



УДК 577.112

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАРДИОАКТИВНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ИЗ МЕДУЛЛЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТАСРАПИОНИЯН Р. М., ПАРОНИЯН Э. Х., АБРАМЯН С. С., ГРИГОРЯН А. А.,
КАРАПЕТЯН Р. О., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из медуллы надпочечников крупного рогатого скота выделены восемь кардиоактивных соединений. Для очистки и дифференциации этих соединений разработана схема, включающая последовательно ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-фильтрацию на сефадексе G-10, высоковольтный электрофорез на бумаге, ТСХ на пластинках «Силуфол UV-250», ВЭЖХ на обращенной фазе C_{18} . Установлено, что по фармакологическим характеристикам (продолжительность действия, динамика нарастания и максимум эффекта) полученные высокоочищенные препараты кардиоактивных соединений отличаются друг от друга. Выявленные различия связаны, по-видимому, со структурными особенностями, в частности с аминокислотным составом. При изучении действия указанных соединений на изменение активности ФДЭ сАМР получены данные, свидетельствующие об определенной корреляции с коронароактивностью. Так, сравнение эффектов двух из них, факторов II и IV_1 и кардиотропного нейрого르몬а гипоталамуса выявило сходный характер зависимости коронароактивности и степени ингибирования ФДЭ сАМР, что дает основание предполагать наличие в медулле надпочечников крупного рогатого скота соединений, структурно родственных гипоталамическим кардиактивным нейрого르몬ам.

В последнее десятилетие в связи с развитием новых методов и подходов к исследованию специфических белков ЦНС достигнуты значительные успехи в изучении белкового спектра медуллы надпочечников, отличающейся высоким содержанием белков, обладающих функциональной гетерогенностью. Наиболее изученным среди них является хромогранин А [1] с M_r 80 кД, состоящий из двух субъединиц, соединенных дисульфидной связью. Недавно обнаружены также два полипептида с M_r 10 и 50 кД, один из которых (с M_r 50 кД) является предшественником Met- и Leu-энкефалинов [2], а также пептид Y [3]. Из гликопротеинов в хромоаффинных гранулах обнаружены дофамин- β -гидроксилаза, представленная двумя формами—связанной и несвязанной [4], и несколько O-гликозилированных гликопептидов с M_r от 20 до 120 кД, предположительно участвующих (по крайней мере, некоторые из них) в прикреплении различных микрофиламентов к мембране везикул [5].

Даже этот краткий перечень свидетельствует о перспективности и необходимости развития исследований в области обнаружения новых биоактивных соединений в мозговом слое надпочечников. В этом смысле определенный интерес представляют ранее обнаруженные нами [6] в медулле надпочечников крупного рогатого скота кардиоактивные соединения. Интерес к ним, а также дальнейшие интенсивные исследования по их идентификации были обусловлены ранее установленным фактом—участием надпочечников в реализации коронарорасширяющего эффекта гипоталамических кардиотропных нейрогормонов «К» и «С».

Целью данной работы была разработка методов очистки, позволяющих получить кардиоактивные соединения непосредственно из мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота и частично их охарактеризовать.

Методы исследования

ИОХ проводили на ДЭАЭ-целлюлозе (ДЭАЭ-ц) и КМ-целлюлозе (КМ-ц), уравновешенных 0,005 М Na^+ -фосфатным буфером, pH 6.5. Размеры колонки— $3,5 \times 50$ см. Применяли градиентную элюцию со скоростью 50 мл/ч, причем значительный градиент концентрации соли (0,02—0,5 М NaCl) сочетался с небольшим понижением pH (6,5—5,0). Гель-фильтрацию осуществляли на колонке с сефадексом G-10, элюцию проводили бидистиллированной водой со скоростью 60 мл/ч. Спектры поглощения снимали в УФ-области (200—330 нм) на регистрирующем спектрофотометре Unicam SP-800 и СФ-26А.

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 проводили в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5), ТСХ—на пластинках «Силуфол UV-254», используя систему растворителей бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (42:24:4:30).

ВЭЖХ проводили в колонке с обратнообращенной фазой C_8 , используя 70%-ный раствор метанола в качестве элюента. Фракции собирали со скоростью 0,5 мл/мин. Хроматографию проводили под давлением 120 атм. Продолжительность анализа—30 мин, оптическую плотность в элюатах измеряли при 210 нм.

Высоковольтный электрофорез на бумаге осуществляли в камере типа ЭФА-1 при силе тока 70—80 мА на бумажную полосу размером $4,5 \times 60$ см и градиенте потенциала 35—40 в/см в системе пиридин-уксусная кислота-вода (10:0,4:90).

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [7].

