

УДК 577.175.52+577.175.73+577.175.82/85

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕННОГО ФАКТОРА И СПОСОБА ХРАНЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРДИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Р. М. СРАПИОНЯН, С. С. МИСИРЯН, С. С. АБРАМЯН, Л. А. ГРИГОРЯН,
Т. В. ПОПОВА, З. Х. ПАРОНЯН, А. А. ГАЛОЯН

Исследованы некоторые биохимические, биологические и физико-химические свойства кардиоактивных соединений гипоталамуса и сердечной мышцы крупного рогатого скота. Показано, что основные биологические и биохимические свойства их не подвергаются заметным изменениям при хранении этих препаратов на протяжении 5-ти лет.

Ключевые слова: нейрогормон, кардиоактивные соединения, фосфодиэстераза цАМФ мозга.

Нами накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о наличии группы кардиоактивных соединений в сердечной мышце некоторых животных [7, 9, 10]. Одно из этих соединений, как было установлено при масс-спектральном анализе, является структурным аналогом нейрогормона *C* [8], обнаруженного ранее в гипоталамической части мозга [2], функциональной особенностью которого являлось регулирующее влияние на сердечную деятельность и коронарное кровообращение [3]; при этом не исключалась возможность прямого влияния. Предпосылкой этого были данные относительно его непосредственного воздействия на изолированные клетки сердечной мышцы в культуре ткани [16]. Становилась возможной постановка вопроса о рецепции нейрогормона *C* в сердечной мышце, являющейся для него органом-мишенью. Логичность допущения вполне оправдалась обнаружением в сердечной мышце белка, связывающего указанное соединение [11].

Многолетние исследования, проводимые нами в области сравнительного изучения биологических, биохимических и физико-химических свойств гипоталамического кардиоактивного нейрогормона *C* и подобных ему соединений в сердечной мышце, выявили их сходство по многим параметрам. Весьма своеобразным среди них является высокая стабильность к щелочам, кислотам и температурным воздействиям с сохранением нативной биологической активности. Как было выяснено впоследствии, решающая роль в описанной резистентности принадлежит углеводному компоненту, который, по-видимому, определяет также функциональную значимость нейрогормона *C* и подобных ему соединений [12].

Особый интерес, на наш взгляд, представляет выяснение срока хранения кардиоактивных соединений, в частности, остается невыясненным вопрос об изменении их функциональных свойств (способность расши-

рять коронарные сосуды и ингибировать фосфодиэстеразу циклического аденозинмонофосфата (ФДЭ цАМФ) при длительном хранении. В связи с этим в 1973—1982 гг. нами проводились опыты по сравнительному изучению описанных свойств. Основные результаты этих исследований обобщены в настоящем сообщении.

Материал и методика. Гель-фильтрацию низкомолекулярных соединений проводили на колонке с сефадексом G-10, размерами 2×39 и 1×50 см, фракции собирали на коллекторе типа SF-62 (ЧССР). Скорость элюции 10—40 мл/ч, в качестве элюирующего буфера применяли аммоний-ацетатный буфер, pH 4, а в случае использования глицинамидированного сефадекса—бидистиллированную воду, pH 5,5, которые подавались микропососом типа 6017 (ЧССР). В качестве маркера использовали 0,01%-ный раствор голубого декстрана. Реакция глицинамидирования велась по методу Крэга и сотр. [15] с нашими изменениями [4]. Ионообменную хроматографию проводили на ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,05 М Na-фосфатным буфером, pH 6,5. Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме, где значительный градиент концентрации соли сочетался с небольшим понижением буфера от pH 6,5 до 5 [5]. Скорость элюции составляла 10—40 мл/ч в зависимости от цели эксперимента. Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5).

Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Моравитца и Цана [17].

Активность ФДЭ цАМФ гомогената мозга крысы определяли по количеству гидролизованного субстрата в процессе его инкубации с ферментом. О гидролизе цАМФ судили по падению радиоактивности ^3H -АМФ, использованного в качестве маркера. В работе применен метод Плеха и Куковитца [18] с определенными модификациями, предусматривающими разделение продуктов гидролиза с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол UV-254» [1]. Подробные методические детали описаны ранее [6].

