

УДК 577.17.05

Академик АН Армении А. А. Галоян, А. Р. Алексанян, М. В. Островская,  
С. Г. Чаплян, И. Л. Улановский

К молекулярным механизмам действия новых кардиоактивных  
соединений пептидной природы на гладкую мышцу

(Представлено 5/III 1991)

Ранее нами была выделена и охарактеризована большая группа коронарорасширяющих и коронаросуживающих полипептидов гипоталамуса<sup>(1)</sup>, была установлена гормональная роль некоторых из них<sup>(2)</sup>. Характерной особенностью механизма действия этих соединений является изменение содержания вторичных посредников—ионов кальция<sup>(3)</sup> и циклических нуклеотидов<sup>(4)</sup>. Коронаросуживающие полипептиды оказывают влияние на  $Ca^{2+}$ -кальмодулин активируемые ферменты без участия ионов кальция, но с участием кальмодулина<sup>(5)</sup> или без участия ионов кальция и кальмодулина<sup>(6)</sup>, т. е. последние действуют прямо на фермент (ФДЭ, КЛЦМ и т. д.). Нами выделена группа новых кардиоактивных соединений из гипоталамуса в индивидуальном виде, которые оказывали влияние на агрегацию тромбоцитов, коронарное кровообращение и на изолированный лоскут аорты<sup>(7)</sup>.

В настоящем исследовании мы задались целью изучить влияние одного из коронарорасширяющих соединений, названного нами фракцией 44, на активность двух  $Ca^{2+}$ -кальмодулин активируемых ферментов—ФДЭ и киназы легких цепей миозина.

ФДЭ выделяли из гипоталамуса быка по методу<sup>(8)</sup>, с дальнейшей очисткой с использованием аффинной хроматографии на фенил—сефарозе. Ткань гипоталамуса гомогенизировали в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,0 (1:2,5), содержащем 0,1 мМ  $NaN_3$ ; 1 мМ ДТТ; 1 мМ  $MgCl_2$ ; 5 мМ  $PMSF$ . Гомогенат центрифугировали при 22000xg в течение 1 ч (Beckman J—21 ротор—14). Супернатант подвергали ионообменной хроматографии на колонке (4x6 см) с DEAEtSK. Элюцию фермента осуществляли с помощью 150 мМ NaCl в 25 мМ трис-НСl буфере, рН 7,0, содержащем 1 мМ  $MgCl_2$ ; 1 мМ  $NaN_3$ ; 1 мМ ДТТ. Элюат подвергали далее аффинной хроматографии на колонке с фенилсефарозой (4x6 см), предварительно уравновешенной буфером, со-

держащим 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Элюцию осуществляли буфером, содержащим  $5 \times 10^{-5}$  М ЭГТА и 0,15 М  $\text{NaCl}$ , а затем тем же буфером с использованием непрерывного обратного градиента  $\text{NaCl}$  (15—0,00). Выделенный фермент подвергали гель-фильтрации на колонке (1,5—100 см) с сефакрилом S—200 со скоростью 10 мл/ч, с применением 25 мМ трис- $\text{HCl}$  буфера, pH 7,0, содержащего 0,1 мМ  $\text{NaCl}$ ,  $10^{-4}$  М ЭГТА. Все операции проводили при 4°C. Выход белка контролировали по изменению УФ поглощения при длине волны 280 нм с использованием Увикорда фирмы LKB (Швеция).

Кальмодулин выделяли по методу Гопалакришна, Андерсона (9) с некоторыми модификациями (10).

Активность ФДЭ определяли по методу Томсона, Апелемана (11). Инкубационная среда 100 мкл содержала 50 мМ трис- $\text{HCl}$  буфер, pH 7,0, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; цАМФ,  $^3\text{H}$  цАМФ (0,1 мкКи), кальмодулин 200 нм,  $\text{CaCl}_2$   $1 \times 10^{-4}$  М, или ЭГТА  $1 \times 10^{-5}$  М и определенное количество высокоочищенного фермента. Вещество 44 в пробе составляло  $1 \times 10^{-3}$  оп. ед. Пробы инкубировали при 30°C в течение 10 мин. Для определения активности ФДЭ реакцию проводили в два этапа. После остановки реакции, катализируемой ФДЭ, пробы инкубировали в кипящей водяной бане в течение 10 мин при 30°C в присутствии змеиного яда 5—НК (0,3 мг/мл). Продукты гидролиза разделяли с ионообменной смолы «Амберлит». По окончании ферментативной реакции к пробам добавляли 500 мкл смолы, суспендированной в воде (1:2). После центрифугирования (8000 об/мин, 5 мин) на Biofuge A фирмы Heraeus Christ (ФРГ) производили счет радиоактивности супернатанта, содержащего меченый аденозин, не сорбирующийся на смоле, в отличие от соответствующих нуклеотидов. Количество ФДЭ и время инкубации их с субстратом подбирали таким образом, чтобы гидролизуемый под действием фермента субстрат не превышал 15—20% от исходного. Конечная концентрация субстрата в инкубационных смесях составляла 3 мкМ. Результаты рассчитывали по количеству гидролизованного субстрата с учетом остаточной радиоактивности проб в отсутствие фермента и уровня неспецифической сорбции аденозина на ионообменнике при полном гидролизе субстрата при избытке фермента.

