



УДК 577.112:577.152

## ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА

ГАЛОЯН А. А., БАРХУДАРЯН Н. А., ВАЛКО К.,  
ЗАКАРЯН Т. Р.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Центральный исследовательский институт химии АН ВНР, Будапешт

Используя гель-фильтрацию на сфадексе G-10, ИОХ на Дауэксе 50 W X 8, препаративную и аналитическую ВЭЖХ в обращенной фазе, из гипоталамуса крупного рогатого скота выделены в гомогенном виде 5 коронаросуживающих гликопептидных фактора. Как кислотный, так и ферментативный гидролиз (трипсин, химотрипсин, калесин В (К.Ф. 3.4.22.1) приводили к потере ими коронаросуживающей активности.

В 1962 г. в гипоталамусе крупного рогатого скота были обнаружены 2 кардиотропных нейрогормона [1], оказывающие противоположное действие на коронарное кровообращение (коронарорасширяющее и коронаросуживающее). Впоследствии была открыта группа коронарорасширяющих нейропептидов, условно обозначенных нейрогормонами «С», «К», «Г» [2—3], изучены их физико-химические и биологические свойства и показано, что они существуют в виде множественных форм [4]. Установлено, что эти нейропептиды являются метаболически активными соединениями [5—9], действующими также и на обмен циклических нуклеотидов.

В нашей лаборатории накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о наличии в гипоталамусе крупного рогатого скота целого ряда коронаросуживающих соединений. Однако до сих пор мало изучена их химическая природа. Поэтому представляло интерес выделить и идентифицировать коронаросуживающие соединения гипоталамуса.

В настоящей работе представлены данные о выделении и характеристике пептидных факторов гипоталамуса, которые при внутривенном введении кошкам в условиях *in situ* вызывали заметное снижение объемной емкости крови, оттекающей от венозных сосудов сердца.

## Материалы и методы

Кардиотропные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта гипоталамуса по методу Галояна и соавт. [10]. Дальнейшую очистку про-

водили, используя гель-фильтрацию на сефадексе G-10 и ИОХ на Дауэксе 50 W×8 по ранее описанной схеме [11].

ВЭЖХ пептидов проводили: 1) на колонке Lichrosorb RP-8 (1.6×25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Knauer», ФРГ), с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1%-ной  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (время изменения градиента—1,5 ч), скорость элюции 3 мл/мин; 2) на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (0,46×25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Macherey-Nagel», ФРГ), используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 60% в 0,1%-ной  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (время изменения градиента—1 ч), скорость элюции—1 мл/мин. Пептиды детектировали при 220 нм.

Аминокислотный анализ пептидов проводили после кислотного гидролиза (5,7 н.НCl, 110°, 24 ч) на аминокислотном анализаторе D-500 («Durrum», США).

N-концевые аминокислоты определяли по методу Gray [12]. DNS-производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (5×5 см) [13] или на полиамидных пластинках (3×3 см) [14].

Наличие углеводного компонента в составе исследуемых пептидов определяли по методу Кнапп [15]; *n*-нитробензоатные производные пептидов идентифицировали ТСХ на пластинках «Силуфол UV-254» («Kawallieg», ЧССР) в системе бензол:этилацетат (10:1).

Катепсин В (К.Ф. 3.4.22.1) выделяли по ранее описанному методу [16]. Гидролиз пептидов катепсином В проводили в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,0, содержащем 2 мМ дитиотрейтол и 2 мМ ЭДТА при 37° в течение 4 ч и соотношении фермент/субстрат 1:10.

Гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в 0,1 М аммонийбикарбонатном буфере, pH 8,1 при 37° в течение 4 ч и фермент/субстратном соотношении 1:10.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [17].

ТСХ ферментативных гидролизатов проводили на пластинках силикагеля («Merk», ФРГ) (9×12 см) в системе: *n*-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (15:10:3:12). Хроматограммы проявляли 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под урстановым наркозом.

