

УДК 612.822.1

БИОХИМИЯ

Академик АН Армянской ССР А. А. Галоян, И. Л. Улановский, С. Г. Чанлян,
М. Д. Чифликян, Г. Г. Григорян, А. О. Оганесян, М. А. Бабалян,

Действие кардиотропного гипоталамического фактора V на биосинтез катехоламинов

(Представлено 18/VII 1989)

Открытие в 60-х годах ⁽¹⁾ кардиоактивных нейрогормонов гипоталамуса—регуляторов сердечного кровообращения ⁽¹⁾, а в последующем их множественные формы ⁽²⁾, показали, что эндокринный гипоталамус регулирует сердечную активность. Вместе с тем предсердие, как было впервые установлено одним из нас ⁽³⁾ является эндокринным органом, продуцирующим пептидные факторы освобождения гипоталамических кардиотропных гормонов из нейросекреторных ядер в общую циркуляцию ⁽⁴⁾. Таким образом в функциональной системе нейросекреторный гипоталамус—эндокринное сердце вырабатываются ряд гормонов, уникальных регуляторов обмена Са и биосинтеза нейротрансмиттеров ⁽⁵⁾. Установлен был пептидный (гликопептиды) характер кардиоактивных нейрогормонов. Однако множественные формы нейрогормона «С» по своим физико-химическим свойствам отличаются от других коронарорасширяющих соединений К и Г ⁽²⁾. Более того, все они являются конкурентными ингибиторами фосфодиэстеразы цАМФ и цГМФ мозга и сердца и цАМФ-зависимой протенин киназы. Они ингибируют также активность киназы легкой цепи миозина (Галоян и сотр., 1989) (неопубликованные работы). Вместе с тем все виды гидролиза (6N HCl, трипсин, химстрипсин) не снимают биологическую активность нейрогормона С. Эти данные давали полное основание утверждать, что указанные факторы не являются пептидами, хотя аминокислотным анализатором удалось обнаружить аминокислоты ⁽²⁾. Поэтому еще в 1978 г. А. А. Галоян написал: «Нейрогормон «С», изолированный из гипоталамуса быка, является кардиоактивным (коронарорасширяющим) веществом. НС является полициклическим соединением непептидной природы ⁽⁷⁾. Об этом свидетельствовали также масс-спектральные данные. Мы попытались определить наличие в молекуле нейрогормона «С» полианионов, способных реагировать с электрофильными группами ФДЭ или эффекторов, влияющих на его активность. Специальные опыты с помощью колонок с окисью алюминия ясно показали, что НС, подобно цАМФ, аденину, гуанину, элюируется с помощью 50 mM Трис-HCl буфером, pH 7,6 с одинаковым профилем. Таким образом, НС, подобно другим веществам, не содержащим полианионов, элюируется с колонок, в отличие от АТФ, ГТФ и 5'-АМФ, которые сорбируются и не обнаруживаются в элюате ⁽⁸⁾.

Можно было полагать, что, если активное начало находится с гли-

копептидами или только с олигосахаридом в комплексе, то последние не играют существенной роли в биологической активности. Необходимо было с новыми высокоразрешающими методами очистки, спектральных анализов подойти к изучению этого нового типа кардиоактивных веществ гипоталамуса. Ранее нами было показано стимулирующее действие нейрогормона «С», С-модулинов на синтез дофамина и норадреналина в срезах гипоталамуса и полсчатого тела крыс (⁹). Задача настоящего исследования—тонкими методами очистить и получить кардиоактивные вещества и изучить их химическую структуру и действие на биосинтез катеполаминов.

Методы исследования. Низкомолекулярные соединения гипоталамуса, содержащие множественные формы кардиоактивных соединений получили по методу А. А. Галояна (1968) (¹⁰), разделение фракций осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазовом режиме. Высокочувствительным методом Бредфорда (¹¹) можно было определить химическую природу. Кардиотропную активность изолированных фракций на ВЭЖХ выявили измерением количества крови, оттекающей из коронарных синусов за единицу времени в условиях *in situ* по описанной методике (²).