Биологическое тестирование проводили на кошках, наркотизированных гексеналом, в условиях *in situ* и измеряли во времени объемную емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца [8] после внутривенного введения препаратов в количестве 0,5Е (за единицу принято то количество препарата, которое ингибирует 1 мЕ ФДЭ сАМР гомогената крыс в мин при pH 7,5).

Активность ФДЭ сАМР мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу

Poch, Kukowetz [9], модифицированному [10] применением радиоизотопного микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей ТСХ на пластинках «Силуфол UV-254» [11]. В качестве источника ФДЭ сАМР использовали супернатант гомогената (2000 г, 20 мин) мозга крыс. Счет радиоактивности продуктов гидролиза сАМР производили на жидкостном сцинтилляционном спектрофотометре «Intertechnique SH-30» (Франция).

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка. Отделенную ткань мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота (1 кг) измельчали и гомогенизировали горячим раствором 0,25 %-ной уксусной кислоты в стеклянном гомогенизаторе. Экстракцию низкомолекулярных соединений осуществляли по ранее описанному методу [12]. Гомогенат центрифугировали при 5000 об/мин, надосадочную жидкость лиофилизировали. Полученный лиофилизированный порошок обезжиривали смесью этиловый спирт-хлороформ, декантируя надосадочную жидкость через 24 ч. Процедуру повторяли дважды, суммарный надосадочный раствор концентрировали

на ротационном испарителе и лиофилизировали. Полученный порошок составлял 1/30 часть веса взятой ткани.

Дальнейшую очистку кардиоактивных соединений осуществляли по схеме, включающей ИОХ на ДЭАЭ-ц и КМ-ц, гель-фильтрацию через сефадекс G-10, распределительную хроматографию на бумаге, ВЭЖХ (рис. 1). Необходимо отметить, что сравнение профилей элюции на ДЭАЭ-ц и КМ-ц свидетельствовало об оптимальной и отчетливой дифференциации кардиоактивных соединений на анионообменнике. На рис. 2 приведен характерная картина фракционирования пептидов уксуснокислого экстракта мозгового

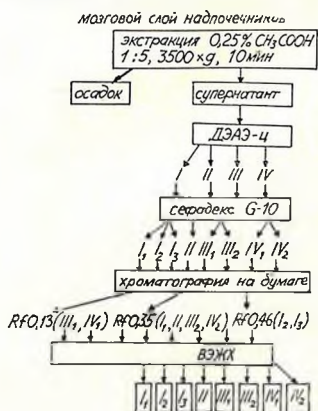


Рис. 1. Основные стадии очистки кардиоактивных соединений мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота

слоя надпочечников крупного рогатого скота на ДЭАЭ-ц. Из представленных данных видно наличие ряда УФ-поглощающих соединений, элюированных в 11 фракциях. Выявлены четыре кардиоактивных соединения, обозначенные как факторы I, II, III, IV. После концентрирования указанные кардиоактивные факторы наносили поочередно на колонку с сефадексом G-10. Отмечая гетерогенность полученных препаратов (рис. 3), можно указать также на различия между ними. Так, максимальное количество основных УФ-поглощающих пиков (3) обнаруживается при гель-фильтрации IV фактора (рис. 3, 2). Минорные же компоненты

выявлены в большом количестве при разделении I фактора (рис. 3, а). Примечательно, что коронароактивные соединения локализованы именно в этих 3 минорных пиках. Между тем, II фактор дополнительно разделяется на три фракции, однако коронарной активностью обладает только один минорный компонент (рис. 3, б). При фракционировании III фактора выявляются два коронароактивных соединения, одно из которых локализовано в основном пике, а другое—в минорном. На стадии очистки с применением ВЭЖХ высокого давления были получены высокоочищенные препараты всех 8 коронароактивных соединений, что дало возможность частично их охарактеризовать.