Кардиоактивные соединения изолировали из гипоталамусов и сердечной мышцы крупного рогатого скота по схеме, включающей экстракцию низкомолекулярных соединений из соответствующей ткани 0,25%-ным раствором уксусной кислоты, гелевую фильтрацию через сефадекс G-10, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и распределительную хроматографию на бумаге. Препараты кардиоактивных соединений были отобраны на разных этапах очистки: после гель-фильтрации через сефадекс G-10, распределительной хроматографии на бумаге, после диссоциации от своих белковых носителей. Хранили биоактивные соединения в виде лиофилизированных порошков или бумажных полос при 0°.

Результаты и обсуждение. Кардиоактивные соединения, выделенные из состава низкомолекулярных веществ уксусного экстракта сердечной мышцы, условно обозначили S_1 , S_2 , S_3 по порядку элюирования из колонки, заполненной сефадексом G-10 [7]. Отщепленные от белковых носителей соединения были обозначены соответственно PS_1 , PS_2 , PS_3 . Гипоталамический кардиоактивный нейрогормон ранее условно был обозначен как C [2].

Для всех указанных соединений были характерны растворимость в воде (pH 5,5) и различных кислых растворителях (pH 2—4), отрицательная реакция на пингидрин, стабильность к воздействию щелочей, кислот и высоких температур (до 105°), с сохранением присущей им биологической активности приблизительно на 80%. При хроматографии на бумаге в отмеченной системе растворителей кардиоактивные соединения выявлялись в зонах с величинами R_f , равными для нейрогормона C —0,15, S_1 и PS_1 —0,35, S_2 и PS_2 —0,52, S_3 и PS_3 —0,05.

Основным тестом при биологических испытаниях указанных соединений была проверка на изменение коронарного оттока в условиях *in situ*. Как показали опыты, при внутривенном введении кошкам элюатов фракций S_1 наблюдалось увеличение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 250—300% по сравнению с нормой (рис.). Коронарорасширяющий эффект начи-

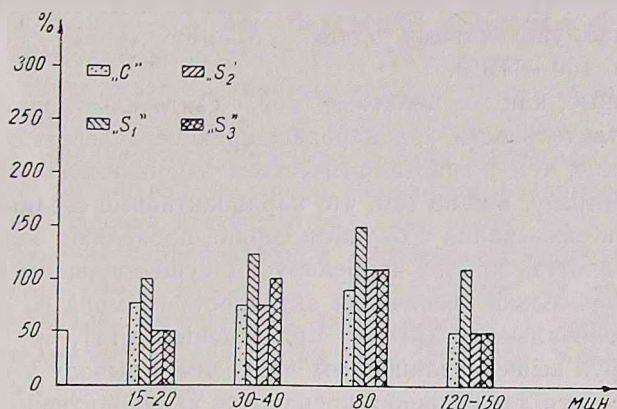


Рис. Изменение кровотока под действием нейrogормона C и подобных ему соединений сердечной мышцы. По оси абсцисс—время, по оси ординат—объемная емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца.

нался через 15—20 мин после введения и, постепенно нарастая, достигал максимума на 80-й мин; при этом отмечалось некоторое падение давления. Описанная картина была весьма характерна для PS_1 и нейrogормона C . По сравнению с ними действие фракции S_2 характеризуется более длительным латентным периодом (30—40 мин) и увеличением оттока приблизительно на 170% по сравнению с нормой. Нарастания коронарорасширяющего эффекта не отмечалось (рис.). Аналогичная картина наблюдалась и при введении фракций S_3 , PS_3 , с той лишь разницей, что после введения двух последних соединений наибольший эффект проявлялся на 40-й минуте. Подобные результаты были получены на 3-й и 5-й годы хранения препаратов кардиоактивных соединений; ввиду большого сходства диаграммы не приводятся.

Кроме того, на 5-й год хранения у нас появилась возможность дополнительного контролирующего биохимического количественного тестирования кардиоактивных соединений, подобных нейrogормону C , на основе обнаруженных ингибирующих ФДЭ цАМФ мозга и коронарорасширяющих действий этих веществ. Результаты исследований сведены в табл. Поскольку не была выявлена разница в указанной активности между препаратами, полученными в различные сроки хранения от 1—5 лет, в таблице приводятся не все данные.