В работе использованы следующие реактивы: трипсин, химотрипсин («Worthington», США), дитиотрейтол, ЭДТА («Sigma», США), ацетонитрил 'Дауэкс 50 W x8 («Merk», ФРГ), дансилхлорид, сефадекс G-10, сефадекс G-75, CM-сефадекс C-50 («Pharmacia», Швеция), *n*-нитробензоилхлорид предоставлен сотрудником нашей лаборатории Я. В. Возным, остальные реактивы марок х. ч. и ос. ч. («Союзхимреактив», СССР).

### Результаты и обсуждение

Очистку кардиотропных пептидных факторов (ПФ) проводили, как описано ранее [11], с той лишь разницей, что вместо стадии ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (1,0×25 см, диаметр частиц

7 мкм) с применением изократического разделения раствором 50%-ного ацетонитрила в 0,1%-ной  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , были проведены последовательно полупрепаративное и аналитическое разделение методом ВЭЖХ в обращенной фазе пептидной фракции гипоталамуса после ИОХ на Дауэксе 50W $\times$ 8. Полупрепаративное разделение было проведено на колонке Lichrosorb RP-8 (1,6 $\times$ 25 см) с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1%-ной  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (рис. 1). В результате этого разде-

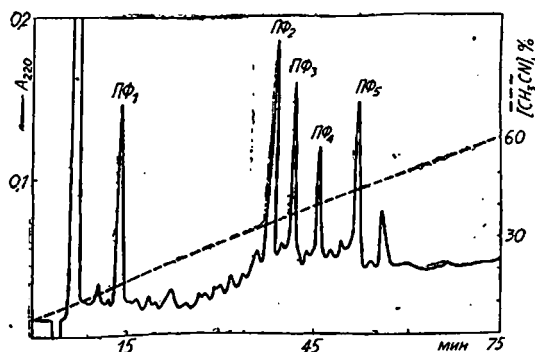
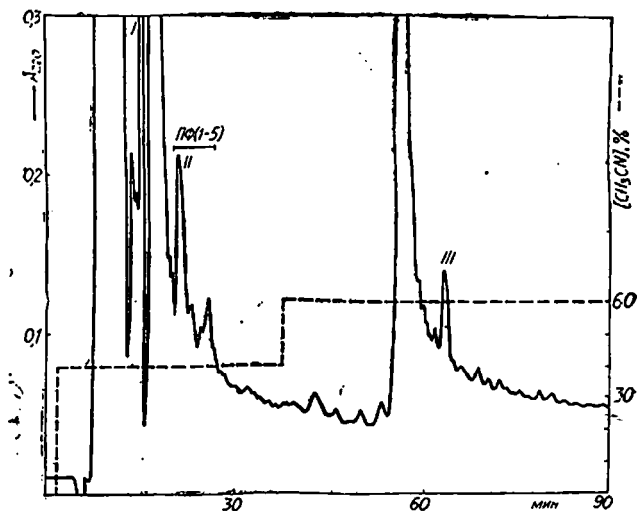


Рис. 1. ВЭЖХ биологически активной пептидной фракции после ИОХ на Дауэксе 50W $\times$ 8 на колонке Lichrosorb RP-8 (1,6 $\times$ 25 см), с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила (пунктир) в 0,1%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ .

Скорость элюции 3 мл/мин

Рис. 2. Рекроматография фракции II (см. рис. 1), содержащей смесь коронаросуживающих пептидных факторов на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (0,46 $\times$ 25 см), с использованием градиента концентрации ацетонитрила (5–60%) в 0,1%  $\text{CF}_3\text{COOH}$ . Скорость элюции 1 мл/мин.

