

А. А. ГАЛОЯН

## ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ГИПОТАЛАМО-НЕЙРОГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ

Гипоталамус является высшим вегетативным центром организма. Благодаря наличию морфо-биохимических связей гипоталамуса с нейро-гипофизом последний оказывает и регулирующее влияние на эндокринную систему.

Характерная особенность гипоталамуса заключается в том, что в некоторых ядрах (супраоптическое, паравентрикулярные и др.) образуются нейрогормоны в составе нейросекреторного вещества, которые транспортируются из этих ядер в нейрогипофиз (через портальную систему гипоталамуса и через аксоны) и оказывают характерное влияние на гормонопоез аденогипофиза. Эти нейрогормоны в составе нейросекреторного вещества могут выделяться прямо в кровь или в цереброспинальную жидкость. Имеются все основания считать, что нейросекреторные клетки имеют эндокринные функции. Каждая клетка окружена сосудами. Таким образом, можно считать, что некоторые гипоталамические ядра не только регулируют гормонообразование аденогипофиза, но и сами являются эндокринными аппаратами. В указанном отношении этот важнейший отдел подкорки является своеобразным местом нейрогуморальной регуляции функции организма. Следует отметить, что наряду с нейросекреторными гормонами (окситоцин, вазопрессин, антидиуретический гормон, вещество Р и др.) в гипоталамусе сосредоточены в наибольших количествах ацетилхолин, адреналин, норадреналин, серотонин, гистамин, гамма-аминомасляная кислота. Эти данные свидетельствуют также о важнейшей роли гипоталамических нейронов в сложной рефлекторной деятельности мозга.

В течение нескольких лет мы накопили большой фактический материал, свидетельствующий о глубокой функционально-биохимической связи медиаторов нервного возбуждения с нейросекреторными гормонами [1—10]. Наши данные, в частности, показали, что отдельные медиаторы оказывают специфическое влияние на образование и транспорт нейросекреторных гормонов из гипоталамуса в нейрогипофиз. По-видимому, нейросекреторные гормоны являются необходимыми посредниками, через которые осуществляются регуляторные влияния высших отделов ц. н. с. на вегетативно-эндокринные функции организма. Следует отметить, что весьма мало известно относительно химических факторов гипоталамуса, оказывающих влияние на гормонопоез отдельных гормонов аденогипофиза. Из гипоталамо-нейрогипофизарной системы выделе-

ны и идентифицированы в основном два нейрогормона—вазопрессин и окситоцин, а между тем аденогипофиз имеет многогранные функции (там образуется шесть гормонов, а может быть и больше).

Нейрогормоны гипоталамуса могут иметь и самостоятельное значение—они выступают регуляторами определенных функций организма. В этом отношении представляет большой интерес выяснение биохимической природы нейросекреторного вещества (и гормонов, входящих в его состав) и тех биохимических интимных процессов, которыми обуславливается взаимосвязь между гормонами и медиаторами нервного импульса.

Отметим, что весьма мало известно о гормоносоставе нейросекреторных гранул, продуцируемых нервными клетками. Известно только, что нейросекреторное вещество является глюколипопротеидом и в его состав входят окситоцин и вазопрессин, которые переводятся из гипоталамуса в нейрогипофиз и оказывают определенное влияние на гормонопоезд аденогипофиза (на АКТГ функцию).

Многочисленные гисто-биохимические исследования по изучению взаимоотношения медиаторов с нейросекреторным веществом убедили нас в том, что в гипоталамусе, вероятно в нейросекреторных ядрах, окрашивающихся хромовым гематоксилином по Гомори, образуются вещества, не сходные ни с вазопрессином ни с окситоцином.

В настоящей статье приводятся данные относительно выделения новых биологически активных соединений (вероятно, гормонов) из гипоталамуса.

На основании экспериментальных данных делается попытка выяснить роль и место этих гормонов в сложных нейрогуморальных взаимоотношениях.

### М е т о д и к а

**Экстракция.** Подопытными животными были белые крысы обоих полов весом 200—250,0 г. Животных быстро декапировали, извлекали мозг. Тщательно освобождали его от *dura mater* и сосудистого слоя, промывали в дистиллированной воде (для освобождения от остатков крови), затем фильтровальной бумагой высушивали и отделяли гипоталамическую область и нейрогипофиз от мозга. Из определенных областей гипоталамуса (из местоположения нейросекреторных ядер) брали кусочки ткани, взвешивали на торсионных весах и гомогенизировали в 0,25—0,5% раствора уксусной кислоты, рН—4. После тщательной гомогенизации на льду и центрифугирования в течение 20 мин. при 5000 об/мин. полученный осадок еще один-два раза промывали уксусной кислотой, центрифугировали и собирали надосадочные жидкости в одну пробирку. Прозрачную надосадочную жидкость подвергали лиофилизации и высушиванию (глубоким замораживанием). Полученный при этом порошок составлял  $\frac{1}{10}$  часть сырого материала. Из этого порошка мы брали 0,5—1,0 мг, растворяли в 0,1 мл дистиллированной воды и с помощью

микробюреток наносили по 0,006, 0,01 на хроматографическую бумагу. Для выяснения некоторых сторон природы исследуемых нами веществ ткань в других опытах гомогенизировали при 38; 95°C в течение 25—30 мин. В некоторых опытах вместо лифизации и высушивания надосадочную жидкость оставляли в термостате на ночь для выпаривания. Затем осадок растворяли в дистиллированной воде, тщательно собирали остаток со стенок сосудов и наносили на хроматографическую бумагу (медленную).

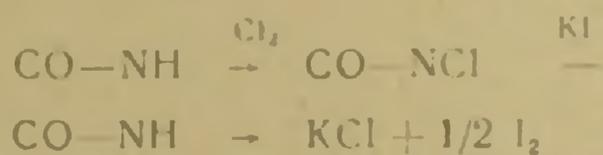
**Хроматография.** Хроматографическая бумага предварительно была вымыта дистиллированной водой с версеном для освобождения от металлов. Хроматографическая бумага была промыта также в растворителе и высушена на воздухе при комнатной температуре. Растворителем служила *N*-бутанол-уксусная кислота—вода (5 : 1 : 4), где хроматографическая бумага была оставлена в течение 24—48 часов. После высушивания бумаги при комнатной температуре в течение 1—2 суток пятна проявлялись.

В 1952 г. Ридон и Смит [11] сообщили о двух серьезных ограничениях применения нингирида в качестве проявителя аминокислот и пептидов:

1) нингидрид не может реагировать с циклическими или ацетилированными аминокислотами или пептидами, так как он реагирует только с концевыми (свободными) аминогруппами, и

2) с увеличением молекулярного веса вещества интенсивность окрашивания уменьшается.

Эти авторы показали, что пептиды всех видов, включая протеины, дикетопиперазин и ацетилированные аминокислоты и пептиды могут быть очень легко обнаружены хлорированием и последующей обработкой с калийод-крахмальной жидкостью. Образование цвета обусловливается высвобождением йода в стадии образования *N*-хлор-пептида (в процессе хлорирования).