Ранее сотрудниками лаборатории была выявлена количественная характеристика зависимости между ингибированием ФДЭ цАМФ мозга крысы *in vitro* и коронарорасширяющим действием нейrogормона C *in vivo* [6]. По этим данным, порог чувствительности определения коронароактивности соответствовал ингибированию ФДЭ цАМФ прибли-

зительно на 40%. Увеличение кровотока на 100% и более наблюдалось при ингибировании ФДЭ на 70—100%. Результаты, полученные при исследовании корреляции между биоактивностью и степенью ингибирования ФДЭ под воздействием кардиоактивных соединений сердечной мышцы, свидетельствовали о превосходящей активности последних. Так, например, ингибирование активности ФДЭ под воздействием S_1 на 94,6% вызывает увеличение коронарного оттока приблизительно на 250—300%. S_2 и S_3 , ингибируя активность ФДЭ лишь на 66 и 61% соответственно, увеличивают, однако, объемную емкость крови приблизительно на 160—170%.

Эти данные, как мы полагаем, могут свидетельствовать о том, что порог чувствительности коронарорасширяющего действия сердечных факторов выше, чем у гипоталамического соединения. Объяснить этот факт, по-видимому, можно тем, что кардиоактивные соединения, в частности S_1 , при связывании с белками сердца проявляют большую активность. Эта гипотеза вполне коррелирует с существующим в литературе мнением относительно увеличения активности гормона по отношению к своему первоначальному эффекту при рецепции [14].

Резюмируя вышеуказанное, мы приходим к выводу о том, что в течение первых 5-ти лет хранения препаратов кардиоактивных соединений гипоталамуса и сердечной мышцы крупного рогатого скота не происходит заметных изменений изученных биологических, биохимических и физико-химических свойств этих веществ.

Таблица

Изменение активности ФДЭ цАМФ гомогената мозга крысы под влиянием коронарорасширяющих соединений гипоталамуса и сердечной мышцы крупного рогатого скота

Фракции	Степень ингибирования, %		Активность, ед/мл	
	1—5-й год	10-й год	1—5-й год	10-й год
S_1	94,60	55,52	4,60	3,24
S_2	66,60	22,0	3,50	1,50
S_3	61,60	20,0	3,25	1,25
C	80,70	40,0	2,85	1,90

В таблице приведены усредненные данные 12 экспериментов.

В последующие годы, в частности на 10-й год хранения, были выявлены некоторые изменения. В первую очередь это относилось к изменению коронарорасширяющей активности: при сохранении всех описанных условий, в особенности дозировки вводимых препаратов, S_1 увеличивал объемную емкость крови лишь на 150% (рис.), при этом отмечалось уменьшение продолжительности действия препарата от 5-ти до 2,5 ч. Подобная частичная потеря активности отмечалась и при введении фракций S_2 и S_3 , которые увеличивали кровоток приблизительно на 100%. Что касается нейrogормона C, то он увеличивал объемную емкость крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, приблизительно на 80%.

Результаты изменения активности ФДЭ цАМФ мозга под действием исследуемых кардиоактивных соединений сведены в табл. 1, из которой явствует, что на 10-й год хранения происходят чувствительные отклонения от исходных норм. Это явление оказалось более выраженным при исследовании ФДЭ цАМФ ингибирующей способности S_1 . Уместно отметить, что нейрогормон C , инактивируясь в отношении коронарорасширяющей активности в большей степени, по сравнению с исходным, проявил гораздо меньшее отклонение от нормы в способности ингибировать активность фосфодиэстеразы (табл.).

Указанное относилось к препаратам, которые были сохранены в виде лиофилизированных порошков. В сравнении с ними, препараты кардиоактивных соединений, хранимые в виде бумажных хроматограмм, проявляли большую коронарорасширяющую активность.

Подобные наблюдения в течение ряда лет могут дать основание для прогноза хранения кардиоактивных соединений в виде лиофилизированных порошков, либо бумажных хроматограмм на протяжении 5-ти лет без изменений их основных биологических и биохимических свойств. Необходимым условием при этом является относительная чистота хранимых препаратов.

Институт биохимии АН Армянской ССР

Поступило 4.XI 1982 г.

