

УДК 591.553

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян,
Р. М. Срапионян, С. А. Саакян

Анализ низкомолекулярных соединений мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота

(Представлено 18/VI 1972)

Ранее обсуждался вопрос об образовании в гипоталамической части мозга коронарорасширяющих нейrogормонов, играющих важную роль в нейрогуморальной регуляции сердечного кровообращения^(1,2).

При анализе механизма действия этих начал на коронарное кровообращение было обнаружено участие надпочечников, в частности, мозгового слоя в реализации их эффекта. Так, после удаления надпочечников коронарорасширяющий эффект вышеуказанных нейrogормонов исчезает. Предварительные опыты показали, что только действием катехоламинов нельзя объяснить участие надпочечников в указанном феномене.

Задачей настоящего исследования явилось выяснение наличия неидентифицированных соединений в мозговом слое надпочечников крупного рогатого скота и участия их в реализации коронарорасширяющего действия гипоталамических нейrogормонов.

Надпочечники крупного рогатого скота изолировали, освобождали от крови, жирового слоя, отделяли мозговую часть и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Низкомолекулярные соединения экстрагировали 0,25%-ным раствором уксусной кислоты обычным способом⁽³⁾.

Центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10—15 мин и надосадочную жидкость лиофилизировали. Для разделения низкомолекулярных пептидов применяли нисходящую хроматографию на бумаге FN-11. Растворителем служила смесь: бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4 : 1 : 5). Дополнительная очистка и разделение веществ производились путем рехроматографии и электрофореза. Последний осуществляли при силе тока 2—3 ма на бумажную полосу (размерами 4×40 см и градиенте напряжения 40 в/см поперечного сечения, в течение трех часов.

Кислотный гидролиз проводили 6N HCl при 110° в течение 24-х часов, в запаянных ампулах.

Спектры поглощения элюатов фракций были сняты на регистрирующем спектрофотометре (фирма Unicam, SP-800).

Элюаты отдельных фракций испытывали на оттоке крови из коронарных сосудов по методу Моравитца и Цана (4).

Хроматограмма низкомолекулярных соединений, выделенных из мозгового слоя надпочечника показана на рис. 1. Как видно из рисунка в данном случае выявилось 12 нингидринположительные и 4 УФ-поглощающие соединения.

После введения элюата одной из фракций, R_f которого соответствовал 0,13, через 10—15 мин отмечалось увеличение объемной емкости крови, которое достигало своего максимума на 40-ой минуте. Действие этого активного начала продолжалось около 3-х часов, увеличивая объемную емкость крови на 250% по сравнению с нормой.

Другое активное начало с R_f , равным 0,48, увеличивало объемную емкость крови на 164% по сравнению с нормой, но действие его продолжалось дольше, в течение 4-х часов. В обоих случаях отмечалось некоторое понижение кровяного давления. Это обстоятельство, а также характерная и долгая продолжительность действия активных начал указывают на то, что эти вещества не являются ни адреналином, ни норадреналином. Различие было показано также с помощью спектрофотометрии.

На рис. 2 показаны спектры поглощения хроматографических элюатов соединений, выделенных из мозгового слоя надпочечника. Как