О синтезе дофамина и норадреналина в срезах гипоталамуса и полсчатого тела судили по их образованию из радиоактивного тирозина после последующей очистки на колонке с Дауэксом по методике, ранее описанной (¹²).

Скорость тирозингидроксилазной (ТГ) реакции определяли прямым спектрофотометрическим методом (¹³), основанным на приросте поглощения при 335 нм при окислении птеринового кофактора. Растворимую и мембраносвязанную ТГ-азу выделяли по методу Кученского и Манделла (¹⁴). Белок определяли по методу Лоури. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Н-ЯМР спектр получен на спектрометре WM—500 фирмы Брукер, с рабочей частотой 500 МГц в импульсном режиме с Фурье преобразованием на ЭВМ Aspect—3000. Раствор для ЯМР экспериментов готовили растворяя лиофилизированные порошки в растворителе DMSO-D₆ (99.95%). В качестве внутреннего стандарта использован TMS. Проводили также масс-спектральный анализ соединений методом электронного удара при 70° ЭВ на спектрометре фирмы Кратос.

С помощью ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила на колонке C₁₈ удалось разделить лиофилизированный порошок низкомолекулярных соединений гипоталамуса на ряд фракций и получить некоторые кардиоактивные соединения в индивидуальном виде. В настоящей статье приводятся данные о некоторых физико-химических и биологических свойствах одной из форм кардиотропного нейрогормона.

На рис. 1 представлен протонный спектр вещества V. Из рисунка видно, что спектр богат сигналами от алифатических групп CH₃, CH₂, CH, которые расположены в районе от 0,8 до 4,5 м. д. Кроме того, зарегистрированы в низкочастотной области спектра (от 6,5 до 9,0 м. д.)