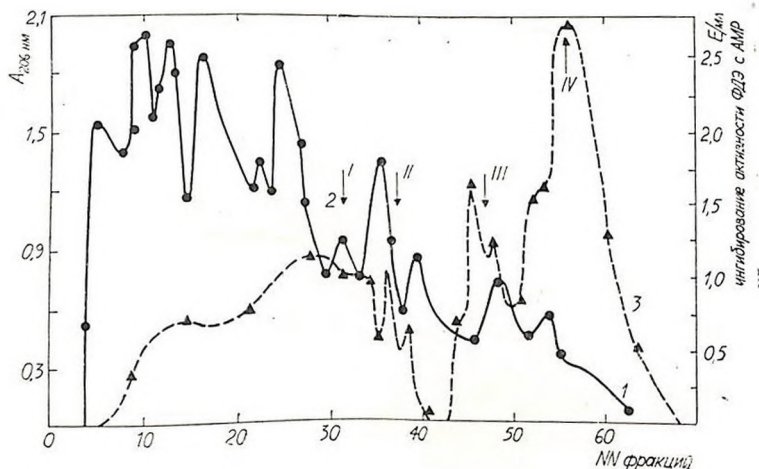


Рис. 2. Профиль элюции соединений уксуснокислого экстракта мозгового слоя надпочечников в ходе хроматографии на колонке с ДЭАЭ-ц (3,5×50 см.). Элюцию проводили линейным градиентом 0,005 М Na⁺-фосфатного буфера (рН 6,5—5,0) и NaCl (0,02—0,5 М) со скоростью 50 мл/ч. Соединения идентифицированы: 1—измерением оптического поглощения при 206 нм; 2—определением коронарорасширяющей активности (стрелкой обозначены места выхода активных соединений); 3—по ФДЭ с АМР ингибирующей активности (Е₅₀/мл)

Характеристика кардиоактивных соединений. Выход кардиоактивных соединений, определяемый по содержанию белка, колебался от 0,03 до 0,09 мг/кг свежей ткани (таблица), суммарное же количество белка достигало 0,51 мг.

Исследование биологического действия указанных соединений в опытах *in situ* на коронарное кровообращение выявило определенные различия между ними. Наибольшей активностью в отношении релаксации коронарных сосудов обладали факторы I₃ и II, увеличивающие объ-

емную емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца на 250 и 300% по сравнению с нормой, и с продолжительностью действия 90—150 мин. При введении этих препаратов отмечено также динамичное нарастание эффекта. Длительность действия характерна также и для

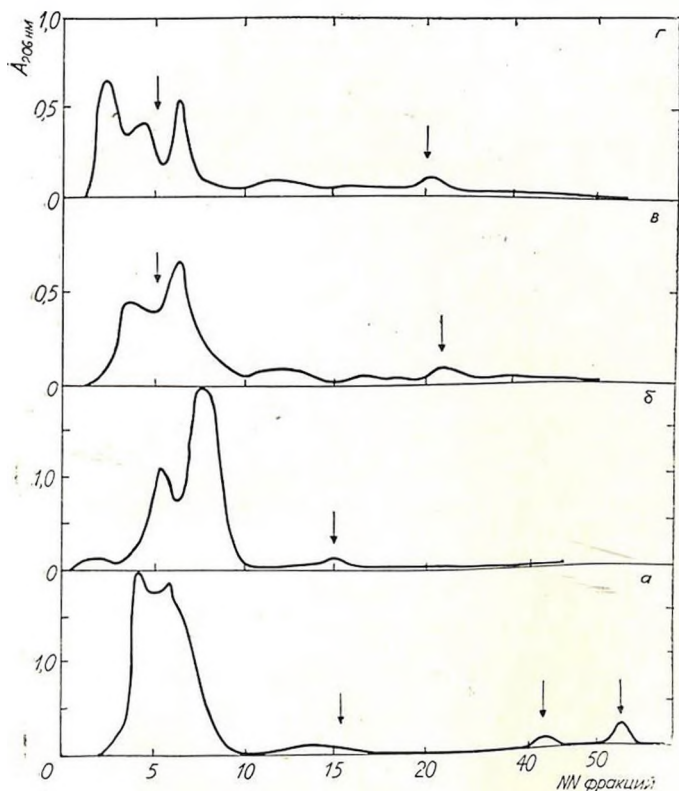


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сепадексом G-10 кардиоактивных соединений мозгового слоя надпочечников, полученных после ИОХ на ДЭАЭ-ц. Элюцию вели бидистиллированной водой со скоростью 60 мл/ч: а—профиль элюции фактора I, б—фактора II, в—фактора III, г—фактора IV. Обозначения те же, что и на рис. 2.

фактора I₁, хотя нарастание эффекта в данном случае не выявляется. В то же время отличительной особенностью факторов III₁ и IV₁ является явно выраженная динамичность действия. Уместно отметить, что под действием этих соединений кровяное давление не претерпевает заметных изменений. Исключение составляет фактор III₂; внутривенное введение этого препарата вызывает некоторое снижение кровяного давления.

