

О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ КАРДИОАКТИВНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТАС. С. МИСИРЯН, Р. М. СРАПИОНЯН, М. Б. БХЕЯН
Г. А. САРИБЕКЯН, А. А. ГАЛОЯН

При изучении некоторых физико-химических свойств 3-х кардиоактивных соединений, выделенных из сердечной мышцы крупного рогатого скота, выяснилось, что они не поглощают ультрафиолетовых лучей, ингибированы и не дают окраски при хлорировании. Эти соединения сохраняют биологическую активность при всех видах гидролиза и проявляют способность ингибировать фосфодиэстеразу цАМФ головного мозга. Полученные данные дают возможность предположить о сходстве коронароактивных соединений, выделенных из сердца с нейрогормоном «С».

Нами было установлено наличие ряда кардиоактивных соединений в гипоталамусе различных животных [3, 5]. Оказалось, что некоторые вещества М-холиномиметического ряда при их центральном введении высвобождают эти соединения, в частности нейрогормоны К и С, из мозга в кровь, где они связываются с белковыми фракциями сыворотки—альбуминами и γ -глобулинами [7]. Не исключалась также возможность транспорта этих соединений к органу мишени—сердцу. Основанием для такого рода предположения послужило выявление некоторых коронароактивных соединений в сердечной мышце [9].

В этом аспекте представляло интерес получение доказательства идентичности этих низкомолекулярных коронарорасширяющих веществ сердца с нейрогормонами К и С, что явилось бы подтверждением их кардиотропности.

В настоящей работе приведены данные о выделении и характеристике 3-х коронарорасширяющих соединений из сердечной мышцы крупного рогатого скота.

Материал и методика. Из сердечной мышцы крупного рогатого скота выделяли низкомолекулярные вещества по методу, описанному Галояном [4]. Гель-фильтрацию проводили на колонке с сефадексом G-10 (2×39), предварительно уравновешенной аммоний-ацетатным буфером, рН 4. Элюцию проводили вышеуказанным буфером со скоростью 20 мл/час. Активные в отношении коронарного кровообращения фракции подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии на колонке ДЭАЭ-целлюлозы (2×39), используя градиентную элюцию по следующей схеме: фосфатный буфер 0,005 М, рН 6,5, фосфатный буфер 0,02 М, рН 5,9, фосфатный буфер 0,1 М, рН 5,

0,02 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

0,1 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

0,5 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, pH 5.

Скорость элюции 40 мл/час. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) и пиридин—ацетат—вода (1:10:100). Хроматограммы окрашивали 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Для обнаружения циклических пептидов хроматограммы выдерживали в атмосфере газообразного хлора, опрыскивая 1%-ным раствором растворимого крахмала, содержащим 1%-ный йодистый калий, по методу Райдона и Смита [2]. Кардиотропную активность фракций определяли по изменению коронарного кровотока—объемную емкость крови—по известному методу [10]. Оптическую плотность полученных фракций при 230, 250, 260, 280 нм регистрировали на спектрофотометре СФ-4А и Unicam SP-800. Ферментативный гидролиз проводили трипсином и химотрипсином из расчета 250 и 125 мкг/мл соответственно в растворе Тироде, pH 8,4, в течение 6 час, щелочной—1 Н раствором NaOH (pH 8,1) в течение 6 час., кислотный—в 6 Н HCl в течение 24 час. при 105°. Под воздействием коронароактивных фракций, выделенных из сердца, определяли активность фосфодиэстеразы (ФДЭ) по количеству гидролизованного субстрата 3',5'-аденозинмонофосфата—(цАМФ) в процессе его инкубации с ферментом. О гидролизе цАМФ судили по падению радиоактивности ³HцАМФ, использованного в качестве маркера [8]. В работе применяли метод Пеха [11], модифицированный применением микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «СИЛУФОЛ UV-254» [1]. В качестве основных материалов использовали цАМФ фирмы Buchs SC (Швейцария); ³HцАМФ с удельной активностью 22,1 кюри/мМ—New England Nuclear (США); 5-АМФ—Reanal (Венгрия) и пластины «СИЛУФОЛ UV-254»—Kavalier (Чехословакия).

