

УДК 612.441.018:[612.126.41 + 612.126.18]

БИОХИМИЯ

Л. И. СТЕКОЛЬНИКОВ, О. М. ТЕПЕЛИНА, А. АБДУКАРИМОВ,
В. М. КОНОПАЦКАЯ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАГМЕНТОВ МОЛЕКУЛЫ ТИРОКАЛЬЦИТОНИНА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 10 VII 1969)

За последнее время в литературе появилось большое количество сообщений, касающихся изучения механизма гипокальцемического действия недавно открытого гормона щитовидной железы — тирокальцитонина (ТКТ). По данным ряда авторов (1-3), ТКТ тормозит резорбцию костной ткани. Наряду с этим нами было установлено, что внутривенное введение кроликам ТКТ приводит к появлению этого гормона в цереброспинальной жидкости (4). Этот факт свидетельствует о проницаемости гемато-энцефалического барьера для ТКТ и позволяет предположить наличие центрального механизма его действия.

Получение высокоочищенных препаратов ТКТ (5, 6), а также расшифровка строения молекулы свиного ТКТ (7) позволяют изучить интимные взаимосвязи между структурой и биологической функцией этого гормона.

Белл с сотрудниками (7), изучая гипокальцемическую активность отдельных фрагментов, полученных после ферментативного расщепления молекулы ТКТ, показали, что ни один из этих фрагментов не обладал способностью снижать уровень кальция в крови. К такому же выводу пришли и другие исследователи (6). В то же время, в опытах Бланке с соавторами (8) было установлено, что кислотный гидролиз ТКТ приводит к появлению нескольких пептидов, один из которых вызывает отчетливое снижение концентрации кальция в сыворотке крови крыс. Хроматографическое исследование этого активного пептида показало, что он состоит из 9 аминокислотных остатков.

Важно подчеркнуть, что эти исследования были проведены на препаратах ТКТ, выделенных из щитовидной железы свиней. Согласно Беллу (7), последовательность расположения аминокислотных остатков в молекуле свиного тирокальцитонина выглядит так:

Н — Цис — Сер — Асп — Лей — Сер — Тре — Цис — Вал — Лей — Сер — Ала — Тир — Трип — Арг —
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
— Асп — Лей — Асп — Асп — Фен — Гис — Арг — Фен — Сер — Гли — Мет — Глу — Фен — Гли —
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
— Про — Глу — Тре — Про — NH₂
29 30 31 32

Вместе с тем, есть данные, свидетельствующие о некоторых различиях в химическом строении ТКТ, полученных от различных животных (9, 10). В связи с этим представляет интерес провести исследования препарата ТКТ, выделенного из щитовидных желез крупного рогатого скота (11).

Нами (12) установлено, что отечественный препарат ТКТ, полученный по модифицированному методу Гудмундссена и др. (13) и подвергнутый дополнительной очистке, обладает способностью вызывать гипокальцемическую реакцию у молодых интактных крыс в дозах 0,1—0,5 мкг на животное. Хроматографическое и электрофоретическое исследование на бума-

те водных растворов этого препарата показало, что ТКТ дает только одно пятно, окрашивающееся нингидрином. Фракционирование на колонках с Сефадексом Г-50 и ДЭАЭ-целлюлозой позволило установить, что ТКТ выходит в виде одного пика после элюции. Это свидетельствовало в пользу относительной гомогенности препарата.

Для выделения отдельных фрагментов молекулы ТКТ мы подвергали 1% водные растворы препарата кислотному гидролизу с 6 N HCl в запаянных ампулах при 105° в течение 24 час.; полученный гидролизат исследовали методом хроматографии на бумаге в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Проявление хроматограмм нингидрином позволило выявить наличие в гидролизате 10—12 пятен. В то же время, при электрофоретическом разделении этого гидролизата на бумаге в системе ацетатно-