ления в 3-х из полученных фракций была обнаружена биологическая активность. Фракции I и III (время удерживания 13,8 и 62,8 мин соответственно) обладали четко выраженным коронарорасширяющим свойством. Дальнейшему исследованию была подвергнута фракция II, в которой обнаружилась коронаросуживающая активность. Как видно из рис. 1, она представляла собой смесь нескольких соединений (время удерживания их 20,8; 22,7; 25,2 мин соответственно). Эта фракция была лиофилизирована и подвергнута хроматографии на колонке Nucleosil C<sub>18</sub> (0,46×25 см) с применением градиента концентрации ацетонитрила (5—60%) и 0,1%-ной CF<sub>3</sub>COOH (рис. 2). В результате были получены 5 кардиотропных пептидных факторов (время удерживания их 14; 38,8; 42; 46,2; 52,2 мин соответственно). Наиболее выраженной биологической активностью обладали три из них—ПФ<sub>2</sub>, ПФ<sub>3</sub> и ПФ<sub>4</sub>, которые при внутривенном введении кошкам в условиях *in situ* вызывали значительное снижение объемной емкости крови, оттекающей от венозных сосудов сердца по сравнению с нормой.

Гомогенность выделенных пептидных факторов определяли с помощью ТСХ их дансильрованных производных. Было показано, что N-концевой аминокислотой для ПФ<sub>(1-3,4)</sub> является валин, для ПФ<sub>2</sub>—глицина, а для ПФ<sub>5</sub>—пролин.

Результаты изучения аминокислотного состава выделенных пептидных факторов показали, что по аминокислотному составу ПФ<sub>(1-4)</sub> обладали сходством. Для них характерны высокое содержание серина, глицина, глутаминовой кислоты, составляющее от 34% до 53% от общей суммы остатков. Для ПФ<sub>5</sub>, помимо высокого содержания серина, глицина и глутаминовой кислоты, характерно наибольшее по сравнению с ПФ<sub>(1-4)</sub> содержание аргинина (таблица), а также наличие в его составе неидентифицированного соединения основного характера.

Таблица

Аминокислотный состав коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ) (1—5) гипоталамуса крупного рогатого скота (в ммоль/мкг пептида)

| Аминокислота | ПФ <sub>1</sub> | ПФ <sub>2</sub> | ПФ <sub>3</sub> | ПФ <sub>4</sub> | ПФ <sub>5</sub> |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Asp          | 0,38            | 1,04            | 0,37            | 0,33            | 0,72            |
| Thr          | 0,15            | 0,14            | 0,14            | —               | 0,58            |
| Ser          | 0,53            | 0,51            | 0,67            | 1,07            | 1,96            |
| Glu          | 0,38            | 0,77            | 0,51            | 0,57            | 1,87            |
| Pro          | 0,22            | —               | 0,17            | 0,27            | 0,39            |
| Gly          | 0,48            | 0,70            | 0,73            | 0,66            | 1,82            |
| Ala          | 0,26            | 0,46            | 0,34            | 0,47            | 0,97            |
| Val          | 0,28            | 0,39            | 0,31            | 0,21            | 0,31            |
| Ile          | 0,15            | 0,11            | —               | 0,14            | 0,28            |
| Leu          | 0,17            | 0,18            | 0,35            | 0,13            | 0,45            |
| Tyr          | 0,14            | —               | —               | 0,14            | 0,32            |
| Phe          | 0,19            | —               | —               | 0,17            | —               |
| His          | —               | —               | —               | —               | 0,25            |
| Lys          | 0,14            | 0,14            | 0,16            | 0,14            | 0,17            |
| Arg          | 0,18            | 0,18            | 0,19            | 0,16            | 0,44            |

Примечание. Cys, Met, Trp не определяли.

Величина  $M_r$  выделенных пептидных факторов, скорректированная по данным аминокислотного состава, равна для ПФ<sub>1</sub>  $\approx 3$  кД, ПФ<sub>(2-4)</sub>  $\approx 3.5$  кД, а ПФ<sub>5</sub>  $\approx 7$  кД.

Кислотный гидролиз полученных кардиотропных пептидных факторов (5.7 н.НСl при 110° в течение 18 ч) приводил к потере биологической активности.