Результаты и обсуждение. Выделение и очистка коронароактивных низкомолекулярных соединений. Ранее было показано наличие двух коронароактивных начал в сердечной мышце [9]. Нам удалось обнаружить третье активное начало, обладающее отличной от первых двух величиной Rf-распределительной хроматографии на бумаге. О наличии ряда кардиоактивных соединений в сердечной мышце свидетельствует профиль их элюции при гелевой фильтрации через сефадекс G-10 (рис. 1, 2). Коронарорасширяющие начала были сосредоточены в элюатах I, II и III пиков. Результаты исследований показали, что I коро-

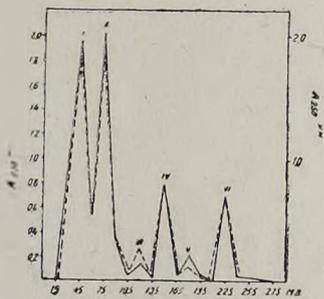


Рис. 1.

Рис. 1. Профиль элюции коронароактивных соединений сердца после гелевой фильтрации на сефадексе G-10. — на волне 230 нм. — — — на волне 250 нм.

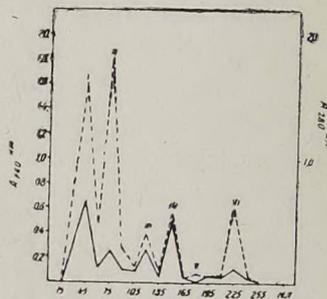


Рис. 2.

Рис. 2. Профиль элюции коронароактивных соединений сердца после гелевой фильтрации на сефадексе G-10. — на волне 280 нм. — — — на волне 260 нм.

нароактивная фракция, вышедшая в I пике (условно обозначенная как I активность), при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе элюируется единым пиком (рис. 3). Дальнейшая очистка этой фракции была осуществлена методом распределительной хроматографии на бумаге. Что касается остальных двух фракций, вышедших во II и III пиках (условно обозначенные нами как II и III активности), то они

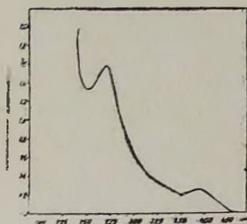


Рис. 3. Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе I коронароактивной фракции.

ввиду малых количеств очищались только путем хроматографии на бумаге.

Биологическое испытание элюатов коронароактивных фракций показало, что указанные соединения несколько различаются. Через 20 мин после внутривенного введения I активной фракции отмечается увеличение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 200%, которое достигает максимума на 180-й мин. При этом наблюдается картина постепенного нарастания коронарорасширяющего эффекта, что характерно для нейрогормона С. При введении II и III активных фракций наблюдается более длительный латентный период—40 мин, и объемная емкость крови увеличивается лишь на 100—120% по сравнению с нормой.

После распределительной хроматографии на бумаге этих активных начал в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода 4:1:5 оказалось, что I активная фракция имеет величину R_f —, равную 0,35, II и III—0,52 и 0,05 соответственно. Интересно то, что все 3 коронарорасширяющие фракции, подобно нейрогормону С, сохраняли биологическую активность при всех видах гидролиза (ферментативного, щелочного, кислотного) [6]. Однако после кислотного гидролиза этих фракций оказалось, что они перемещаются, приобретая одну и ту же величину R_f —распределительной хроматографии, а именно 0,35, одновременно меняя параметры фармакологического воздействия. В частности, отмечается увеличение амплитуды, продолжительности действия и нарастание коронарорасширяющего эффекта, характерные для нейрогормона С. Это явление нельзя объяснить однозначно до выяснения первичной структуры этих веществ. Однако очевидно, что при кислотном гидролизе от кардиоактивных соединений отщепляется часть молекулы, обуславливая тем самым изменение коэффициента распределения на хроматограмме. Одинаковая величина R_f —всех 3-х фракций после кислотного гидролиза свидетельствует о наличии общего активного фрагмента, который не теряет своей биологической активности. С ним, по-видимому, связана специфика коронарорасширяющего эффекта.

При исследовании хроматограмм оказалось, что они не поглощали ультрафиолетовых лучей и одновременно были нингидринотрицательны. Известно, что циклические пептиды, сильно кислые или ацетилированные, вовсе не окрашиваются нингидрином или окрашиваются очень слабо. Поэтому мы дополнительно провели хлорирование хроматограмм по методу Райдона и Смита. Однако и этот метод не дал положительных результатов. Аналогичные данные были получены при исследовании химических свойств нейрогормона С. Сходство отмечено и в действии этих соединений на фосфодиэстеразу (ФДЭ) циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (ц 3',5'-АМФ). Ранее было обнаружено, что

Таблица

Изменение активности ФДЭ гомогената мозга крысы под действием коронарорасширяющих фракций, выделенных из сердца крупного рогатого скота

Фракции	Количество гидролизованного субстрата		Степень ингибции	Активность, ед/1 мл
	контроль	опыт		
I	74,4	3	70,4	4,6
II	80,8	26,8	54,0	3,5
III	79,8	29,8	50,0	3,25

За единицу активности принимали такое количество препарата которое ингибировало 1 миллиединицу цАМФ фосфодиэстеразы мозга за 1 мин.

