фракции 15—20) содержалось около 12% всего ПТГ, третий и четвертый пики были свободны

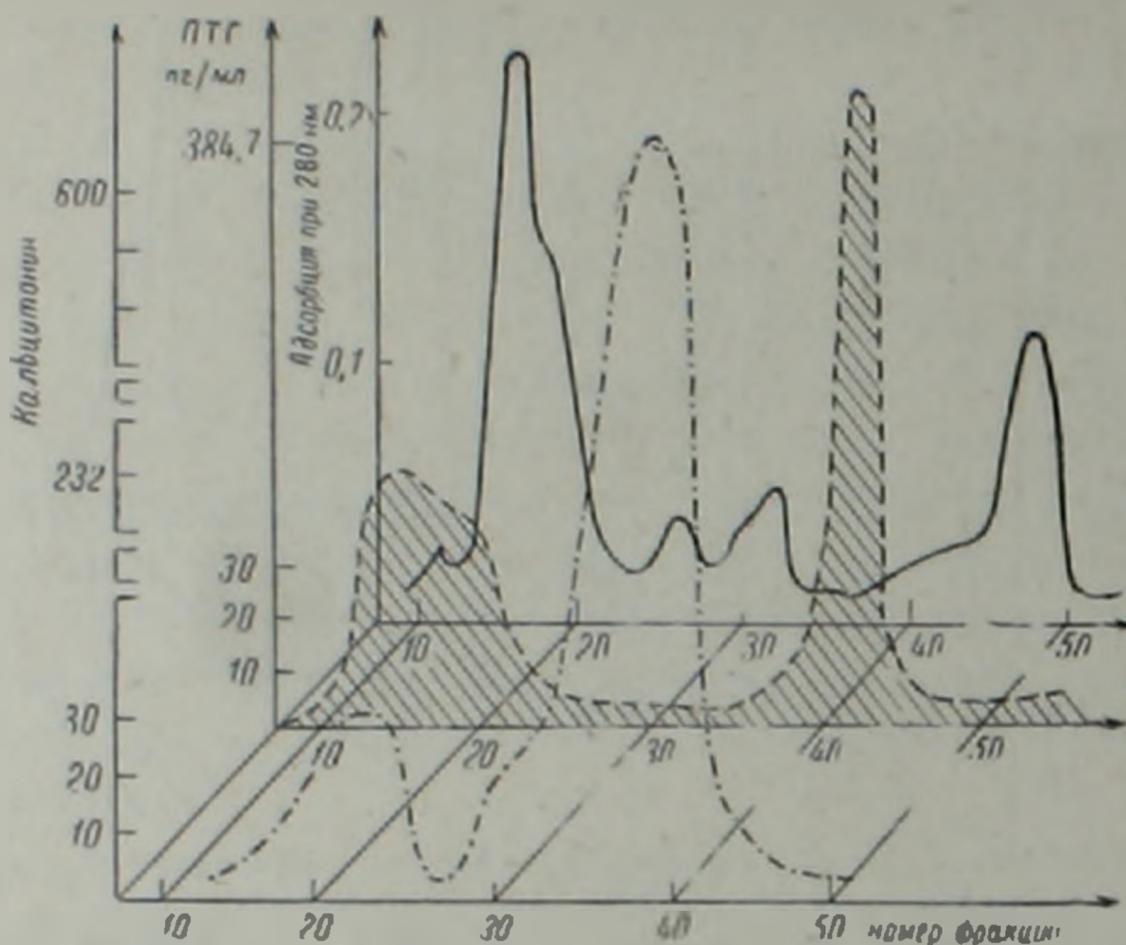


Рис. 3. Профиль элюции экстракта ПЩЖ на TOYO PEARL HW—55 fine 0,01 M фосфатным буфером, рН 7,4, скорость элюции 30 мл/ч, размер колонки 100×1,6. - - - —количество ПТГ, — — — —количество кальцитонина

от присутствия гормона, а наибольшее количество ПТГ содержалось в четвертом пике (фракции 40—44)—86,5% от общего содержания гормона.