При изучении действия ряда протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин и катепсин В) на коронаросуживающие пептидные факторы оказалось, что уже после 4-х часовой инкубации при 37° и соотношении фермент/субстрат 1:10 наблюдалось исчезновение коронаросуживающей активности. Исследование ферментативных гидролизатов вышеуказанных нейропептидов обнаружило появление новых неидентифицированных продуктов при ТСХ на пластинках силикагеля.

Все пять пептидных факторов имели положительную реакцию с п-нитробензоилхлоридом, приводящую к образованию ультрафиолетпоглощающих пятен с  $R_f$  от 0.71 до 0.76 при ТСХ на пластинках Силуфол, что свидетельствовало о наличии углеводного компонента в их составе.

Таким образом, из гипоталамуса крупного рогатого скота выделены в гомогенном виде 5 кардиотропных гликопептидных факторов. Изучен их аминокислотный состав, определены N-концевые аминокислоты.

Интересными, на наш взгляд, представляются данные относительно действия внутриклеточной цистеиновой протеиназы—катепсина В—на выделенные нейропептиды, в результате чего происходит потеря ими коронаросуживающей активности. Ранее нами были получены данные относительно участия высокомолекулярной аспартильной протеиназы, сходной по своим свойствам с катепсином Д [18] в образовании коронарорасширяющего фрагмента из инертного белка-носителя нейрого르몬а «С» [19]. Эти данные позволяют предположить, что внутриклеточные протеиназы и в условиях *in vivo* участвуют как в процессинге, так и в деградации кардиотропных нейропептидов.

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HYPOTHALAMIC CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

A. A. GALOYAN, N. A. BARKHUDARYAN, K. VALKO\*, T. R. ZAKARYAN,

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan,

\*Central Research Institute for Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Five coronaroconstrictory glycopeptides were isolated from bovine hypothalamus by gel-filtration on Sephadex G-10, ion-exchange chromatography on Dowex 50Wx8, semipreparative and analytical reverse-phase high-performance liquid chromatography. Acid or enzymatic digestion (trypsin, chymotrypsin, cathepsin B (E.C. 3.4.22.1) resulted in the loss of coronaroconstrictory activity of these peptides.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109—111, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 3, с. 291—311, 1967.
3. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 183—186, 1974.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф., Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—365, 1986.
5. Галоян А. А., Гурвич Б. Я., Полюсян М. А. Вopr. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 89—97, 1976.
6. Галоян А. А., Алексанян С. С., Абелян Ж. Г., Бархударян Н. А. Докл. АН АрмССР, т. 2, с. 117—120, 1975.
7. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С., Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—49, 1986.
8. Парсаданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.
9. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
10. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 37, с. 157—160, 1963.
11. Бархударян Н. А., Серабян С. С., Алексанян С. С., Захарян Т. Р., Мурадян М. Ш., Галоян А. А. Тезисы докл. X Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы «Фундаментальные достижения нейрохимии медицины» (под редакцией С. Е. Сиверина), с. 70, Горький, 1987.
12. Gray W. R.—In: Methods in Enzymology (Ed. Hors C. H. W.), № 11, p. 137—151, N. Y.—L. Acad Press, 1967.
13. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. Докл. АН СССР, № 1, с. 91—93, 1967.
14. Woods K. R., Wong K. T. Biochim et biophys. acta, v. 133, № 2, p. 369—370, 1967.
15. Knapp D. R. Handbook of Analytical derivatization reactions, p. 559—560, 1979.
16. Galoyan A. A., Azaryan A. V., Barkhudaryan N. A. Regulation of transmitter function Proc. 5 th—Meeting Eur. Soc. Neurochem. (ed. Vizi and Magyar), p. 229—236, 1984.
17. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Roundall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
18. Бархударян Н. А., Азарян А. В. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 280—287, 1983.
19. Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 769—789, 1986.

Поступила 25. IV 1988