Миозин получали из скелетных мышц кролика по методу Б. Ф. Поглазова (12).

Грубый экстракт киназы легких цепей миозина получали из мышц кролика по методу Моргана и др. (13). Очищенный препарат фермента получали по методу Язава и др. (14). Включение фосфата в  $\text{LC}_2$  в миозине регистрировали по увеличению электрофоретической подвижности  $\text{LC}_2$  при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины (15). Относительное содержание фосфорилированных  $\text{LC}_2$  в миозине определяли при анализе денситограмм гелей электрофореза, окрашенных кумаси R—250.

Было установлено, что вещество 44 в концентрации  $1 \times 10^{-3}$  и  $5 \times 10^{-5}$  оп. ед. ингибирует  $\text{Ca}^{2+}$ —КМ-зависимую фосфодиэстеразу на

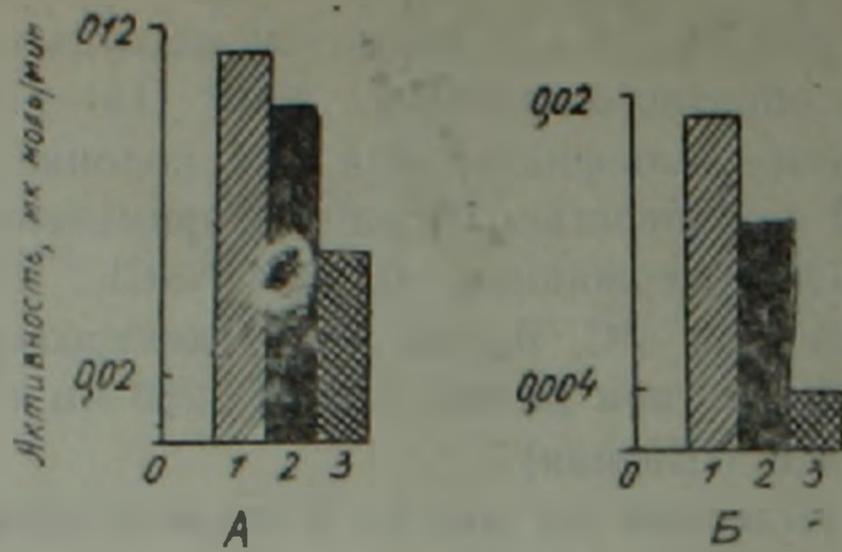


Рис. 1. Влияние вещества 44 на  $\text{Ca}^{2+}$  – КМ зависимую фосфодиэстеразу мозга. В контроле (А, 1) инкубационная среда (100 мкл) содержала 50 мМ трис-НСI буфер, рН 7.0, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , сАМР ЭН сАМР (0.1 мк КИ), кальмодулин 200 нМ  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-4}$  М. В опытных образцах (А, 2, 3) добавляли вещество  $44 \times 10^{-3}$  и  $5 \times 10^{-3}$  оп. ед. соответственно. В контроле (Б, 1) инкубационная среда вместо  $\text{CaCl}_2$ ,  $10^{-4}$  М содержала ЭГТА  $5 \times 10^{-5}$  М. В опытных образцах (Б, 2, 3) добавляли вещество  $44 \cdot 10^{-3}$  и  $5 \times 10^{-3}$  оп. ед. соответственно.

