

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян,  
Р. М. Срапюнян, Ф. А. Медведев

### Некоторые данные о химической структуре нейрогормона «С»

(Представлено 10/VI 1978)

Ранее одним из нас были выделены из гипоталамуса ряда животных нейрогормоны, оказывающие весьма разительное влияние на сердечное кровообращение при их внутривенном введении кошкам (<sup>1</sup>). В последующем были разработаны методы их выделения из гипоталамуса крупного рогатого скота. При анализе физико-химических свойств одного из нейрогормонов условно обозначенного нами нейрогормоном «С» (НС), было показано, что это вещество обладает кислыми свойствами, движется к аноду даже при рН 3,8 (пиридин-ацетатный буфер).

НС усиливает гликогенолиз, гликлиз, по-видимому, путем активирования цАМФ-зависящей киназы фосфорилазы б-киназы (<sup>2</sup>). НС, не оказывая влияния на активность аденилат-циклазы в гомогенатах мозга и сердца, сильно ингибирует фосфодиэстеразу 3',5'-цАМФ и 3',5'-цГМФ (<sup>3,4</sup>), тем самым повышая уровень циклических нуклеотидов внутри клетки. Удалось показать, что НС конкурирует с цАМФ за те белки и ферменты, с которыми связывается цАМФ. Так, например, НС конкурирует с цАМФ за связывающие специфические белки, выделенные из коркового слоя надпочечников и мышц. Особенно наглядно конкурирующее влияние НС с цАМФ за регуляторную единицу цАМФ-зависящей гистон-киназы мозга (<sup>5</sup>).

В настоящем исследовании путем масс-спектрального анализа мы попытались подойти к расшифровке химической структуры НС.

Экстракцию НС осуществляли двумя способами: а) непосредственным выделением из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса (уксуснокислый экстракт гипоталамической ткани) по ранее описанному методу (<sup>1</sup>) с последующей очисткой вещества путем гелевой фильтрации, ионообменной хроматографии, высоковольтного электрофореза и бумажной хроматографии; б) путем диссоциации НС от специфического белкового носителя.

Белок-носитель нейрогомона «С» выделяли из гипоталамуса крупного рогатого скота по ранее описанной схеме (6), включающей солевое фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацией на сефадексе G-100 с последующей хроматографией на ДЕАЕ-Ц и изоэлектрофокусированием в градиенте амфолинов. Гомогенность белковых препаратов контролировали методом диск-электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле по методу Дэвиса (7). Диссоциацию комплекса белок-гормон осуществляли путем дигеста против 0,1 н уксусной кислоты методом, описанным ранее (8). Гель-фильтрацию низкомолекулярных активных начал проводили через сефадекс G 25, предварительно уравновешанной борноборатным буфером, pH 7,8. Затем подвергли бумажному хроматографированию. Активные элюаты дополнительно очищали на глицинамидированном сефадексе G-10 по методу Крэга (9) с некоторыми модификациями. По ходу очистки биологическое тестирование нейрогомона проводили двумя способами:

а) измерением коронарного кровотока в условиях *in situ*; б) определением фосфодиэстеразной активности в сердце и мозгу радиоактивным способом.

Высокоочищенные и лиофилизованные фракции НС растворяли в метаноле и разделяли на три части. Метанол упаривали, добавляли эфирный раствор диазометана с несколькими каплями метанола (для полного растворения). Через 15 мин упаривали и остаток ацетилировали в 0,4 мл смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1) в течение 20 часов. После упаривания растворителей образцы анализировали методом газо-жидкостной хроматографии, предварительно растворяя их в ацетоне или пиридине.

Измерения проводили на приборе фирмы Finnigan (США) с компьютерной системой, в стеклянных капиллярах-колонках длиной 25 м с фазой SE-30. Температурный режим—80—290°, по 6° в минуту изотерма в течение 30 мин при 290°. Спектры получали при электронном ударе ионизирующего напряжения 70 электрон-вольт. Газ-носитель—гелий с потоком 1,5 мл в минуту.

Результаты проведенных исследований показали, что при газо-жидкостной хроматографии НС основная масса вещества преимущественно сосредоточена в зоне со временем удерживания 47,15 мин. Метилированная фракция хроматографически мало подвижна. Проявляющиеся на хроматограмме ГЖХ минорные компоненты относятся к соединениям парафинового ряда. Необходимо отметить, что при дополнительном ацетилировании НС обладает высокой хроматографической подвижностью и интенсивнее проявляется на хроматограмме.

На рис. 1 показана масс-спектрограмма вещества со временем удерживания 47,15 мин. Как видно из рисунка, интенсивные пики  $m/e$ —331, 289, 271, 229, 221, 169, 127, 109 (серия А) указывают на наличие в веществе гексапиранозильного остатка. Отсутствие пиков серии В ( $m/e$ —242, 200, 140 и т. д.) и относительно низкая интенсивность фрагментов серии С ( $m/e$ —157, 115, 97) указывают на ароматическую или энольную природу агликона. Кроме пиков, характерных для пол-

ности ацетилированного гексапиранозильного остатка, в массе-спектре имеются пики  $m/e$  212, 170, 110.