Этот метод отличается также высокой чувствительностью по сравнению с нингидридом, что особенно важно при определении пептидов с высоким молекулярным весом, когда нингидрид относительно нечувствителен. Тот же метод на бумажной хроматограмме может выявить также другие виды соединения содержания азота, способного к хлорированию, такие, как амиды, имиды и первичные и вторичные амины, включая пурины и бензимидазолы. Данный метод позволяет определить все виды пептидов в микрограммах. Хотя он и выявляет все категории веществ и обладает достаточной чувствительностью, тем не менее в первоначальной форме данный метод имел ряд недостатков. Главный недостаток заключается в том, что хлорированные хроматограммы высушивались на воздухе, затем проводилось выявление пятен. Удаление излишнего количества хлора связано с теми или иными трудностями —

хлорированные производные не обладают достаточной стабильностью для того, чтобы выдержать влияние более или менее длительного воздействия воздушной струи на хлорированную хроматограмму. Таким образом, малые количества могли оставаться невыявленными. Но главная опасность этого метода заключалась в том, что бумага обладает высокой чувствительностью и может показать пятна в тех местах, где нет никаких аминокислот.

Существенным изменением, введенным Райнделом и Гоппе [12] в метод Ридона и Смита, является то, что бумажную полоску они хлорируют не в сухом виде, а увлажняют смесью водного алкоголя и ацетона, затем хлорируют и погружают хлорированные бумаги в уксуснокислый слабый раствор бензидина.

В конечном итоге воздействие хлора на бензидин приводит, во-первых, к мерихиноидной системе, затем к образованию дифенхиондиминов. Соответственно в процессе закрашивания хроматограмм могут возникать продукты совершенно различной окраски и, прежде всего, разной степени растворимости в органических растворителях, а также в воде. Существенно отметить, что образованные краски нерастворимы в органических растворителях и в воде, так что окрашенные места на хроматограммах не меняют своего места и не расплываются. Нерастворимость достигается путем добавления раствора йодистого калия в ванну, где совершается закрашка, вследствие чего на белом дне образуются нерастворимые темно-синие пятна при употреблении бензидина и еще более темные при толуидине. После окрашивания хроматографической бумаги последнюю ополаскивают в 2% растворе уксусной кислоты, который закрепляет пятна и не дает им перекрашиваться. Следует подчеркнуть, что закрашивать можно только лишь такие хроматограммы или же электрофореграммы, для которых применяются растворители или же соли, не препятствующие закрашиванию. Например, веронал исключается как буферная соль, при феноле же следует соблюдать особые правила. При применении смешанных растворителей, например употреблении бутанол-водной-уксусной кислоты для бумажной хроматографии окраска может совершаться лишь тогда, когда хроматограммы сушились струей воздуха. То же самое можно сказать и о электрофореграмме, в случае, если применяется борно-лимонная кислота или ацетатный буфер.

В наших опытах мы впервые пользовались указанными выше методами, хотя авторы пользовались ими для препаративных целей. Для выявления циклических пептидов (окситоцин, вазопрессин) этот же метод использовали также Геллер и Ледерис [13].

Для получения хлора мы пользовались изготовленными нами ваннами, куда наливали  $KMnO_4$  и  $HCl$ . В зависимости от размера хроматографической бумаги применялись ванны разной величины. Были приготовлены деревянные коробки размером  $8 \times 40 \times 5$  см или других размеров, а внутри этих коробок по стенкам вставлялись стекла, скрепленные друг с другом пластырем. На высоте 3—4 см от дна, где находятся растворы  $KMnO_4$  и  $HCl$ , делались специальные вырезы для закрепления

стеклянных палочек толщиной 3—5 мм. Хроматографические бумаги после увлажнения в ацетон-алкогольном растворе клались на эти стеклянные палочки, а ванна сразу герметично закрывалась стеклянной крышкой (между краями ванны и стекла находилась пластмасса). Затем осуществлялось легкое покачивание ванны и в течение 5 минут происходило полное хлорирование хроматографических бумаг. Опыт показал, что после хлорирования каждой хроматографической бумаги определенными количествами  $KMnO_4$  и  $HCl$  следует поменять эти растворы, так как замечается разность интенсивности окрашивания пятен одних и тех же хроматограмм при выдерживании в одних и тех же порциях смеси. После смены раствора следует тщательно очищать и высушивать стеклянные палочки, иначе в местах соприкосновения с каплями раствора образуются весьма интенсивно окрашенные синие пятна. Во избежание этих погрешностей можно предложить ванну, снабженную с одной стороны воронкой (сбоку), а с другой (на дне) — краном. Это позволит в любом случае добавить реакционную смесь и после окончания хлорирования сразу эвакуировать эту смесь без загрязнения палочек, а также сократит время работы и не даст артефакты. Следует обратить особое внимание на точное время экспозиции хроматографических бумаг. При выдержке свыше 5 минут бумага начинает желтеть, а при переброске в раствор бензидина она полностью синееет.

Полученные таким образом пятна весьма отчетливо видны, довольно хорошо отделаны и имеют сине-голубой цвет. Эти пятна при продолжительном оставлении на воздухе могут значительно терять свой цвет. Поэтому сразу после проявления хроматограммы следует сфотографировать.

Для сравнения полученных хроматограмм в некоторых опытах хроматографические пятна выявлялись с помощью нингирида. Параллельные пятна (непроявленные) элюировали изоасмотическим раствором  $NaCl$  в 1,5—2,0 мл и для идентификации испытывали выделенные нами фракции на биологических объектах.

**Диализ.** Для общего представления величины молекул выделенных нами фракций гомогенизированные экстракты (надосадочные) переводили в мешок из полупроницаемой мембраны. рН окружающей дистиллированной воды доводили до рН гомогената (рН—3—4), затем в течение 48 часов крутили в холодильнике (3—4°C). В тех случаях, когда диализировался гомогенат, приготовленный при 90°C, диализатор не ставился в холодильник, а работал при комнатной температуре (22—23°C). Диализировали против 3 л дистиллированной воды (количество гомогената—3—4 мл). Через каждые 6 часов дистиллированная вода сменялась. Интересно заметить, что после диализа на дне мешка (экстракт без плюсовой температурной обработки) образовалась абсолютно белого цвета легко плавающая в экстракте паутинообразная масса, которая так же легко растворялась при встряхивании мешка.

### Биологические методы идентификации пятен

**Вазопрессин.** Относительно вазопрессорной активности судили по изменению кровяного давления подопытных кошек при внутривенном введении элюатов хроматографических пятен. Кошки находились под уретановым наркозом.

**Окситоцин.** Окситоцическую активность определяют на двух тест-объектах согласно британской фармакопеи:

- 1) на кровяном давлении домашних птиц (вызывает неглубокое падение кровяного давления в течение 3—10 минут);
- 2) на матке крысы (вызывает сокращение).