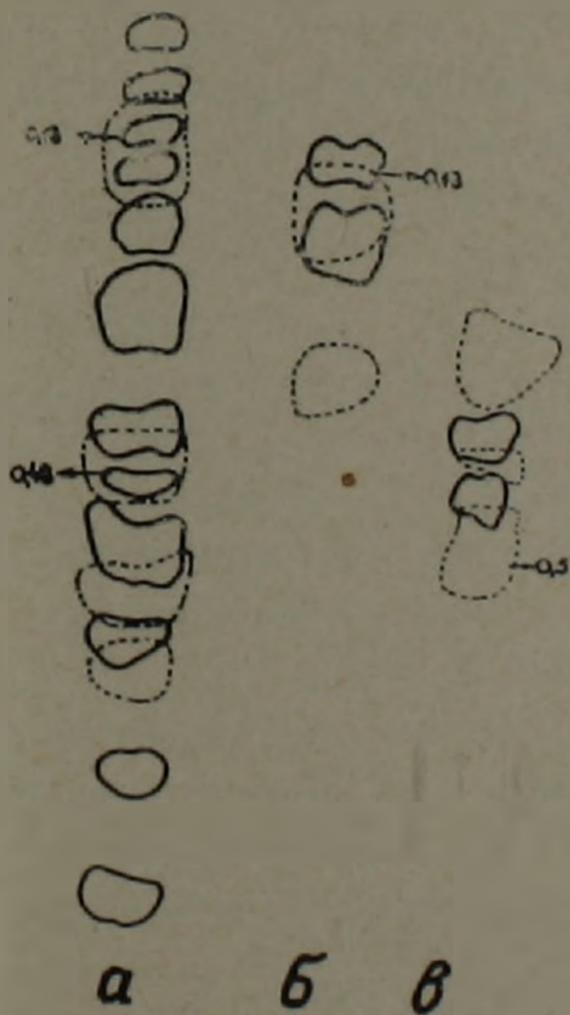


Рис. 1. Хроматограмма общего уксусно-кислого экстракта мозгового слоя надпочечника. а—хроматограмма низкомолекулярных соединений; б, в—рехроматограммы активных фракций. Сплошной линией отмечены нингидринположительные соединения, пунктиром—УФ-поглощающие

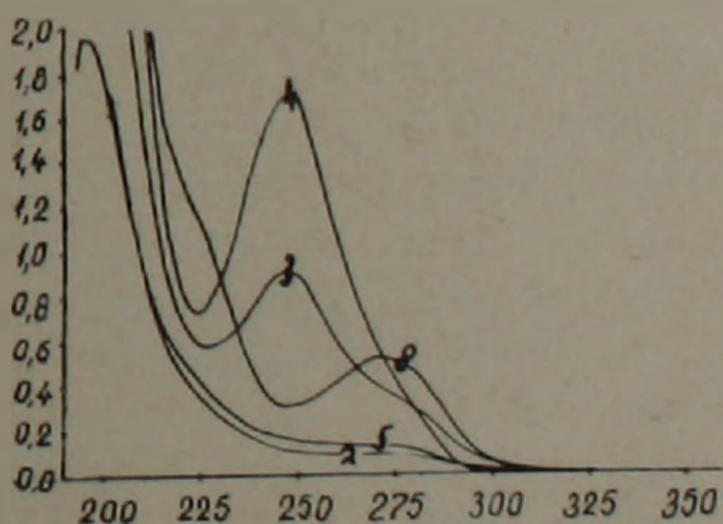


Рис. 2. Кривая спектрофотометрического анализа рехроматографических элюатов низкомолекулярных активных фракций, выделенных из мозгового слоя надпочечника

видно из этого рисунка, фракции 3 и 4 имеют одинаковое положение максимума поглощения при длине волны 248 *нм*, но отличные минимумы—228 и 223 *нм* соответственно. Фракция 8 отлична от предыдущих, она имеет максимум поглощения при 273 *нм*, а минимум—242 *нм*.

Ряд других соединений имеет одинаковый профиль максимума поглощения в области 278—280 *нм*, а минимумы—249, 248, 252 *нм* соответственно.

Как показали спектрофотометрические исследования, одно из коронароактивных начал (кривая 3 на рис. 2) обладает максимумом поглощения при 247 *нм*, а минимумом—225 *нм*; другое активное начало имеет максимум поглощения в районе 270 *нм*, а минимум—243 *нм* (кривая 8, рис. 2).

Характерными для этих соединений являлись также отношения величин поглощения при разных длинах волн. В табл. 1 приведены четыре отношения для указанных фракций; в каждом случае поглощение при данной длине волны отнесено к поглощению при 260 *нм*.

Таблица 1

Спектры поглощения коронароактивных соединений, выделенных из мозгового слоя надпочечника

№ № фракций	Отношение экстинкций			
	$\Sigma 250/\Sigma 260$	$\Sigma 270/\Sigma 260$	$\Sigma 280/\Sigma 260$	$\Sigma 290/\Sigma 260$
3	1,50	0,66	0,50	0,28
8	0,75	1,20	1,02	0,51

При сравнении этих величин с соответствующими данными атласа Т. В. Венкстера и А. А. Баева оказалось, что фракция 8-я почти совпадает по положению максимума поглощения и экстинкциям при разных длинах волн с уридил-3'5'-цитидин-3'-фосфатом.