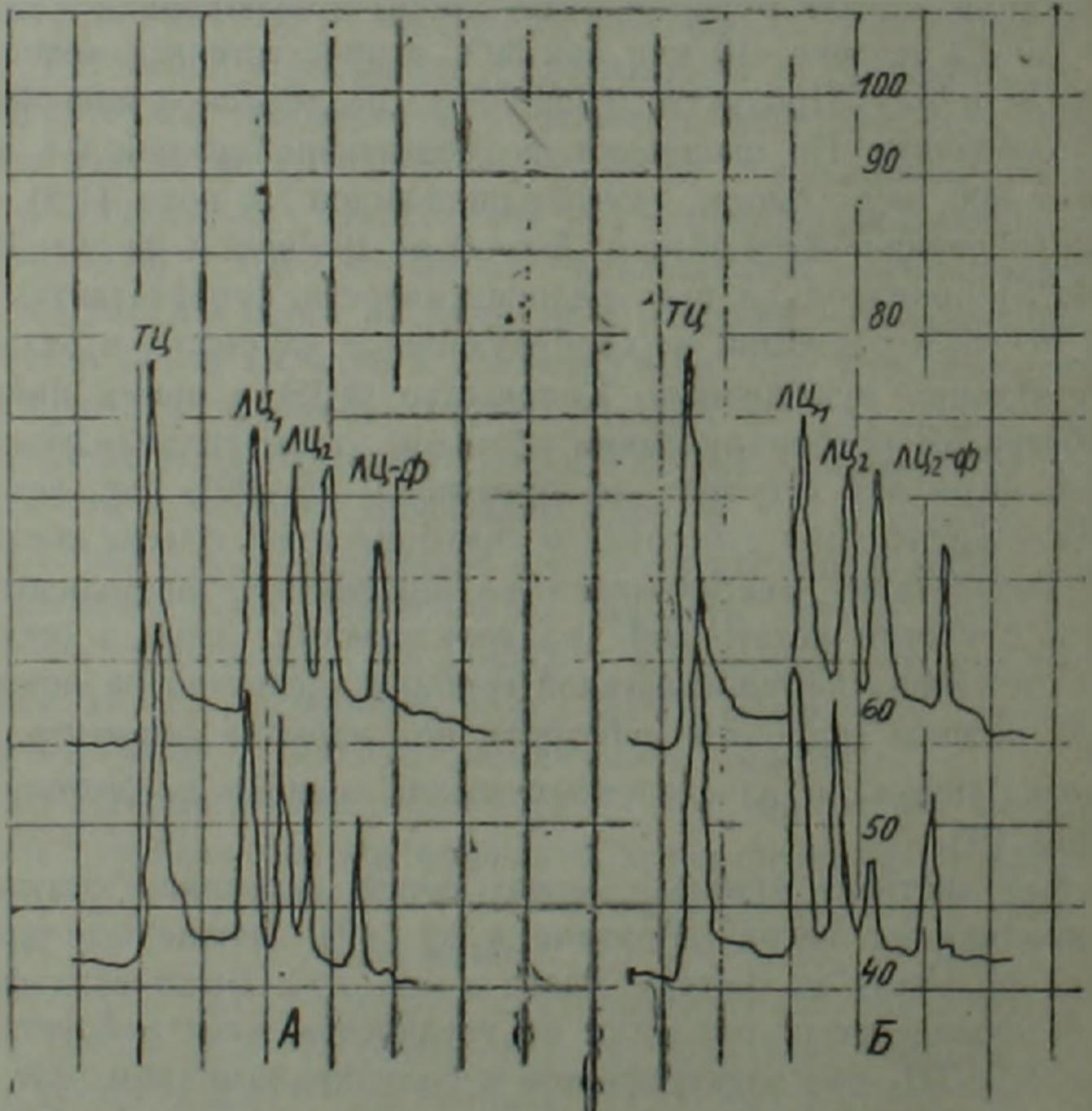


Рис. 2. Сканогаммы гелей электрофореза с 8 М мочевиной препаратов миозина с дефосфорилированными и фосфорилированными ЛЦ. Инкубационная среда содержала 20 мМ Na фосфатный буфер (рН 7.5), 12.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 мМ ДТТ, 5 мМ АТФ, 0.5 М КСI, миозин (10 мг/мл) и количество КЛЦМ, вызывающее фосфорилирование на 50%. В опытных образцах добавляли вещество 41 –  $1 \times 10^{-3}$  оп ед (А) и  $5 \times 10^{-3}$  оп ед (Б).

15 и 50% соответственно при наличии  $\text{CaCl}_2$  ( $1 \times 10^{-4}$  М) (рис. 1, А). Между тем, в пробе, где вместо  $1 \times 10^{-4}$  М  $\text{CaCl}_2$  добавляли  $5 \times 10^{-5}$  М ЭГТА, вещество 44 в тех же концентрациях ингибирует активность фермента на 30 и 83% соответственно (рис. 1, Б).

Фосфорилирование ЛЦ<sub>2</sub> проводили инкубацией очищенного миозина (10 мг/мл), содержащего полностью дефосфорилированные ЛЦ<sub>2</sub> с грубой фракцией КЛЦМ, в течение 30 мин при 37°C в среде, содержащей 20 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,5), 12,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 0,5 мМ ДТТ; 5 мМ АТФ; 0,5 М КСl. Препарат киназы добавляли из расчета 0,02—0,05 ед. оптической плотности раствора киназы на 1 мг миозина. В контрольных образцах использовали такое соотношение фермента и миозина, которое вызывает фосфорилирование на 50%. В опытных образцах добавляли вещество 44— $1 \times 10^{-3}$  и  $5 \times 10^{-3}$  оп. ед. Вещество 44 в этих концентрациях ингибирует фосфорилирование ЛЦ<sub>2</sub> на 30 и 70% соответственно (рис. 2, А, Б).