В наших опытах об окситоцической активности судили только по сокращению девственной матки крысы весом 120—150 г.

В стеклянных ванночках объемной емкостью 5—10 см, толщиной 1,0—1,5 см, инкубировали в ультратермостате рога матки крысы при 29—30°C в следующей смеси:

	г
NaCl . . . . .	.9
KCl . . . . .	.0,42
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	.0,12
NaHCO <sub>3</sub> . . . . .	.0,5
MgCl <sub>2</sub> . . . . .	.0,0025
Воды . . . . .	до 1 л.

К этой смеси добавляется и декстроза из расчета 250 мг на литр. В наших опытах мы пользовались вместо декстрозы глюкозой в таких же количествах. Раствор постоянно насыщался кислородом из баллона (в секунду один пузырек).

Верхний кончик рога матки закрепляли на рычаг, и сокращения матки регистрировали на закопченной ленте кимографом.

**Методы измерения коронарного оттока и тонуса коронарных сосудов.** Элюаты хроматографических пятен были испытаны на оттоке крови, идущей из коронарных синусов по методу Н. В. Кавериной [14]. Опыты проводились под уретановым наркозом. При искусственном дыхании вскрывали грудную клетку в пятом-шестом межреберном пространстве. Принцип этого метода сводится к тому, что создается кровообращение между венозным синусом и яремной веной, и измеряется во времени количество крови, оттекающей из венозных синусов. Во избежание свертывания крови вводили гепарин внутривенно из расчета 1000—1500 ед/кг. Тонус артериальных сосудов сердца измеряли перфузионным насосом для сопротивления (тонуса) сосудов (ПН-2) по методу, предложенному В. М. Хаютиным, В. М. Данчаковым и В. Л. Цатуровым [15].

Принцип этого метода заключается в следующем. Беря кровь из проксимального конца артерии, снабжающей исследуемую сосудистую область, и нагнетая в дистальный конец этой артерии, насос должен поддерживать постоянный минутный объем перфузии, независимо от колебаний входного артериального давления и тонуса перфузируемых со-

судов. В этом случае, как отмечают авторы метода, перфузионное давление, регистрируемое на выходе насоса, оказывается функцией сопротивления кровеносных сосудов органа и может рассматриваться как показатель их тонуса.

### Результаты опытов

После выпаривания экстракта в термостате и нанесения на хроматографическую бумагу мы получили три пятна: верхнее, наиболее малое пятно, и два пятна, стоявшие очень близко друг от друга—внизу. Эти три пятна были окрашены весьма интенсивно в синий цвет. После тщательного промывания (в 0,1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды) дна бюксина, где имелся осадок на хроматограммах, количество проявленных фракций постепенно увеличивалось. Имело также большое значение время выдерживания хроматографических бумаг в растворителе. Как видно из хроматограмм I, II, III (рис. 1, 2, 3), число выделенных фракций по мере количественного нанесения увеличивалось (в первом видны 7, втором—9, третьем—10 пятен). Наиболее постоянно (во всех случаях) выявляются пятна 3, 4, 5 в хроматограммах I и II, а также пятно 6 (хроматограмма I) и 7 (хроматограмма II).

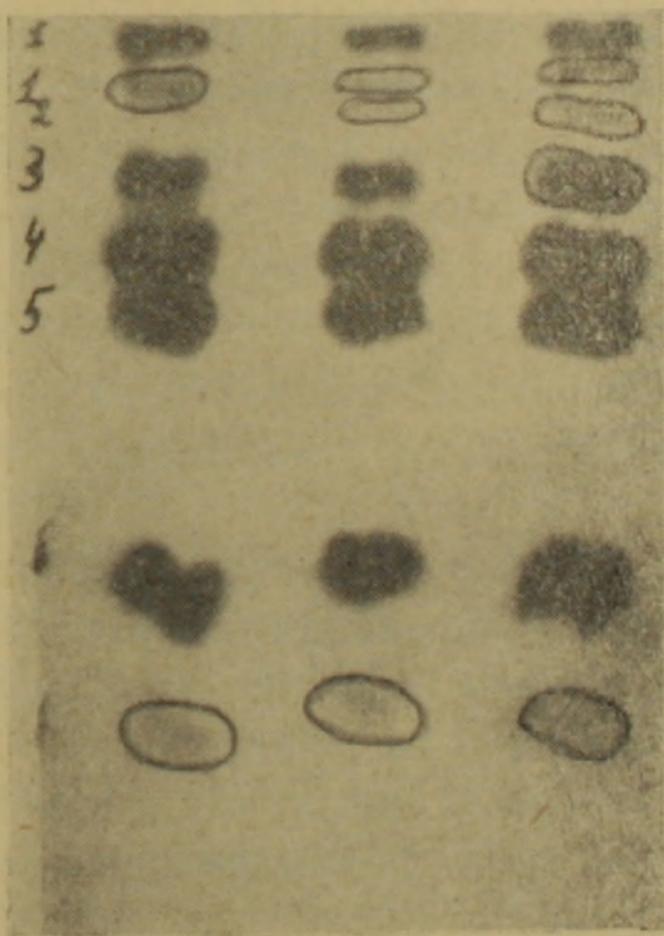


Рис. 1. Хроматограмма экстрактов гипоталамуса крыс. Хлорирование и выявление пятен бензидином. Выявились 7 пятен.

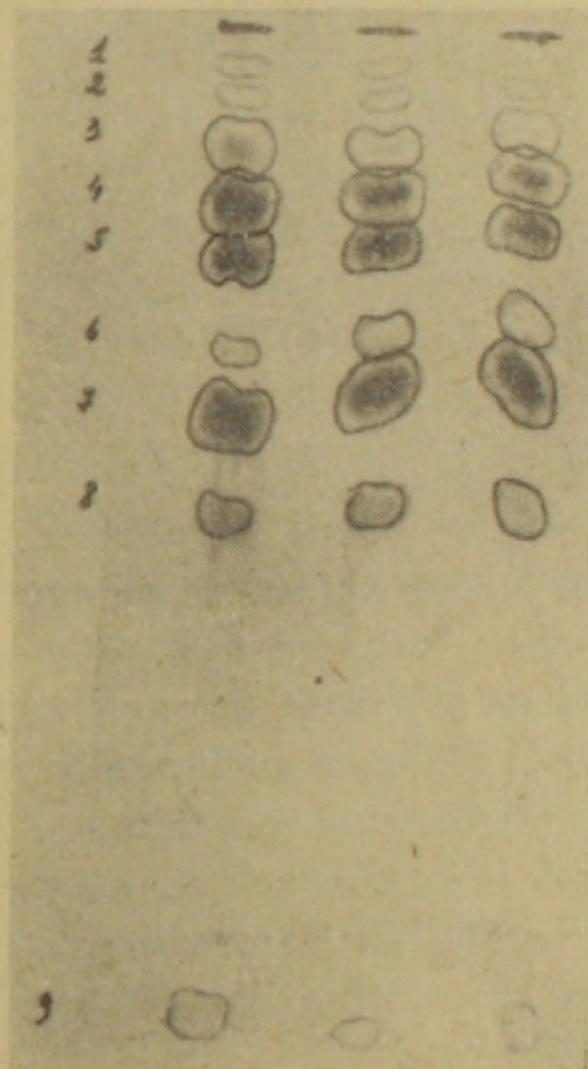


Рис. 2. Хроматограмма экстрактов гипоталамуса крыс. Та же реакция. Выявились 9 пятен.