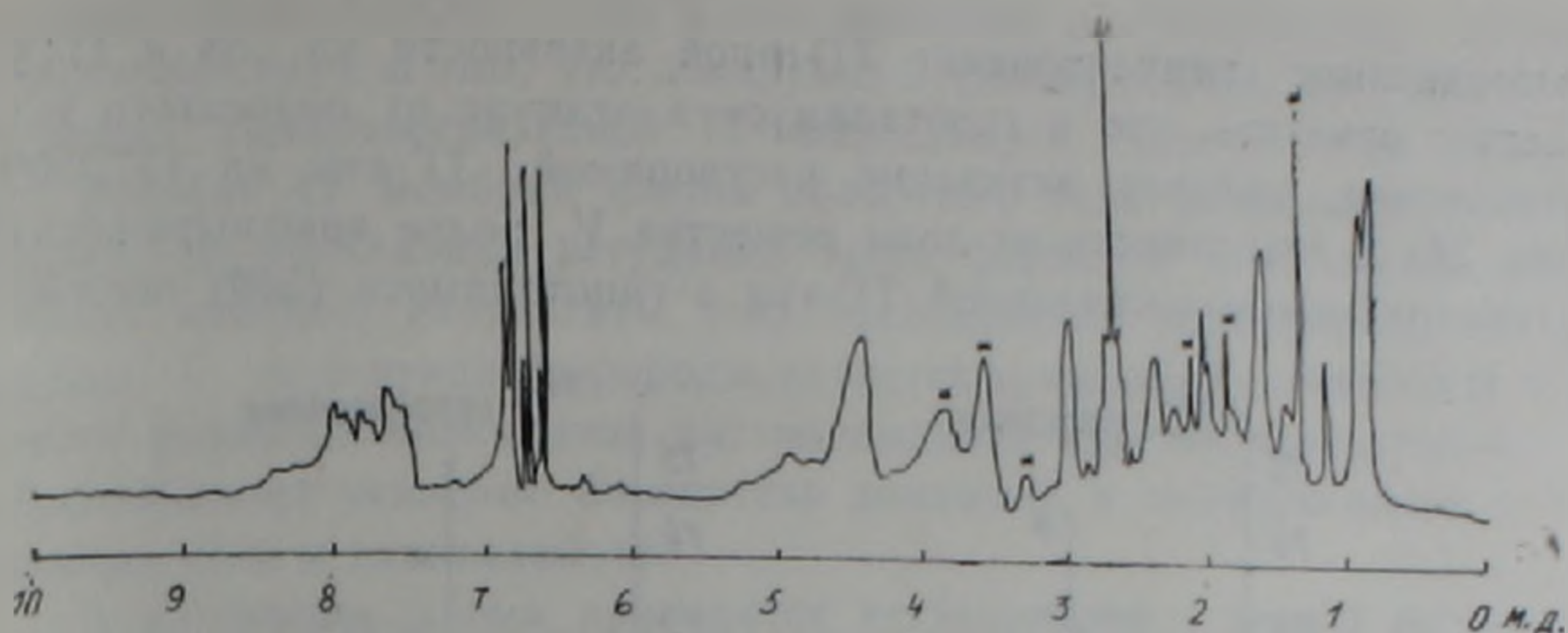


Рис. 1. Спектр ЯМР-Н вещества V при 30° С в ДМСО. *—сигнал растворителя

сигналы от СН протонов ароматических колец и протонов. Обращает на себя внимание тот факт, что большинство сигналов значительно уширены или отсутствует тонкая структура у этих сигналов. Повышение температуры образца до 100°С с целью повышения разрешения не привело к ощутимым результатам. Такое поведение сигналов обычно обусловлено наличием жестко фиксированной структуры вещества, где сегментальная подвижность ограничена и (или) наличием парамагнитных примесей, способных уширять сигналы. Последние известны как уширяющие реагенты в ЯМР спектроскопии. В связи с этим был получен ЭПР спектр, где обнаружилось выраженный сигнал парамагнитного металла (подробное описание структуры образца методом ЭПР, ЯМР и масс-спектрального анализа мы приведем в следующем сообщении).

Полученные данные показывают, что кардиоактивное вещество относится к конденсированным шестичленным азотсодержащим циклам, в состав которого входит также циклогексан тетра-ОН. Данная шестичленная гетероциклическая система, по-видимому, способна к полимеризации. По хроматографическим и библиогическим свойствам это вещество относится к ряду нейрогомона «С».

Было установлено, что в срезах стриатума синтез ^{14}C -дофамина при добавлении вещества V в зависимости от его концентрации статистически достоверно увеличивается на 24 и 22%. Синтез ^{14}C -норадреналина увеличивается на 87% в присутствии $8,4 \times 10^{-3}$ оптических единиц/мл (О. Е./мл) вещества V. В срезах гипоталамуса установлено ярко выраженное усиление синтеза как дофамина, так и норадреналина (рис. 2). В присутствии $3,36 \times 10^{-3}$ О. Е./мл вещества V синтез ^{14}C -дофамина увеличивается на 267%, а ^{14}C -норадреналина на 220%. Добавление вещества V в концентрациях $8,4 \times 10^{-3}$ О. Е./мл приводило к возрастанию синтеза ^{14}C -дофамина на 100%, а ^{14}C -норадреналина на 150%.

В гомогенате стриатума полосатого тела ТГ-азная активность увеличивалась в зависимости от увеличения концентрации вещества V до 150%. Активность растворимой ТГ-азы увеличивалась при добавлении вещества V ($3,36 \times 10^{-3}$ О. Е./мл) на 71%. Однако изменений в активности мембраносвязанной ТГазы в присутствии вещества V не происходило. Как видно из рис. 3 в гомогенате гипоталамуса наблюдается

дозозависимое стимулирование ТГ-азной активности на 58 и 114%. Следует отметить, что в гипоталамусе в отличие от полосатого тела установлена сильная активация растворимой ТГ-азы на 137,330% (рис. 3б) в зависимости от дозы вещества V. Более ярко выраженная активация мембраносвязанной ТГ-азы в гипоталамусе (540) показано