**ԺԱՄԱՆԱԿԻ ԴՈՐԾՈՆԻ ԵՎ ՊԱՀՊԱՆՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԿԱՐԴԻՈԱԿՏԻՎ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՎՐԱ**

Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Ս. Ս. ՄԻՍԻՐՅԱՆ, Ս. Ս. ԱԲՐԱՄՅԱՆ, Լ. Ա. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ,
Տ. Վ. ՊՈՊՈՎԱ, Զ. Խ. ՊԱՐՈՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԴԱԼՈՅԱՆ

Հիպոթալամիկ կարդիոակտիվ նեյրոհորմոն C -ի և սրտամկանի համանման միացությունների կենսաբանական, կենսաքիմիական և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունների երկարատև տարիների համեմատական ուսումնասիրությունները պարզել են, որ շատ պարամետրերով դրանք նման են միմյանց և կայուն են հիմնային, թթվային ու ջերմային ազդեցությունների նկատմամբ: Միաժամանակ նկատված է, որ հիպոթալամիկ նեյրոհորմոն C -ի համեմատությամբ սրտի կարդիոակտիվ միացությունները գերազանցի են պակասձևանոթները լայնացնելու իրենց հատկությամբ:

**INFLUENCE OF TIME FACTOR AND WAY OF MAINTENANCE
ON THE BIOLOGICAL PECULIARITIES OF CARDIOACTIVE
COMPOUNDS**

R. M. SRAPIONIAN, S. S. MISIRIAN, S. S. ABRAMIAN, L. A. GRIGORIAN,
T. V. POPOVA, Z. Kh. PARONIAN, A. A. GALOIAN

Comparative studies of biological, biochemical and physico-chemical properties of hypothalamic cardioactive neurohormone C and compounds, isolated from the heart muscle, have shown their resemblance in many parameters. It is necessary to note their stability to alkaline, acidic and temperature influences. Besides, cardioactive compounds of

the heart are preferable because of their ability of widening the coronary vessels.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бериташвили Д. Р., Кафиани К. Н. Вопросы мед. химии, 3, 322, 1975.
2. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 34, 109—111, 1962.
3. Галоян А. А. В кн. Некоторые проблемы по биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. ДАН АрмССР, 67, 3, 176—179, 1978.
5. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Геворкян Г. Г. Биолог. ж. Армении, 20, 4, 3—8, 1967.
6. Гуряц Б. Я., Сарибекян Г. А., Сомова Е. С., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 66, 5, 290, 1978.
7. Мисирян С. С., Срапионян Р. М., Бхейн М. Т., Сарибекян Г. А., Галоян А. А. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 397—401, 1979.
8. Мисирян С. С., Срапионян Р. М., Медведев Ф. А., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 49, 5, 290—294, 1979.
9. Срапионян Р. М., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 56, 3, 174—176, 1973.
10. Срапионян Р. М., Мисирян С. С. Биолог. ж. Армении, 27, 10, 102—104, 1974.
11. Срапионян Р. М., Мисирян С. С., Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, 10, 122—127, 1975.
12. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. А., Галоян А. А. ДАН АрмССР, 20, 3, 182—186, 1980.
13. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Нейрохимия, 1, 1, 36—42, 1982.
14. Borenaems J., Dumont J. Mol. and Cell. Endocrinology, 7, 1, 33—47, 1977.
15. Chem M., Cretg S., Stoner J. Biochemistry, 19, 11, 3559—3563, 1972.
16. Haale W., Srapionian R., Oeme P., Galoyan A. Acta Biol. Med. Germ., 35, 265—267, 1976.
17. Morawitz P. Z., Zahn A. Dtsch. Arch. Klin. Med., 116, 364, 1914.
18. Pösch G., Kukovetz W. R. Life Sciences, 10, 133, 1971.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 6, 1983

УДК 153.8

О СООТВЕТСТВИИ ПСИХОФИЗИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫМ СТАДИЯМ ФОРМИРОВАНИЯ УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНОЙ СВЯЗИ

Ю. Х. ГРИГОРЯН

В первой стадии выработки условного рефлекса, когда проявляется его генерализованная фаза, наиболее подходящим описанием вероятности обнаружения сигнала является теория Блэквелла. При ориентировочных реакциях наиболее приемлема модель Люса. В этих случаях использование критерия максимизации выигрыша в соответствии с теорией Светса, Таннера, приведет к рассогласованию с действительностью. Последняя теория предпочтительна для анализа восприятия при упроченной условнорефлекторной связи.

Ключевые слова: психофизическая модель, сенсорный порог.