На наш взгляд, по  $R_f$  и по биологическим активностям пятна 3, 4, 5, 6 хроматограммы I по порядку соответствуют пятнам 3, 4, 5, 7 хроматограммы II. В хроматограмме III, где проявилось 10 пятен, отмеченным

выше пятнам соответствуют пятна 5, 6, 7 и 9. Ввиду такого расхождения  $R_f$ , пятна при биологической идентификации этих фракций зачастую носят названия не всегда одного и того же номера. Нетрудно заметить, что отмеченные выше основные пятна окрашены весьма интенсивно и находятся весьма близко друг от друга (это касается в основном пятен 3, 4, 5 хроматограммы I и II и пятен 5, 6, 7 хроматограммы III). Указанное наводит мысль на то, что, по-видимому, в составе этих фракций могут содержаться еще новые фракции, которые могут выделиться от-

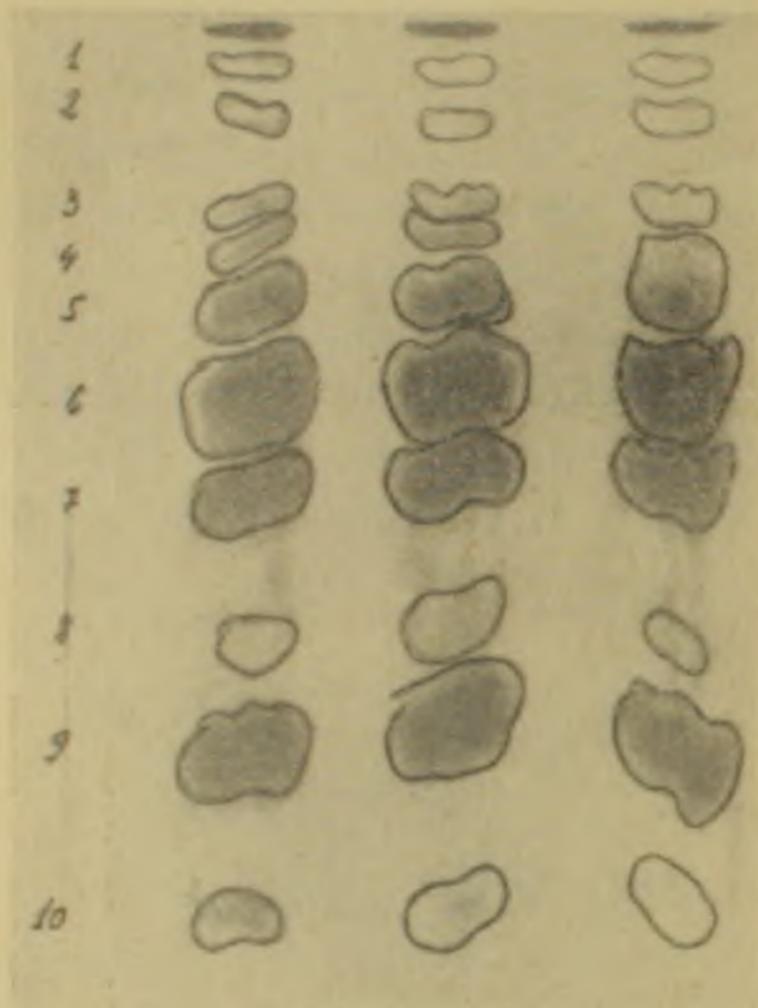


Рис. 3. Хроматограмма экстрактов гипоталамуса крыс. Реакция та же. Выявились 10 пятен.

дельно при повторном или двухмерном хроматографировании. Нами приводятся исследования дополнительного хроматографирования в одномерных и двухмерных системах каждой фракции в отдельности. Пятна 1 и 2—весьма маленькие по размеру и окрашены довольно бледно. Они по  $R_f$  совпадают друг с другом во всех трех указанных хроматограммах. Появление пятен 3 и 4 в хроматограмме III (которые, вероятно, отпочковывались от пятна 3 (хроматограмма I, II) отодвигало положение наших основных пятен—3, 4, 5 и соответственно 5, 6, 7.

Пятно 6 в хроматограмме II совпадает с пятном 8 в хроматограмме III. Это пятно должно быть в хроматограмме I между пятнами 5 и 6. Следует отметить, что несовпа-

дение номеров хроматографических пятен зависит от того, что не всегда выявляются пятна 1 и 2.

Таким образом, из гипоталамических экстрактов нам удалось получить 10 отдельных фракций, которые путем хлорирования и обработкой с бензидином или толуидином весьма отчетливо выявляются. Следует отметить, что количество выделившихся фракций из гипоталамуса как после обработки гомогената при  $90^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут, так и при обработке при комнатной температуре и  $0^{\circ}\text{C}$  и после лиофилизации почти совпадает.

На хроматограммах хорошо видно, что многие пятна весьма близки друг от друга, интенсивно окрашены и имеют тенденцию распределяться на отдельные фракции (хроматограмма III, пятна 3, 4, 5). С другой стороны, стартовая линия составляет довольно большую полосу, что говорит также о наличии других не выделенных фракций. И это понятно. В надосадочной жидкости могут остаться многочисленные соединения—аминокислоты, пептиды (в основном низкомолекулярные), нуклеопептиды, нуклеотиды (в основном низкомолекулярные), гликопротеиды,

ряд ферментов, амины, аминсахара, ацетилированные пептиды и т. д.). Если учесть также то обстоятельство, что метод хлорирования, указанный нами выше, может выявить все вещества, где только имеются СО-НН связи, то становится понятным наличие множества фракций в исследуемых экстрактах.

Учитывая то важное обстоятельство, что нейрогипофиз составляет как бы резервуар гормонов, идущих из гипоталамуса, а также то, что нейрогипофиз сам может быть секреторным органом, мы экстрагировали нейрогипофиз крысы таким же способом и нашли только три фракции, которые не оказались активными в отношении коронарного кровообращения. Однако эти данные не дали основания исключить наличие активных начал в нейрогипофизе, тем более, что в наших опытах мы имели дело с весьма малым количеством нейрогипофиза (1—2 мг).

Путем экстрагирования и хроматографирования нейрогипофизов быка мы выделили семь-восемь фракций. Проводятся исследования по идентификации этих фракций, могущие пролить свет на некоторые стороны рассматриваемого вопроса.