Кальцитонин содержался во всех фракциях. Наименьшее его количество содержалось в первой фракции—5% от общего количества гормона. Наибольшее количество кальцитонина содержалось во втором и третьем пике—25,8 и 67,4% соответственно. В четвертом пике содержание гормона было незначительным—0,74% от общего содержания кальцитонина.

На рис. 4 показан профиль элюции экстракта ПЩЖ на колонке с TOYO PEARL HW—55 fine 0,01 M TRIS—HCl буфером, содержащим 0,2 M NaCl рН 7,45, скорость элюции 60 мл/час. Как видно из рисунка, в этом случае мы получили пять четких пиков, достаточно узких у основания. Паратгормон и кальцитонин определяли при помощи наборов фирмы Byg—Mallinckrodt. Основное количество ПТГ и кальцитонина выходило в первых двух пиках, и последние фракции были свободны от присутствия обоих гормонов, хотя кальцитонин присутствовал в следовых количествах и тут. Однако, к сожалению, в дальнейшем мы не применяли этот способ гель-фильтрации, вследствие токсичности TRIS—HCl буфера для живых клеток.

Присутствие паратиреоидного гормона и кальцитонина в небольших количествах почти во всех пиках можно объяснить высокой аг-

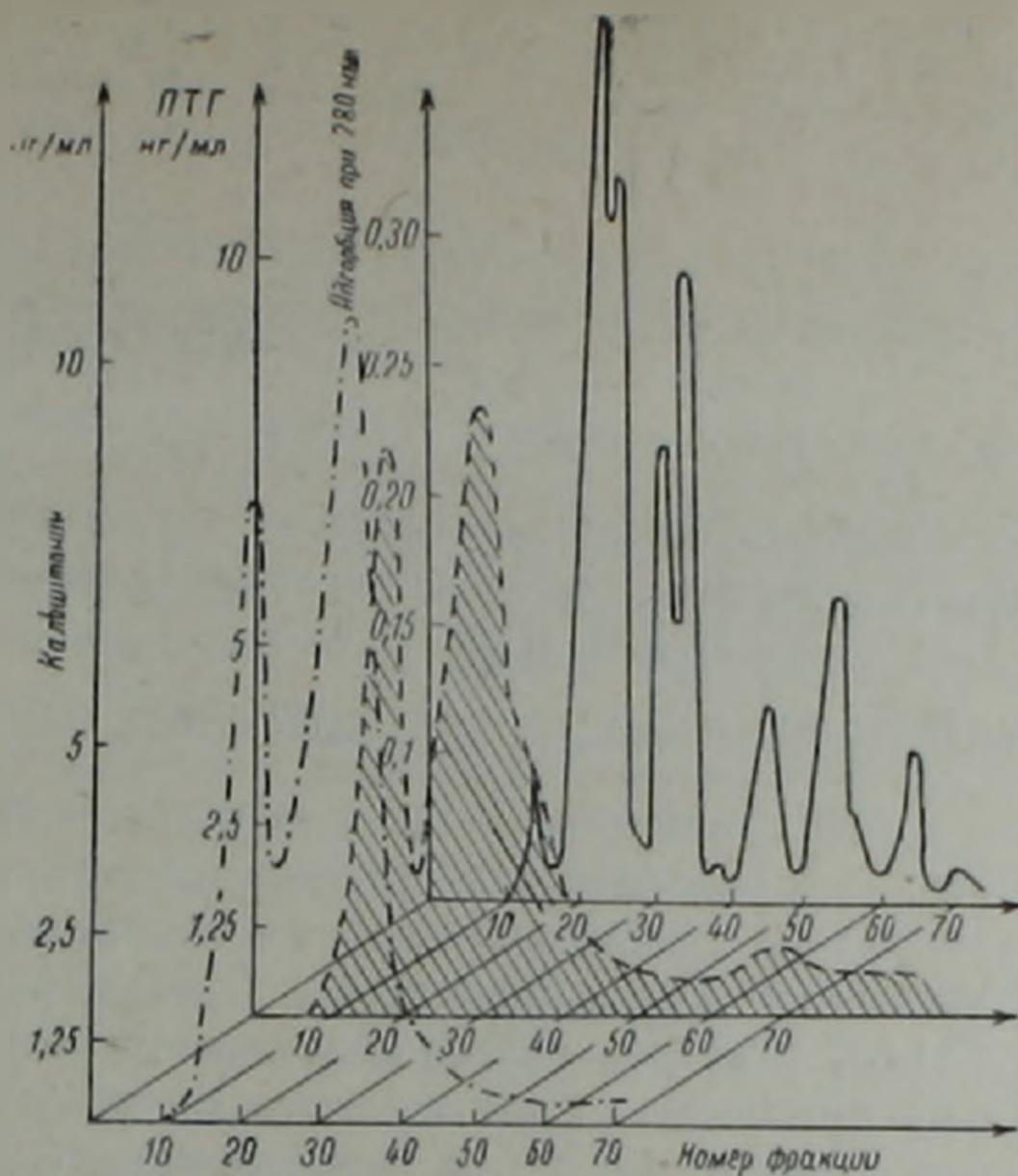


Рис. 4. Профиль элюции экстракта ПЩЖ на TOYO PEARL HW-55 fine 0,01 м TRIS-HCl буфером, pH 7,45, скорость элюции 60 мл/ч, размер колонки 100×1,6. . . . — количество ПТГ — — — — количество кальцитонина

регационной способностью этих гормонов, а также наличием в экстракте фрагментов ПТГ, имеющих антигенную детерминанту 64—84 (2), которая определяется используемыми наборами.