Известно, что фосфорилирование легких цепей миозина необходимо для взаимодействия актомиозиновых протофибрилл, а для этого необходим КЛЦМ (16). Добровская с сотр. (17) доказали, что кальмодулин  $\text{Ca}^{2+}$  связывающий компонент киназы легких цепей миозина гладкой мускулатуры катализирует  $\text{Ca}$ -зависимое фосфорилирование 20 000 дальтон легкой цепи миозина.

Изучаемое нами вещество 44, обладающее коронарорасширяющим действием, ингибирует  $\text{Ca}^{2+}$ —КМ-зависимую фосфодиэстеразу и фосфорилирование легких цепей миозина.

Институт биохимии  
Академии наук Армении

Հայաստանի ԳԱ ակադեմիկոս Ա. Ա. ԿԱՆՈՅԱՆ, Ա. Ռ. ԱՆԹՈՆՅԱՆ,  
Մ. Վ. ՕՍՏՐՈՎՍԿԱՅԱ, Ս. Գ. ԶԱՌՅԱՆ, Ի. Ը. ՈՒՂԱՆՈՎՍԿԻ

Ընդ կազմակերպող, պեպտիդային բնույթի միացությունների մոլեկուլյար մեխանիզմների ազդեցության բացահայտումը հարց մկանի վրա

Ուսումնասիրված է հիպոթալամուսից անջատված կորոնարոլայնացնող միացության (պայմանակաձևորեն անվանված միացություն 44) ազդեցությունը կալմոդուլին կախվածություն ունեցող ֆերմենտների վրա: Պարզարանված է, որ միացություն 44,  $1 \times 10^{-3}$  և  $5 \times 10^{-3}$  օպտիկ միավորներով արգելակում է  $\text{Ca}$ -կալմոդուլին կախվածություն ունեցող ֆոսֆոդիեստերազայի ակտիվությունը 15 և 50% համապատասխանաբար: Այդ նույն կոնցենտրացիաներով միացություն 44 արգելում է նաև միոզինի  $\beta$  և  $\gamma$  շղթաների ֆոսֆորիլացումը 30 և 70% համապատասխանաբար:

#### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. А. А. Галоян. Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы. Сб. докл. под ред. Паладина и Бунатяна, Ереван, 1962. 2. А. А. Галоян.

ДАН АрмССР, т. 31, № 3, с. 109 (1962). <sup>3</sup> A. A. Galoian, G. A. Kevoorkian, L. H. Voskanian *e. a.*, *Neurochem. Res.*, v. 13, № 5, p. 493–498 (1988). <sup>4</sup> А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, *Вест. АМН СССР*, № 9, с. 64–69, 1982. <sup>5</sup> N. Barkhudaryan, T. Zakaryan, A. Aleksanian *e. a.*, *Europ. society for neurochem. 8-th gen. meeting. Leipzig*, p. 141, 1990. <sup>6</sup> А. А. Галоян, И. Д. Бобрускин, Б. Я. Гурвиц и др., *Нейрохимия*, т. 8, № 1 (1989). <sup>7</sup> А. А. Galoian, M. Chiflikian, K. Galoian *e. a.*, *Europ. society for neurochem. 8-th. gen. meeting. Leipzig*, p. 102, 1990. <sup>8</sup> А. А. Galoian, B. Ya. Gurvitz, *Neurochem. res.*, v. 10, № 11, p. 1467–1481 (1985). <sup>9</sup> R. Coplakrishna, W. B. Anderson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 104, p. 830–836 (1982). <sup>10</sup> И. Д. Бобрускин, С. М. Шайхин, М. В. Муратова и др., *Биохимия*, т. 52, вып. 8, с. 1344–1352 (1987). <sup>11</sup> W. J. Thompson, M. M. Appleman, *Biochem.*, v. 10, p. 311–316 (1971). <sup>12</sup> Б. Ф. Поглазов, Д. И. Лезицкий, М. Н. Гришин, I Всесоюзн. биофизический съезд. Тез. докл. (Москва), т. 2, с. 27, 1982. <sup>13</sup> M. Morgan, S. V. Perry, S. Ottaway, *Biochem.*, v. 157, № 3, p. 687–697 (1976). <sup>14</sup> M. Yazawa, Koichi Yagi, *J. Biochem.*, v. 84, p. 1259–1265 (1978). <sup>15</sup> W. T. Perrie, S. W. Perry, *Biochem. J.*, v. 119, № 1, p. 30–38 (1980). <sup>16</sup> M. O. Akosy, S. D. Williams, E. M. Sharkey *e. a.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 69, p. 35–41 (1976). <sup>17</sup> R. Dabrowska, J. M. Sherry, D. K. Aromatriso *e. a.*, *J. Biochem.*, v. 17, p. 253–258 (1978).