Влияние элюатов выделенных фракций на коронарное кровообращение. В одном из наших сообщений (Галоян А. А. [16]) мы уже отмечали, что нам удалось из экстрактов гипоталамуса крысы выделить две фракции, по-видимому, полипептидной природы, которые оказали специфическое влияние на коронарные сосуды. Одна из них суживает, а другая, наоборот, расширяет коронарные сосуды. В течение последних месяцев нами накоплены многочисленные данные, с одной стороны, полностью подтверждающие основные выводы, сделанные нами ранее, а с другой—дополняющие и расширяющие наши представления в этом направлении. В указанном первоначальном сообщении мы допускали возможность назвать выделенные нами эти фракции гормонами. Многочисленные данные показывают, что эти фракции в весьма малых количествах (в пределах 1—10 мкг) на целое животное (кошка) оказывают специфическое влияние на коронарные сосуды.

Приводим некоторые новые данные. Опыты показали, что коронаро-расширяющими свойствами обладает не только одна фракция, как это было высказано нами, но иногда и две. Эти фракции по  $R_f$  стоят очень близко друг от друга. Причем создается такое впечатление, что они являются аналогами и обладают некоторыми специфическими свойствами. Так, например, как видно из рис. 4, после внутривенного введения элюата пятна 3 количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, увеличивается. Расширение коронарных сосудов продолжается 2 часа и на третьем часу возвращается к норме. Затем мы вводили элюат второго пятна, после чего коронарный отток абсолютно не изменялся в течение 2 часов. Такая постановка опыта для нас послужила контролем.

Важно подчеркнуть, что после введения элюата третьего пятна наряду с явно выраженным увеличением объемной емкости крови, оттекающей из венозных синусов сердца, не наблюдается изменений в сер-

дечных сокращениях (амплитуда сердечных сокращений остается одной и той же). Увеличение же амплитуды сердечных сокращений наблюдается через 1,5 часа, т. е. тогда, когда основной эффект фракции начинает исчезать. Мы не могли заметить изменений пульса и дыхания. Почти не изменяется также кровяное давление. Указанные выше факты, на наш

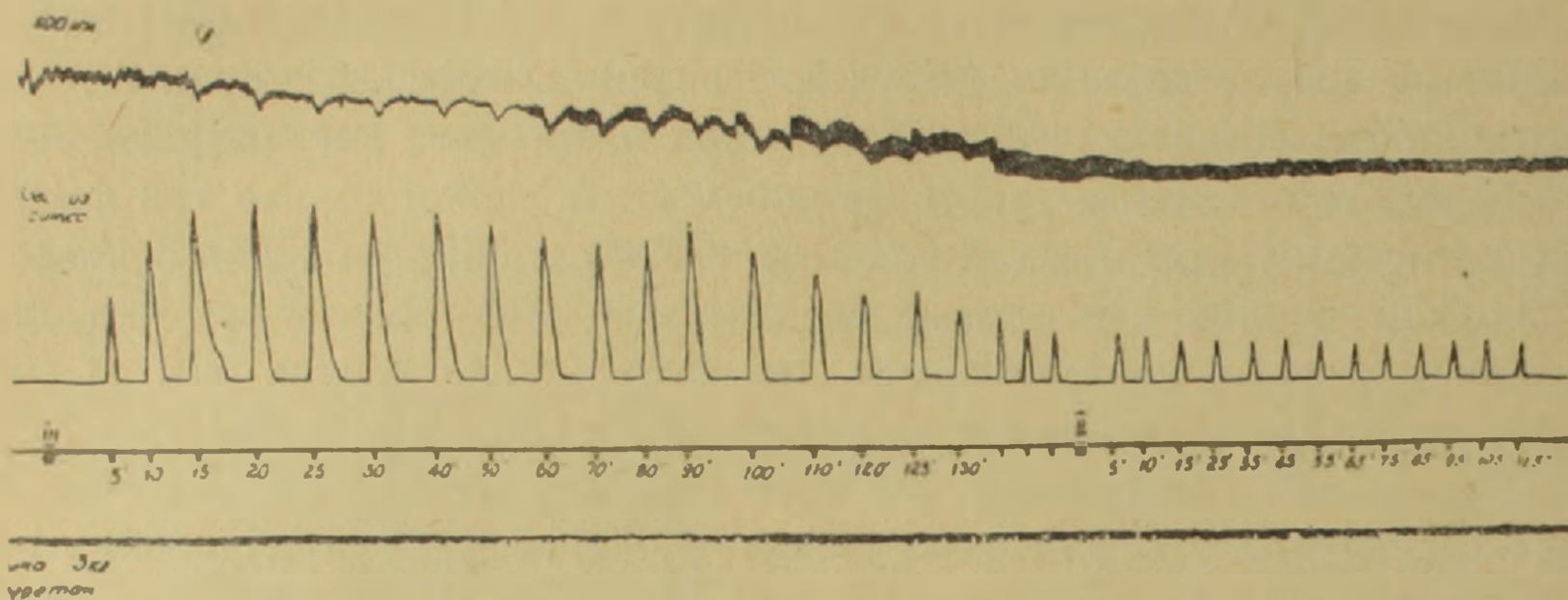


Рис. 4. Изменение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца кошки после введения фракции III и II. Обозначения сверху вниз: 1) кровяное давление, 2) кривая объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов, 3) время измерения объемной емкости, 4) время в минутах.

взгляд, говорят о том, что влияние введенного вещества на кровоток осуществляется не через изменение сердечных сокращений, т. е. не опосредственно, а скорее всего прямо через изменение коронарных сосудов сердца. Это обстоятельство имеет исключительно важное значение для понимания механизма влияния гормонов на коронарное кровообращение.

Другие наши опыты показали, что после введения элюата пятна 4 (рис. 5) постепенно начинают расширяться коронарные сосуды. Этот эффект достигает своего максимума на 140-й минуте. Если сравнить вы-