В дальнейшем, коронароактивные фракции были дополнительно очищены рехроматографией. При рехроматографии одного из активных начал (рис. 1,б) выявились два нингидринположительные и два УФ-поглощающие соединения, причем одно из последних совпадает с нингидринположительными соединениями. Коронарорасширяющей активностью обладает только одна из фракций, которая являлась нингидринположительной и частично УФ-поглощающей.

При рехроматографии другого активного начала, как видно из рис. 1,в, выявились два нингидринположительные и три УФ-поглощающие соединения. В этом случае активностью также обладает только одна из УФ-поглощающих и, частично, нингидринположительных фракций.

При гидролизе указанных фракций (рис. 3) было выявлено девять нингидринположительных соединений, идентификация которых показала в гидролизате одного из фракций наличие следующих аминокислот: цистин, аргинин, аланин, тирозин, изолейцин и три неидентифицированные соединения (рис. 3,б). В гидролизате другого активного начала

выявились аланин, цистин, аргинин, глицин, пролин, валин, изолейцин и два неидентифицированных соединения (рис. 3,в).

Для выяснения степени гомогенности и некоторых физических свойств активные начала были подвергнуты электрофорезу. При этом,

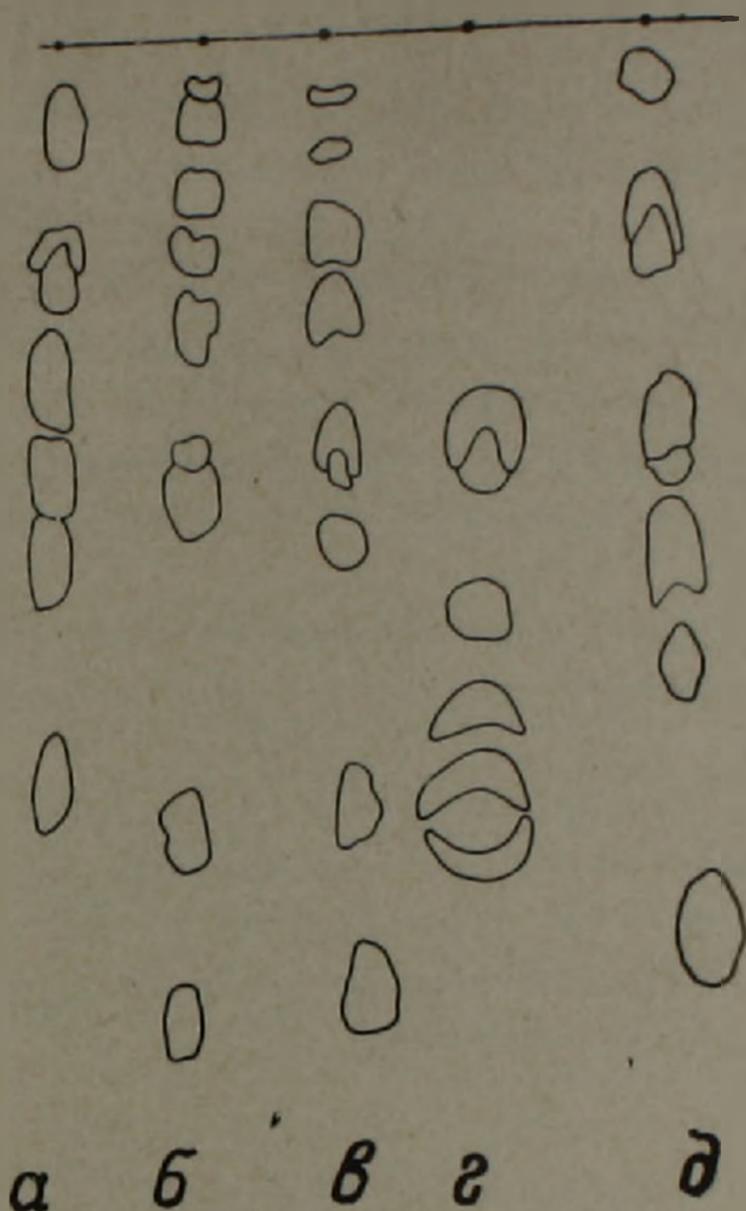


Рис. 3. Хроматограмма кислотного гидролиза активных фракций (б, в), а, д—стандартные аминокислоты

не идентичны с катехоламинами, что доказывается фармакологически-ми и спектрофотометрическими данными.