Реализация кардиоактивного эффекта исследуемых соединений в клетках-мишенях сопровождалось, в основном, ингибированием активности ФДЭ сАМР. Однако в ходе очистки ингибирующее действие этих соединений изменялось разнонаправленно (рис. 4). Так, если ингиби-

Таблица

Содержание белка по Lowry в кардиоактивных соединениях мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота (в мг/кг влажной ткани) на различных стадиях очистки

Фракция	Содержание белка во фракциях (мг)			
	ДЭАЭ-ц	Фракции	G-10	Электрофорез на бумаге
I	10,5	I ₁	2,2	0,03
		I ₂	2,2	0,05
		I ₃	3,7	0,07
II	17,5	II	5,8	0,07
III	9,2	III ₁	3,0	0,05
IV	11,1	III ₂	3,0	0,09
		IV ₁	3,1	0,07
		IV ₂	2,5	0,09
Суммарное количество белка	48,3		25,5	0,51

рующее действие фактора II значительно (от 0,5 до 1,7 Е) возрастало по мере очистки этого препарата, то у фактора IV₁, напротив, отмечалось снижение эффекта с 2,7 до 1,6 Е. По мере очистки увеличивалось ингибирующее действие также факторов I₁, I₂ и, наоборот, уменьшалось

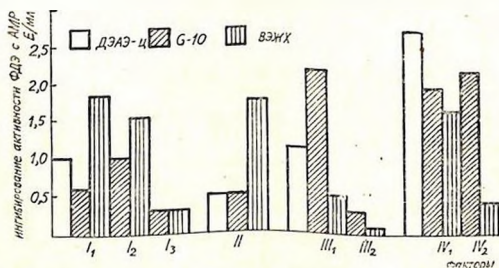


Рис. 4. Диаграмма изменения ФДЭ сАМР ингибирующей активности кардиоактивных нейрогормонов (в Е/мл) на различных стадиях очистки

у факторов III₁, III₂ и IV₂. В частности, ингибирующий эффект фактора III₁ уменьшался после ВЭЖХ на обращенной фазе С₁₈ с 2,2 до 0,5 Е. Аналогично ведет себя фактор IV₂, в то время как фактор I₃ не претерпевает особых изменений в ингибировании отмеченной активности в ходе очистки.

Кардиоактивные соединения медуллы надпочечников отличаются также по R_f распределительной хроматографии, по параметрам которой, 66

их можно выделить в три группы: к I группе ($Rf=0,13$) принадлежат III_1 и IV_1 факторы, ко II ($Rf=0,35$)—факторы I_1 , II, III_2 и IV_2 , к III ($Rf=0,46$) относятся факторы I_2 и I_3 . Вместе с тем, полученные данные высоковольтного электрофореза, в равной мере, и параметры хроматографии на анионо- и катионообменниках позволяют судить об определенном сходстве между этими соединениями, прежде всего об их кислой природе.

Являются ли обнаруженные нами факторы мозгового слоя надпочечников новыми кардиоактивными соединениями или, по крайней мере, некоторые из них структурно-родственными гипоталамическим кардиоактивным нейрогормонам—предмет наших дальнейших исследований.

ISOLATION OF CARDIOACTIVE COMPOUNDS FROM CATTLE ADRENAL GLAND MEDULLA

SRAPIONYAN R. M., PARONYAN Z. Kh., ABRAMYAN S. S.,
GRIGORYAN L. A., KARAPETYAN R. O., GALOYAN A. A.

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

Eight cardioactive compounds have been isolated from cattle adrenal gland medulla. The purification scheme includes chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-100, high-voltage paper electrophoresis, tlc on Silufol UV-250, HPLC on C_{18} (reverse phase). The compounds obtained differ in pharmacological characteristics, perhaps due to their structural peculiarities, namely differences in amino acid composition. Factors II and IV demonstrate analogous to hypothalamic neurohormone inhibition of cAMP PDE and dependence of this effect from their coronary dilating potency. Data obtained make it possible to suggest existence in adrenal gland medulla of compounds, that are structurally related to cardioactive neurohormones from hypothalamus.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith A. D., Winkler H. *Biochem. J.*, v. 108, p. 483-492, 1967.
2. Rossier Y. *Trends Neurosci.*, v. 4, № 4, p. 94-97, 1981.
3. Gorder R., Emsen P. C., Lowry P. I. *Biochem. J.*, v. 219, p. 659-706, 1984.
4. Bjerrum O. J., Helle K. B., Bock E. *Biochem. J.*, v. 181, № 2, p. 231-237, 1979.
5. Bader M. F., Aunis D. 8-th Meet. Inter. Soc. Neurochem., Abstract, p. 351, 1981.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Саакян С. А. Докл. АН АрмССР, т. 56, № 2, с. 102-105, 1973.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265-275, 1951.
8. Morawitz P., Zahn A. *Dt. Arch. Klin. Med.*, v. 116, p. 364, 1914.
9. Poch G., Kukowetz W. R. *Life Sci.*, v. 10, p. 133-141, 1971.
10. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Полосян М. А. *Вопр. биохимии мозга*, Изд-во АН АрмССР, т. II, с. 89-97, 1976.
11. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. А. *Вопр. мед. химии*, т. 21, с. 322-329, 1975.
12. Галоян А. А. *Вспр. биохимии мозга*, т. 8, с. 107-126, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1973.

Поступила 2. III 1987