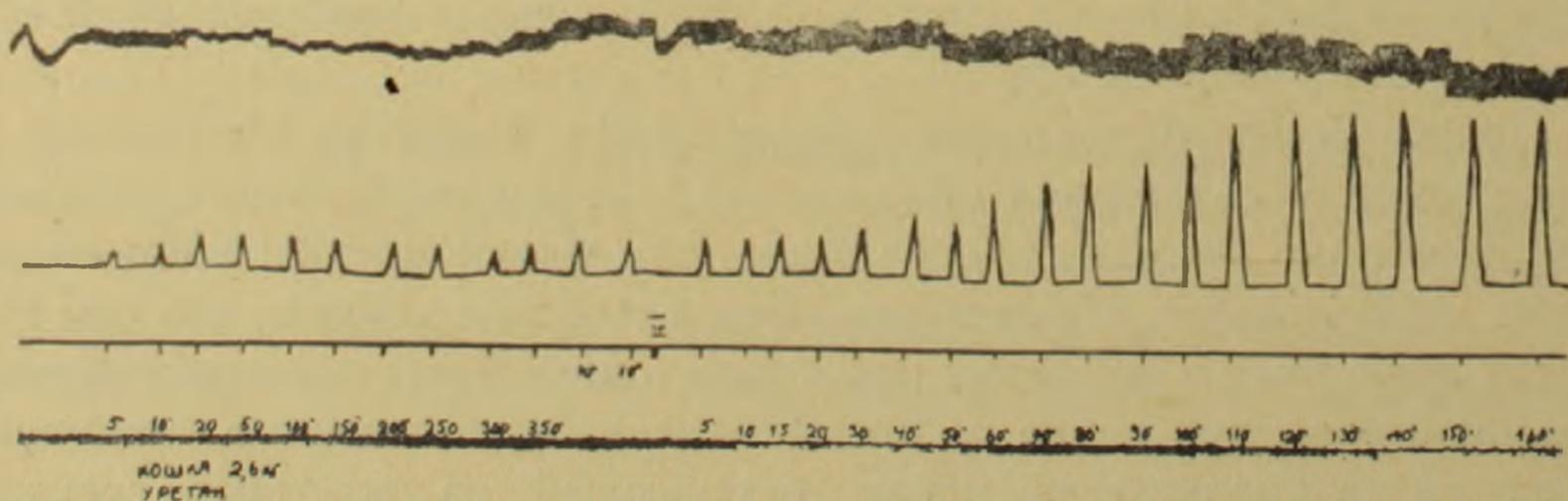


Рис. 5. Изменение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, после введения фракции II и IV. Обозначения те же.

соту амплитуды измеряемой объемной емкости крови, оттекающей из коронарных синусов, в норме и после введения элюата пятна 4, то на высоте максимального расширения коронарных сосудов сердца высота амплитуды в 4,5 раза длиннее нормы. Это говорит о том, что под влиянием отмеченного выше вещества кровотоки сердца в несколько раз уве-

личивается. На этом фоне кровяное давление держится в пределах нормы, дыхание не меняется. Но это вещество сразу после введения вызывает наряду с расширением коронарных сосудов и увеличение амплитуды сердечных сокращений. Следует отметить, что до введения элюата пятна 4 мы вводили также элюат пятна 2 и не нашли никаких изменений в коронарном кровотоке, а также изменений в поведении животных в течение более чем 350 минут (почти 6 часов).

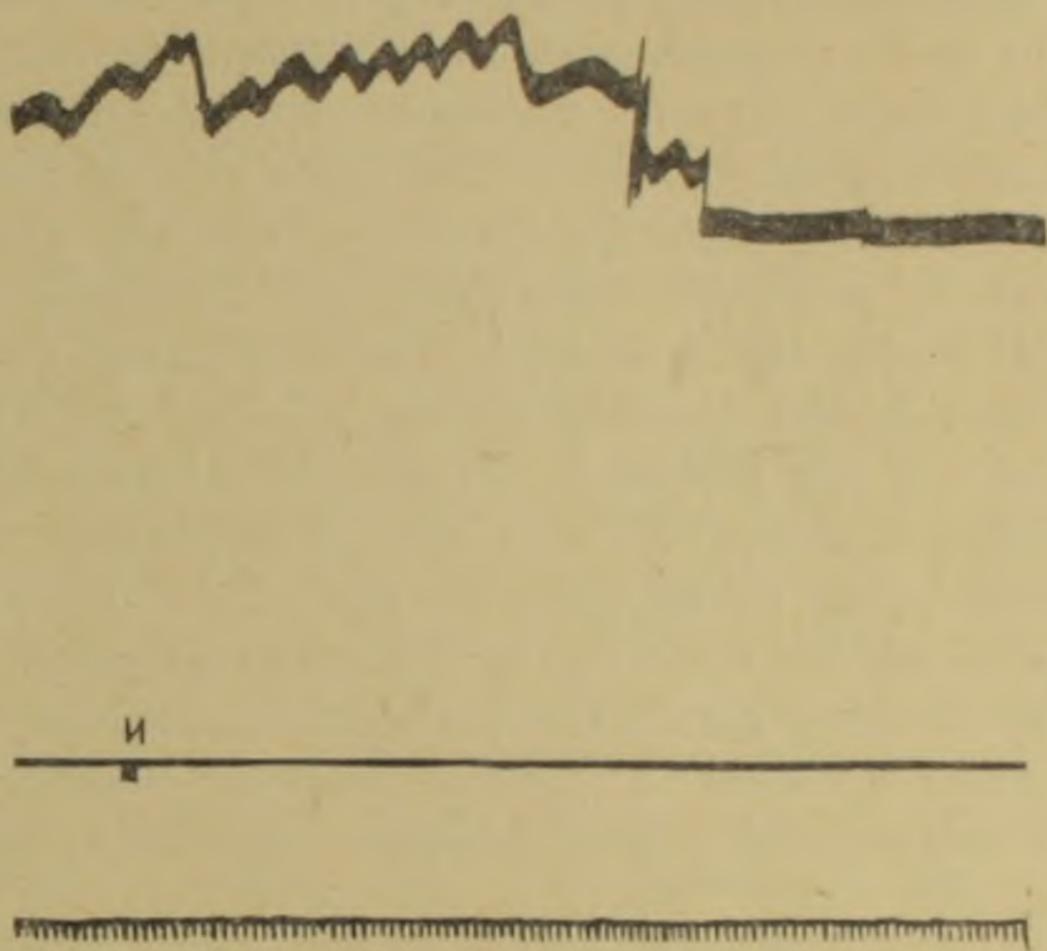


Рис. 6. Изменение тонуса коронарных сосудов после введения фракции IV. Обозначения те же.

Введение элюата пятна 4 вызвало постепенно нарастающее и явно выраженное расширение коронарных сосудов. Отмечалось улучшение ритма и увеличение силы сердечных сокращений, оживление организма. Животное в общем находилось под операцией почти 9 часов.

Важно подчеркнуть, что во всех опытах, независимо от индивидуальности подопытных животных, мы всегда наблюдали этот эффект. Таким образом, мы глубоко убедились, что обнаруженные нами фракции являются мощными биологически активными соединениями типа гормонов, оказывающими специфическое влияние на коронарное кровообращение.

Известно, что наиболее важным критерием для суждения о состоянии коронарного кровообращения, наряду с определением объемной скорости коронарного кровотока является определение сопротивления сосудов сердца току крови. Эти два метода дополняют друг друга.

На специальных опытах мы исследовали состояние тонуса коронарных сосудов под влиянием элюатов пятен 3 и 4. Эти опыты полностью подтвердили предположение о том, что происходит именно расширение коронарных сосудов, падение тонуса сосудов. Как видно из рис. 6, после

введения элюатов пятен 3 и 4 тонус коронарных сосудов ступенчато падает, и долгое время кривая держится на низком уровне. Важно заметить, что эффект повышения амплитуды измеряемой объемной емкости оттока крови совпадает с эффектом падения тонуса коронарных сосудов.