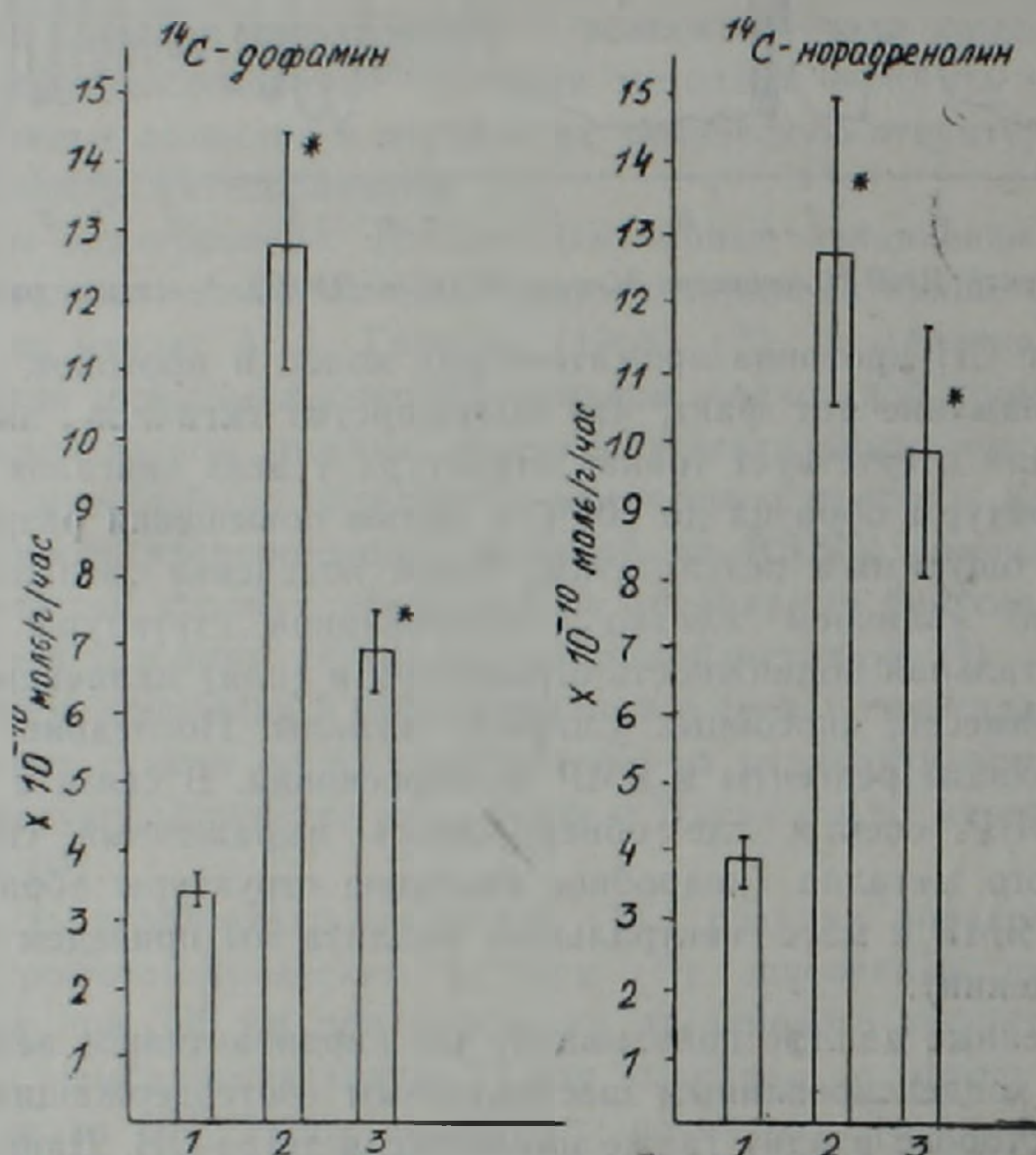


Рис. 2. Действие вещества V на синтез ^{14}C -дофамина и ^{14}C -норадреналина на ^{14}C -тирозина в срезах гипоталамуса мозга крыс. 1—контроль; 2—добавление вещества V в концентрации $3,36 \times 10^{-3}$ о. е./мл; 3— $8,40 \times 10^{-3}$ о. е./мл. Средние данные 4 опытов. *— $p < 0,001$