под влиянием нейрогормона С ФДЭ гомогената сердца ингибируется на 24, в то время как ФДЭ гомогената мозга—на 81% по отношению к контролю [8]. Мы изучали влияние всех трех кардиоактивных соединений, полученных из сердца, на ФДЭ ц 3',5'-аденозинмонофосфата гомогената мозга. Как видно из таблицы, коронароактивная фракция ингибировала ФДЭ гомогената мозга на 70,4% по сравнению с нормой, что соответствует 4,6 единицам активности/мл данного элюата, II—на 54% (3,5 ед/мл) активности, III—на 50% (3,25 ед/мл). При тех же стандартных условиях опыта нейрогормон С проявлял активность, равную единице. Аналогичное действие нейрогормона С и коронароактивных соединений, выделенных из сердца, на уровень цАМФ в мозге, свидетельствует об их сходстве в механизме действия.

Расшифровка химической природы и структуры указанных соединений позволит выяснить идентичность их нейрогормону С.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 10.I 1979 г.

ԽՈՇՈՐ ԵՂՋԵՐԱՎՈՐ ԱՆԱՍՈՒՆՆԵՐԻ ՍՐՏԱՄՎԱՆԻՑ ԱՆՁԱՏՎԱՄ
ՊՍԱԿԱԶԵՎ ԱՆՈԹՆԵՐԸ ԴԱՅՆԱՑՆՈՂ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ՈՐՈՇ
ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ս. Ս. ՄԻՍԻՐՅԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Մ. Տ. ԲԵՅՅԱՆ,
Գ. Ա. ՍԱՐԻԲԵԿՅԱՆ, Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Խոշոր հղջերավոր անասունների սրտամկանից անջատվել են պսակաձև անոթները լայնացնող երեք նյութեր, որոնք շունեն բնորոշ սպեկտր ուլտրա-մանուշակագույն ճառագայթների զոնայում և նինհիդրին դրական են:

Կարդիոակտիվ նյութերը թթվային, հիմնային և ֆերմենտատիվ հիդրո-լիզից հետո չեն կորցնում իրենց կենսաբանական ակտիվությունը: Նրանք ճնշում են ուղեղի ցիկլո-ԱՄՖ-ի ֆոսֆոդիէսթերազայի ակտիվությունը:

Վերոհիշյալ ավյալները թույլ են սալիս ենթադրելու, որ սրտից անջատ-ված նյութերն իրենց ֆիզիկա-քիմիական և կենսաբանական հատկություննե-րով նման են նեյրոհորմոն C-ին:

ON SOME PROPERTIES OF CARDIOACTIVE COMPOUNDS
OF THE CATTLE HEART MUSCLE

S. S. MISIRIAN, R. M. SRAPIONIAN, M. B. BCSHEIAN,
G. A. SARIBEKIAN, A. A. GALOYAN

Three cardioactive compounds have been isolated from the cattle heart muscle. It has been found that these compounds do not absorb ultraviolet rays, that they are ninhydrine negative and are not painted at chlorination. The compounds maintain their biological activity at all kinds of hydrolize and inhibit PDE cAMP of brain homogenate.

The conclusion is made that the compounds are alike the neurohor-mone "C".

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. А. Вопросы медицинской химии, 28, 2, 9, 1975.
2. Бэйли Дж. Методы химии белков, под ред. Браунштейна А. А., 1965.
3. Галоян А. А. В кн.: Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965.
4. Галоян А. А. Авторское свидетельство № 403214 (по заявке № 1208585, 1968).
5. Галоян А. А. Тез. докл. Всесоюзной конференции, посвященной 70-летию со дня рождения Х. С. Коштоянца, Ереван, 1971.
6. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Алексанян Г. Г. ДАН АрмССР, 51, 2, 1970.
7. Галоян А. А., Оганян М. В., Геворкян Г. Г. ДАН АрмССР, 53, 4, 1971.
8. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А. Вопросы биохимии мозга. 11, 1976.
9. Срапионян Р. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 56, 3, 1973.
10. Morawitz P. Z. and Zhan A. Dt. Arch. Klin. med. 116, 364, 1914.
11. Pösch G. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. 268, 272, 1971.