**Кровяное давление и дыхание.** Многочисленные наши наблюдения показали, что во время опыта через определенный период кровяное давление обнаруживает некоторую тенденцию к падению. Это обусловлено тем, что открытие грудной клетки, вставление канюль на *v. femoralis*, *a. carotis*, а также перфузия сердца, сопровождаются постепенной потерей крови. Но не была исключена возможность, что испытанные нами фракции также могли служить причиной падения кровяного давления. Для выяснения этого вопроса мы ставили опыты на наркотизированных кошках без открытия грудной клетки и без перфузии. Была поставлена только канюля на *a. carotis* (для измерения кровяного давления и в *v. femoralis* (для введения вещества). Таким образом, были исключены все условия спонтанного падения кровяного давления. После введения элюатов пятен 2, 3 и 4, никаких отклонений кровяного давления от нормы не обнаруживается. За весь период испытания препаратов не обнаруживается также никаких отклонений в дыхании. Таким образом, опыты показали, что эти вещества не действуют на кровяное давление и соответственно не могут быть одной из вероятных причин изменения коронарного кровообращения. С другой стороны, лишней раз подтверждается, что обнаруженные нами активные соединения не являются возопрессином.

**Окситопическая активность.** Опыты показали, что после введения в инкубируемую жидкость элюатов пятен 3 и 4 спонтанные сокращения рога матки девственной морской свинки и крыс не только не усиливаются, но, наоборот, в некоторых случаях полностью прекращаются.

### Некоторые данные о природе выделенных нами фракций

В методической части мы уже отметили, что для выяснения некоторых сторон природы выделенных фракций мы обрабатывали гомогенаты разведенными растворами уксусной кислоты при 90°C в течение 30 минут. В этих случаях должны денатурироваться белки, а также ряд ферментов. После обработки элюаты хроматографических пятен показывают высшую биологическую активность в отношении коронарного кровообращения. Интересно, что и при обработке при 90°C и без этой обработки мы обнаруживаем наличие пятен в одинаковых количествах. Таким образом, можно сказать, что эти активные начала не являются белками или крупными полипептидами. Для подтверждения этого положения, а также для выяснения приблизительной величины молекул выделенных фракций, мы ставили диализ. Диализу подвергли чистые надосадочные жидкости гомогенатов как после температурной, так и без температурной обработки с лиофилизацией и без нее. Предварительные опыты показали, что после диализа против подкисленной дистиллирован-

ной воды все фракции выходят из полупроницаемой мембраны, и реакция на окрашивание пятен оказывается отрицательной.

Эти данные показывают, что мы имели дело с некрупными молекулами безбелковой природы. Учитывая также то, что элюаты приготовлялись в 0,85% растворе NaCl, можно с уверенностью сказать, что обнаруженные нами активные фракции являются также водорастворимыми.

### Влияние гистамина на активность коронарорасширяющей фракции гипоталамуса

Нами накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о том, что между нейросекреторным гормонообразованием гипоталамо-нейрогипофизарной системы и нейрогуморальными агентами существует глубокая функционально-биохимическая связь (Галоян [1—10]). Мы полагаем, что нейросекрет и содержащиеся в нем гормоны являются промежуточным звеном влияния нервных импульсов на гормонопоезд аденогипофиза. Под влиянием же гистамина [16] мы получали эффект полного исчезновения нейросекреторных гранул из гипоталамических нейросекреторных клеток, а также из нейрогипофиза крысы. Учитывая то обстоятельство, что активные начала выделились из нейросекреторных ядер гипоталамуса, мы задались целью изучить возможную связь выделенных нами веществ с нейрогуморальными агентами и, в частности, с гистамином, а также связь этих фракций с нейросекреторными гранулами гипоталамуса. опыты показали, что после введения крысам в а. саготис гистамина в дозах, вызывающих резкое уменьшение нейросекреторных гранул в гипоталамо-нейрогипофизарной системе, выделенные из гипоталамуса этих животных фракции не оказывают характерного влияния на коронарное кровообращение.

Выяснение природы выделенных нами активных начал, а также специфических сторон влияния гистамина на эту группу веществ, прольют свет на эти сложные процессы. Эти же данные бесспорно говорят о том, что нейрогуморы оказывают влияние на активность выделенных веществ и, вероятно, имеют определенное взаимоотношение с нейрогуморами в гипоталамусе.

Для решения места и функционального значения обнаруженных нами активных соединений в нейрогуморальных взаимоотношениях следует выяснить ряд сложных проблем. Надо решить вопрос о том, попадают ли эти нейрогормоны в кровь, проницаем ли гематоэнцефалический барьер в отношении этих нейрогормонов и через какие механизмы они могут выделиться и оказать влияние на коронарное кровообращение.

Речь идет о том, чтобы выяснить, каким путем, нервным или гуморальным, осуществляется транспорт этих активных соединений. Это представляет чрезвычайно большой интерес, так как многие проблемы нейрогуморальной регуляции коронарного кровообращения в значительной степени остаются нерешенными.

Как было видно из фактического материала, одна фракция (III) оказывает коронарорасширяющее влияние, не оказывая влияния на сердечные сокращения (пульсовое давление), в то время как фракция IV одновременно с расширением коронарных сосудов увеличивает сердечные сокращения.

В отношении влияния фракции III можно сказать, что она действует на коронарные сосуды прямо. Но для окончательного выяснения этого вопроса нужно будет провести дополнительные опыты. Возможность прямого влияния на коронарные сосуды фракции III не исключена, если учесть наличие хеморецепторов в самих венечных сосудах [17]. Доказана возможность образования коронарного хеморефлекса [18]. Опыты Сентивани и его сотрудников показали локализацию хеморецепторов в венозном синусе сердца [18].

Наличие же специальных нервных путей, оказывающих специфическое влияние на коронарные сосуды, берется под сомнение [19].

Есть противоречивые данные о влиянии блуждающего и симпатического нервов на коронарное кровообращение, и это, в частности, потому, что каждый из них содержит как адренэргические, так и холинэргические волокна с разными механизмами и характером действия на коронарные сосуды. Существуют ли истинные коронаросуживающие или коронарорасширяющие волокна,—пока что остается не вполне выясненным. К тому же следует отметить, что коронарорасширяющее влияние тех или иных нервов можно объяснить не прямым влиянием на коронарные сосуды, а экстракардиальными факторами (падение кровяного давления). Существуют ли истинные коронаросуживающие или коронарорасширяющие адренэргические волокна,—еще нельзя считать выясненным.

Приводимыми нами литературными данными мы отнюдь не склонны противопоставлять нервное влияние гуморальному.

Предпринятые нами широкие исследования по выяснению химической природы выделенных нами нейрогормонов, их роли в норме и патологии, а также связи этих гормонов с метаболизмом нейрогормональных агентов организма, дадут возможность уточнить ряд спорных положений.

### В ы в о д ы

1. Из гипоталамуса крысы выделены 8—10 фракций, из которых 2—3 оказывают специфическое влияние на коронарное кровообращение. В весьма малых количествах одни суживают, а другие (2 фракции) расширяют коронарные сосуды.