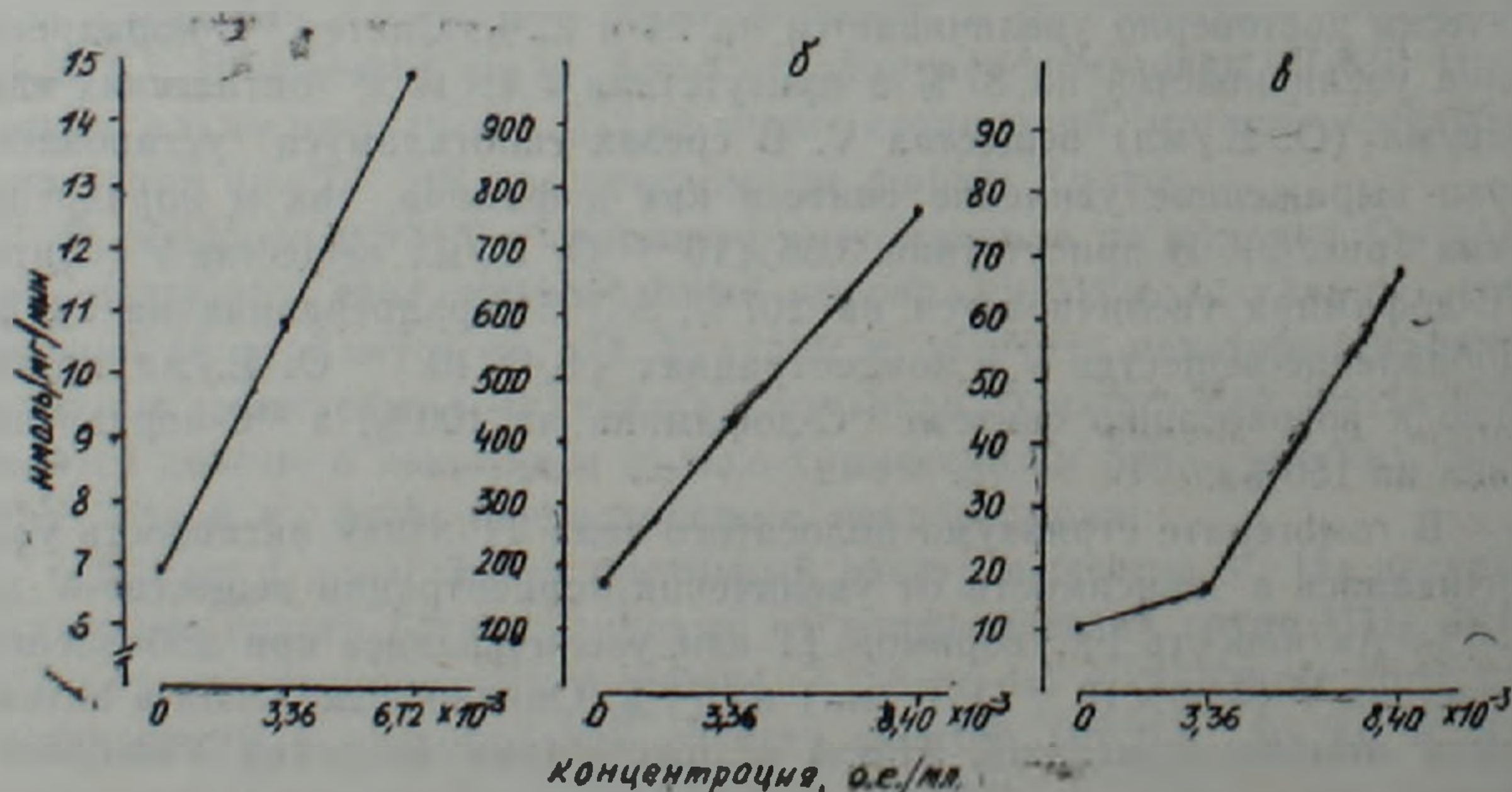


Рис. 3. Действие вещества V на тирозингидроксилазную активность в гомогенате (а), растворимую ТГ-азу (б), мембраносвязанную ТГ-азу (в) из гипоталамуса мозга крыс. Обозначения те же, что и на рис. 2