Рис. 1

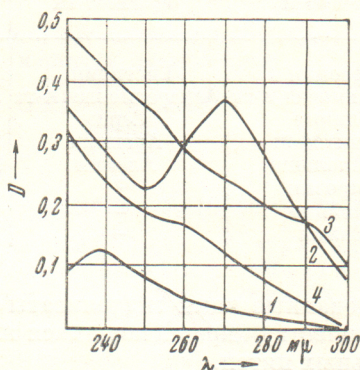


Рис. 2

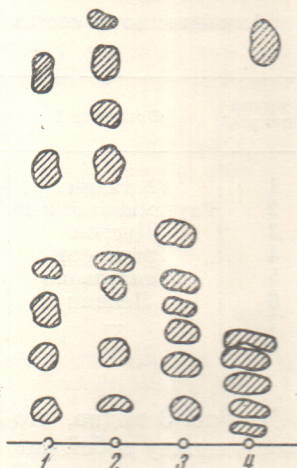


Рис. 3

Рис. 1. Электрофореграмма кислотного гидролизата бычьего ТКТ. Объяснение в тексте

Рис. 2. Спектрофотометрические кривые отдельных фракций (1—4) бычьего ТКТ, элюированных с электрофореграмм

Рис. 3. Хроматограммы кислотных гидролизатов отдельных фракций (1—4), элюированных с электрофореграмм

го буферного раствора pH 4,15 (800 в, 20 ма) в течение 2,5—3 час. были обнаружены 3 пятна, движущихся к аноду и дающих положительную реакцию с нингидрином, и 1 движущееся к катоду (рис. 1, 1—4). В ряде опытов, кроме этих пятен, проявлялись еще 2 дополнительных пятна (на рис. 1 они обведены пунктиром). Однако эти пятна слабо окрашивались нингидрином и не использовались нами в дальнейшей работе.

Исследование биологической активности полученного гидролизата бычьего ТКТ показало полную его инертность в отношении способности снижать концентрацию кальция в крови крыс или кроликов. Поэтому представляло интерес изучить гипокальциемическую активность отдельных фрагментов расщепленной молекулы этого гормона.

Используя одну из проявленных нингидрином электрофореграмм в качестве «свидетеля», мы вырезали из непроявленных 15 полосок бумаги соответствующие пятна, каждую группу пятен объединяли и элюировали 0,2 N раствором HCl в течение 30—45 мин. Образующуюся при этом бумажную мязгу отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость подвергали спектрофотометрическому исследованию в у.-ф. области при 230—320 мμ.

Как видно из рис. 2, элюаты пятен 1, 3 и 4 кислотного гидролизата бычьего ТКТ, полученные с электрофореграмм, практически не обладали

способностью поглощать в у.-ф. области. В то же время элюат пятна 2 имел характерный для белков спектр поглощения с минимумом при 250 и максимумом при 275 м μ . Это позволило предположить, что в состав данного фрагмента молекулы ТКТ входят циклические ароматические аминокислоты.

Для получения более подробной характеристики выделенных фрагментов все элюаты упаривали досуха при 30—40°, остатки растворяли в 1 мл воды, добавляли 2 капли 6 N HCl и гидролизовали при 105° в течение 24 час. По окончании гидролиза растворы наносили на полоски хроматографической бумаги и хроматографировали в системе бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5).

Таблица 1

Аминокислотный состав отдельных фрагментов молекулы ТКТ, полученных в результате кислотного гидролиза

№ пятна (от старта)	Фрагмент I	Фрагмент II	Фрагмент III	Фрагмент IV
1	Гистидин	Треонин	Гистидин	Метионин
2	Глутаминовая к-та	Глутаминовая к-та	Аспарагиновая к-та	Лизин
3	Цистин	Аланин	Серин	Гистидин
4	Триптофан	Триптофан	Аргинин	Аспарагиновая к-та
5	Фенилаланин	Фенилаланин	Аланин	Глутаминовая к-та
6	Лейцин	Тирозин	?	Лейцин
7	—	Лейцин	—	—
8	—	Валин	—	—

Из рис. 3 видно, что исследованные нами гидролизаты заметно различались между собой как по количеству окрашивающихся нингидрином пятен, так и по величине R_f отдельных пятен.