Центральная научно-исследовательская лаборатория Ереванского медицинского института

Ռ. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Խ. Ս. ՍԱՀԱԴՅԱՆ, Ա. Ա. ԶԱՐԶՈՂՆՅԱՆ

Հարվահանաձև գեղձերի մզվածքների բուժատոգրաֆիկ բաժանումը

Աշխատանքում ներկայացված է հարվահանաձև գեղձերի մզվածքի բաժանման նոր եղանակի մշակումը: Այդ նպատակով օգտագործվել են TOYO PEARL ժելերը, որոնք ունեն բաժանման բարձր ունակություն: Ստացվել են իմունոմոդուլյատոր հատկություններով մի շարք սպիտակուցային ֆրակցիաներ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ B. Kemper, J. H. Habener, A. Rich e. a., Science, v. 184, № 4133, p. 59—61 (1974).
- ² E. M. Brown, Miner. Electrol. Metabol., v. 8, № 3—4, p. 130—150 (1982).
- ³ J. R. Moran, W. Born, C. R. Tuschmidt e. a., Endocrinology, v. 108, № 6, p. 2264—2268 (1981).
- ⁴ J. J. Morrissey, D. V. Cohn, Endocrinology, v. 103, № 6, p. 2081—2090 (1978).
- ⁵ W. F. Neuman, M. N. Neuman, P. S. Sammon e. a., Calc. Tiss. Res. v. 18, p. 251—261 (1975).
- ⁶ R. A. Nisseuson, Miner. Electrol. Metabol., v. 8, № 3—4, p. 151—158 (1982).
- ⁷ W. Zidek, H. Ch. Karo, E. Llenden e. a., Acta Endocrinol, v. 103 suppl., № 256, p. 132 (1983).
- ⁸ G. D. Aurbach, J. of Biol. Chem., v. 234, p. 3179—3181 (1959).
- ⁹ H. Rasmussen, Y. L. Sze, R. Yong, J. of Biol. Chem., v. 239, p. 2852—2857 (1964).
- ¹⁰ H. T. Keutmann, Clinics in Endocrinology and Metabolism, v. 3, № 2, p. 173—197 (1974).
- ¹¹ G. G. Aurbach, J. T. Poots Jr., J. Endocrinol., v. 75, № 2, p. 290—292 (1964).