2. Одна из фракций (фракция III) расширяет коронарные сосуды сразу (через 1—2 минуты) после введения элюатов внутривенно и доводит расширение до максимума на 120-й минуте. Затем происходит постепенное возвращение к норме. Коронарорасширяющее влияние этой фракции не сопровождается изменением систолического давления. На основании этих данных можно полагать, что, вероятно, данная фракция оказывает прямое влияние на коронарные сосуды.

3. Фракция IV оказывает медленное коронарорасширяющее влияние; выраженный эффект наступает через 25 минут и достигает своего максимума через 3 часа (амплитуда измеряемой объемной емкости крови в 4—5 раз превышает норму). Этот эффект продолжает оставаться в течение долгого времени.

При расширении коронарных сосудов под влиянием фракции IV с самого начала наблюдается усиление сердечных сокращений.

4. При введении фракции III и IV наблюдается резкое падение тонуса коронарных сосудов, которое во времени совпадает с изменениями объемной емкости коронарных сосудов.

5. После диализа экстракта гипоталамуса против дистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой (рН—3—4), все фракции исчезают. Эти данные говорят о том, что выделенные нами фракции являются веществами низкомолекулярными.

6. Опыты ясно показали, что коронарорасширяющие активные начала термостабильны и полностью сохраняют свое влияние, если элюат сохранить в течение нескольких суток.

7. Элюаты, приготовленные в изотоническом растворе, оказывают влияние на коронарные сосуды, что свидетельствует о растворимости этих веществ в воде.

8. После введения гистамина в сонную артерию в дозах, оказывающих характерное влияние на нейросекрецию гипоталамо-нейрогипофизарной системы, выделенные активные фракции из гипоталамусов крыс не оказывают характерного влияния. Время сосудорасширяющего влияния, а также амплитуда измеряемой объемной емкости венозной крови, сокращается. Эти данные наводят мысль на то, что между нейрогуморальными агентами и выделенными нами активными соединениями существует, по-видимому, функционально-биохимическая связь.

9. Результаты наших исследований показывают, что в гипоталамусе наряду с известными нейрогуморальными агентами и полипептидными гормонами существуют, по-видимому, другие активные начала, которые могут иметь важное значение в гуморальной регуляции коронарного кровообращения.

Институт биохимии  
АН АрмССР

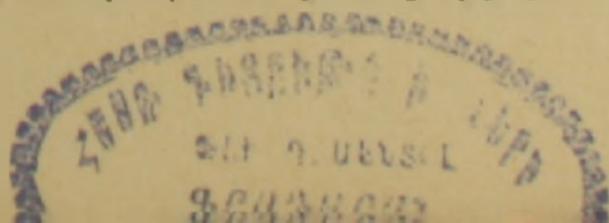
Поступило 17.1 1963 г

Ա. Ա. ԳԱԼՅԱՆ

ՀԻՊՈՒԱԼԱՄՈՆԵՅՐՈՀԻՊՈՖԻԶԱՐ ՄԻՍՏԵՄԻՑ ՆՈՐ ԲԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ  
ԱԿՏԻՎ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱՆՁԱՏՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո ս մ

Մեր նախորդ հետազոտություններից պարզվել է, որ հիպոթալամո-նեյրոհիպոֆիզար սիստեմում, բացի հայտնի հորմոններից՝ վազոֆրեսինից, օր-սիտոցինից, գոյություն ունեն նաև ինչ-որ ուրիշ նյութեր: Կիրառելով էքստրակցիայի և խրոմատոգրաֆիայի նոր եղանակներ, մեզ հաջողվեց այդ սիստե-



մից անջատել 8—10 ֆրակցիաներ, որոնցից հրկու-երեքն ունեն յայտուն արտահայտված բիոլոգիական ակտիվություն: Ֆրակցիաներից մեկը խիստ լայնացնում է, իսկ մյուսը նեղացնում սրտի պսակաձև անոթները:

Արյան ճնշումը և շնչառությունը չեն փոփոխվում: Մենք ստորերում ենք պսակաձև անոթները լայնացնող հրկու ֆրակցիաներ. նրանցից մեկը դանդաղորեն լայնացնում է անոթները՝ սրտի երակային անոթներից դուրս եկող արյան քանակը հասցնելով 100—200, հրբեմն էլ 300—400% -ի: Այդ էֆեկտը շարունակվում է 3—4 ժամ և ավելի: Միաժամանակ սրտի կծկումներն ուժեղանում են: Մյուս ֆրակցիան, լայնացնելով անոթները (2,5 ժամ), չի ուժեղացնում սրտի մկանների կծկումները: Ցույց է տրված, որ ակտիվ նյութերը ջերմակայուն են, անցնում են կիսաթափանցիկ թաղանթով և լուծելի են ջրում:

Նախնական փորձերը ցույց են տալիս, որ նշված նյութերը պոլիպեպտիդային կամ նուկլեոպեպտիդային բնույթի են:

Փորձերը ցույց տվեցին, որ ստացված նյութերը որոշակի կապ ունեն հիպոթալամուսի նեյրոսեկրետոր գործունեության հետ, քանի որ հիստամինի ներարկումից հետո քնային զարկերակի մեջ (երբ նկատվում է նեյրոսեկրետի քանակի խիստ պակասում հիպոթալամո-նեյրոհիպոֆիզար սիստեմում) նրշված նյութերն զգալիորեն կորցնում են իրենց ակտիվությունը:

Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ անջատված նյութերը նոր նեյրոհորմոններ են, որոնք կապ ունեն ուղեղում նեյրոհումորների գործունեության հետ:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Известия АН АрмССР, 12, 25 (биол. науки), 1959.
2. Галоян А. А. Известия АН АрмССР, 13, 61 (биол. науки), 1960.
3. Галоян А. А. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, 6, 46, 1960.
4. Галоян А. А. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, 5, 37, 1959 (сообщение 1).
5. Галоян А. А. Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, 1962 (в печати).
6. Галоян А. А. Вопросы биохимии, 2, 47, 1961.
7. Галоян А. А. Тезисы III Закавказского съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, Баку, 1962.
8. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 4, 165, 1962.
9. Галоян А. А. Вопросы биохимии нервной системы, под редакцией Палладина. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1962.
10. Галоян А. А. Вопросы биохимии, 2, 39, 1961.
11. Rydon H. N., Smith P. W. G. Nature, 169, 923, 1952.
12. Reidel F. and Hoppe W. Ber. deutsch. chem. ges., 87, 1103, 1954.
13. Heller H., Lederis K. Nature, 182, 1231, 1958.
14. Каверина Н. В. Фармакология и токсикология, 1, 39, 1958.
15. Хаятин В. М., Дончаков В. М. и Цатуров В. Л. Бюллетень эксперим. биол. и мед., 2, 117, 1958.
16. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 34, 109, 1962.
17. Dietrich A. Dtsch. med. wchschr., 39, 1181, 1952.
18. Iuhasz-Nagy A. and Szentivanyi M. Arch. int. pharmacodyn, 131, 39, 1961.
19. Winburg M., Green D. J. physiol. 170, 555, 1952.