Использование в качестве свидетелей аминокислот позволило расшифровать аминокислотный состав каждого пятна. Из табл. 1 видно, что в состав фрагментов I—IV молекулы ТКТ входит 6—8 аминокислотных остатков. Одна из шести обнаруженных аминокислот в фрагменте III осталась нами неидентифицированной.

Анализ полученных данных показывает, что выделенные нами фрагменты молекулы бычьего ТКТ содержат те же аминокислоты, которые были обнаружены в молекуле свиного ТКТ. В то же время, в свином препарате ТКТ не было найдено лизина. Эта аминокислота содержалась в гидролизате элюата IV фрагмента бычьего ТКТ. Этот факт, а также отсутствие в изученных нами фрагментах пролина и глицина свидетельствуют о различии в химическом строении этих двух видов ТКТ.

Для выяснения характера взаимосвязи между химическим строением и биологической функцией отечественного препарата ТКТ нами было проведено исследование гипокальцемической активности всех выделенных после гидролиза фракций.

Опыты проводились на интактных крысах-самцах весом 50—60, находившихся в течение суток на голодной диете. Крысам четырех групп (по 7 животных в группе) вводили внутривенно по 1 мл раствора одной из полученных фракций. Пятую группу составляли контрольные животные. Через 1 час после инъекции у крыс брали кровь и в сыворотке определяли содержание кальция методом комплексонометрического титрования с использованием флуорексона в качестве индикатора. Изучение гипокальцемического действия отдельных фрагментов ТКТ показало, что введение крысам раствора фракции II вызывает у них падение уровня кальция в среднем на 2,25 мг%; фракции I и III обладали значительно менее выраженным гипокальцемическим эффектом, а фракция IV оказалась практически неактивной.

Учитывая, что в молекуле ТКТ свиньи содержится только один остаток тирозина в 12-м положении, можно полагать, что «активный центр» располагается в начале полипептидной цепи молекулы данного гормона. В пользу этого предположения свидетельствует и наличие аланина и триптофана, которые занимают соответственно 11-е и 13-места в цепи ТКТ. Вместе с тем, наличие этих аминокислот и в других местах молекулы свиного ТКТ, а также обнаружение в составе активной фракции треонина и фенилаланина, которые располагаются на другом участке полипептидной цепи, позволяют высказать предположение о различии в химическом строении свиного и говяжьего ТКТ.

Необходимо также учитывать, что, в отличие от ферментативного, кислотный гидролиз не позволяет расщеплять молекулу белка по строго определенным связям. В то же время факт получения сравнительно низкомолекулярных пептидов, содержащих 6—8 аминокислотных остатков, активных в гипокальциемическом отношении, свидетельствует о том, что для проявления специфической биологической функции ТКТ не обязательно присутствие всей молекулы этого гормона.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт антибиотиков
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 VII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ T. I. Martin, C. I. Robinson, I. MacIntyre, *Lancet*, № 7443, 900 (1966).
² T. I. Martin, C. I. Robinson, I. MacIntyre, *J. Endocrinology*, **39**, 71 (1967).
³ G. Milhaud, *Ann. Endocrinology*, **29**, 563 (1968).
⁴ Л. И. Стекольников, А. Абдукаримов, *ДАН*, **185**, № 3 (1969).
⁵ T. E. Beesley, R. E. Harman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, № 12 (1968).
⁶ T. W. Kahnt, B. Riniker et al., *Helv. chim. acta*, **51**, 1 (1968).
⁷ P. H. Bell, W. F. Bary et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 10 (1968).
⁸ P. Blanquet, M. Croizet, C. Moura, *C. R.*, **D265**, № 20 (1967).
⁹ R. Y. Barrett, P. H. Bell et al. *J. Clin Endocrinol.*, **28**, 15 (1968).
¹⁰ Р. Камук, *Przegl. Zool.*, **11**, № 4 (1967).
¹¹ С. Б. Катковский, Л. И. Стекольников и др., В сборн. *Эндокринные препараты в современной медицине*, М., 1968, стр. 9.
¹² А. И. Брискин, Л. И. Стекольников и др., **185**, № 2 (1969).
¹³ T. U. Gudmundsson, *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **164**, № 966 (1966).