в присутствии $8,4 \times 10^{-5}$ О. Е./мл вещества. γ Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаружены специфические факторы в отношении мембраносвязанной ТГ-гипоталамуса. Вместе с тем отсутствие реакции ТГ мембран клеток полосатого тела показывает наличие различных механизмов регуляции этого фермента локализованных в разных клетках. Результаты этих исследований показывают, что вещество V не пептидной природы, является природным активатором ключевого фермента биосинтеза катехоламинов—тирозингидроксилазы, что обуславливает усиление биосинтеза допамина и норадреналина в полосатом теле и гипоталамусе.

В настоящее время проводятся исследования с целью выяснения идентичности этой группы веществ с изоформами нейрогормона «С».

Институт биохимии

Академии наук Армянской ССР

Հայկական ԽՍՀ ԳԱ ակադեմիկոս Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Ի. Լ. ՈՒԼԱՆՈՎՍԿԻ, Մ. Դ. ԶԻՋԼԻՅԱՆ,
Դ. Դ. ԴՐՈՒՊՈՐՅԱՆ, Ա. Հ. ՀՈՎԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Ա. ԲԱՐԱՅԱՆ, Ս. Դ. ՉԱՐԼՅԱՆ

Կարդիոտրոպ հիպոթալամիկ V նյութի ազդեցությունը կատեխոլամինների կենսասինթեզի վրա

Բարձր էֆեկտիվության հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով հիպոթալամուսի ցածր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող նյութերի խառնուրդից անջատվել են կարդիոտրոպ նյութեր, որոնցից մեկը, V կոչվող նյութը հետազոտվել է միջուկա-մազնիսային ռեզոնանսի, ինչպես նաև էլեկտրոն-պարամազնիսային ռեզոնանսի եղանակով: Ցույց է տրվել, որ V նյութը խթանում է դոպամինի և նորադրենալինի սինթեզը, հատկապես հիպոթալամուսում:

Զգալիորեն (540%) բարձրացնում է թիրոսին հիդրոքսիլազայի ակտիվությունը: Պարզվել է, որ նշված V նյութը ազդու պարունակող, պեպտիդային բնույթի վեցանդամանի պոլիցիկլիկ միացություն է:

ЛИТЕРАТУРА—ԻՐԱՇԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ А. А. Галоян, ДАН АрмССР, т. 34, № 3, с. 109 (1962). А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, Р. О. Карапетян и др., Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—365 (1986).
- ² А. А. Галоян, М. А. Ростомян, Биол. журн. Арменин, т. 20, № 9, с. 3—7 (1967).
- ³ С. А. Мисирян, Биол. журн. Арменин, т. 5, № 8, с. 706—709 (1983).
- ⁴ А. А. Galoyan, B. J. Gurvitz, G. A. Saribekian et al. Adv. Biosci. (ed. Chehovic, G. Robinson). Pergamon Press, v. 24, p. 165—181 (1979).
- ⁵ А. А. Galoyan, Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9 (1978).
- ⁶ А. А. Галоян, Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9 (1987).
- ⁷ А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, Ф. А. Медведев, ДАН АрмССР, т. 66, № 5, с. 302—306 (1978).
- ⁸ А. А. Галоян, М. Д. Чифликян, М. Ш. Мурадян и др., Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—48, (1986).
- ⁹ М. Д. Chiflikian, А. А. Galoyan, G. E. Abrahamian, et al. Neurochem., v. 52, Suppl., p. 575 (1989).
- ¹⁰ М. М. Bradford, anal. Biochem., v. 72, p. 248 (1976).
- ¹¹ М. Ф. Минсва, Вопросы мед. химии, т. 22, № 2, с. 274—279 (1976).
- ¹² R. T. Kuczensky, A. J. Mandell, J. Biol. Chem., v. 247, p. 9114 (1972).