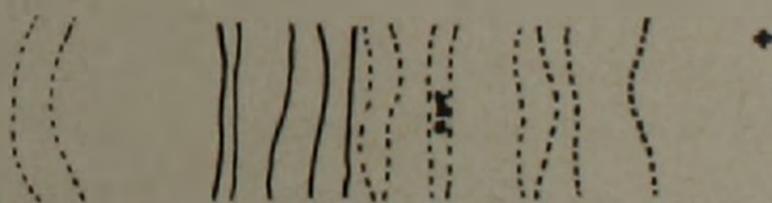


Рис. 4. Электрофореграмма активной фракции: вторая от стартовой линии анодная подфракция—коронароактивная. Сплошной линией отмечены нингидринположительные соединения, пунктиром—УФ-поглощающие

Проводятся исследования по выяснению химической структуры указанных соединений и их роли в выделении коронарорасширяющих нейrogормонов из гипоталамуса.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

как видно из рис. 4, были выявлены пять УФ-поглощающих и два нингидринположительных соединений; последние двигались к катоду. Из УФ-поглощающих соединений одно являлось катодным, остальные двигались к аноду. Активностью в обоих случаях обладала одна подфракция; она располагалась недалеко от стартовой линии в направлении к аноду.

Необходимо отметить, что активные начала полностью воспроизводили коронарорасширяющий эффект.

После гидролиза активного начала, было обнаружено около шести слабо окрашенных, нингидринположительных соединений. Идентификация их с метчиками выявила наличие трех аминокислот: аланин, пролин, лейцин и три неизвестные соединения (рис. 3,г).

Резюмируя вышесказанное, можно предположить, что низкомолекулярные коронароактивные соединения мозгового слоя надпочечника

Խոշոր եղջերավոր կենդանիների մակերիկամի ուղեղային շերտի
ցածր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող նյութերի անալիզը

Մեր նախկին աշխատանքներում ցույց է տրվել հիպոթալամա-նեյրոհիպոֆիզար համակարգության նեյրոհորմոնների դերը սրտի պսակաձև շրջանառության արյան կարգավորման գործում:

Պսակաձև շրջանառության վրա այդ նյութերի մեխանիզմն ուսումնասիրելիս հայտնաբերվել է մակերիկամի, հատկապես ուղեղային շերտի մասնակցությունը նշված հորմոնների էֆեկտի իրականացման պրոցեսում: Սակայն, ինչպես ցույց են տվել նախնական տվյալները, միայն կատեխոլամինների ազդեցությամբ չի կարելի բացատրել մակերիկամի մասնակցությունն այդ մեխանիզմներում:

Սույն աշխատությամբ մենք խնդիր ենք դրել անջատել ցածր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող նյութերը մակերիկամի ուղեղային շերտից և ուսումնասիրել քիմիական կառուցվածքը:

Քրոմոտոգրաֆիկ եղանակով մեզ հաջողվել է անջատել երկու նյութ, որոնցից մեկը պսակաձև անոթներից հոսող արյան քանակը նորմալի հետ համեմատած ավելանում է 250%, իսկ մյուսը 164%: Երկու դեպքում էլ նկատվել է արյան ճնշման որոշակի իջեցում: Այդ ֆրակցիաները լրացուցիչ մաքրվել են սեբրոմոտոգրաֆիկ և էլեկտրոֆորետիկ եղանակներով:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ А. А. Галоян, В кн.: Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1965. ² А. А. Галоян, «Вопросы биохимии мозга», т. 3 (1967). ³ А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, «Вопросы биохимии мозга», т. 1 (1964). Р. Morawitz, A Lahn „Dt. Arch. Klin. med.“, 116, 364(1914).