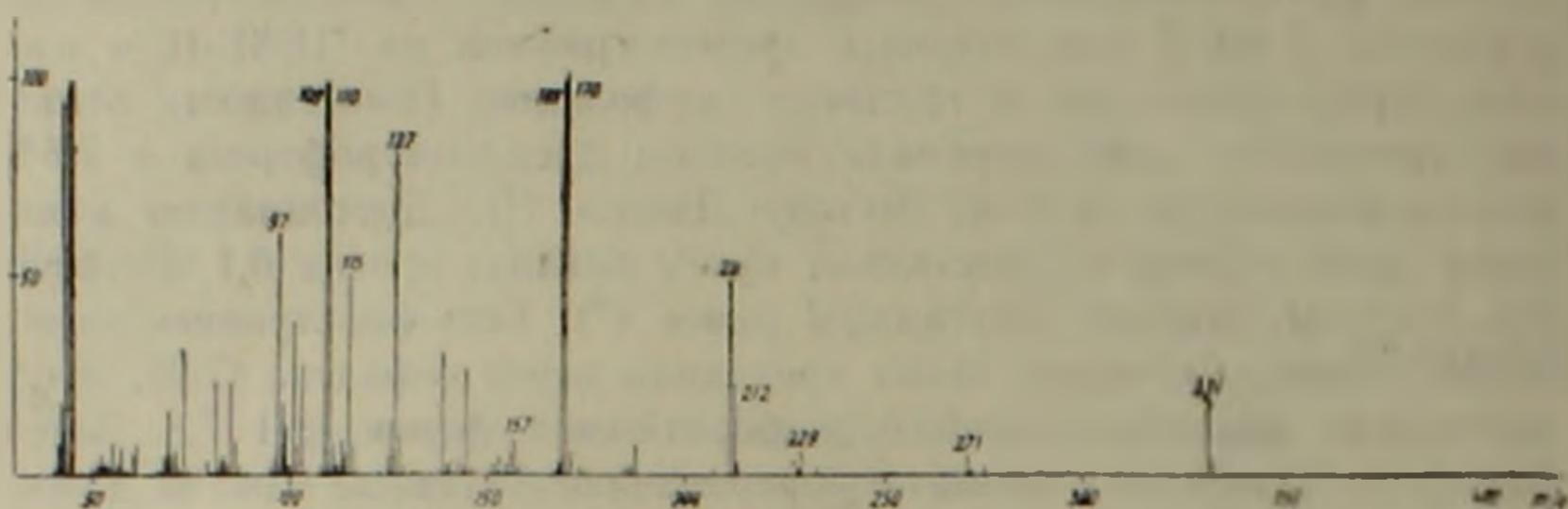
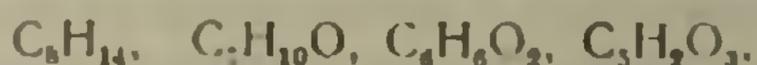


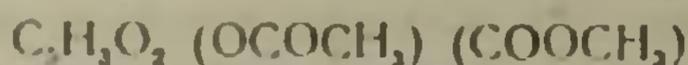
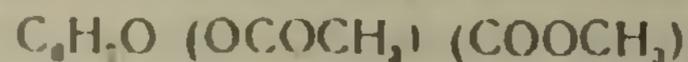
Рис. 1. Масс-спектрограмма ацетилированного производного нейрогормона «С»: на оси абсцисс—относительная интенсивность в процентах; на оси ординат—масса фрагментов вещества ( $m/e$ )

Различие в массах  $212 - 170 = 42$  и  $170 - 110 = 60$  позволяет предположить отщепление кетена (42) и уксусной кислоты (60) или метилформата (60).

Массе—110 могут соответствовать следующие брутто формулы:



Принимая во внимание кислые свойства вещества и характер его предварительной обработки (ацетилирование в уксусном ангидриде и пиридине и метилирование диазометаном), можно эти формулы представить в следующем виде:



Принимая во внимание ароматический характер агликона, формулы  $C_7H_{11}O (O\text{-ацетил}) (COOCH_3)$  и  $C_3H_3O_2 (OCOCH_3) (COOCH_3)$  кажутся менее вероятными.

Для брутто формулы  $C_6H_7O (OCOCH_3) (COOCH_3)$  можно представить предполагаемую структуру (рис. 2 и 3). В данном случае, в водной среде можно предположить равновесный переход кислотной формы—в лактоновую. При этом допускается, что гликозидный остаток соединяется с агликоном как со второй, так и четвертой гидроксигруппой. Поэтому представляем оба возможных варианта структуры в равновесном состоянии. На рис. 2 даны следующие структурные формулы: лактон 2-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты (слева) и 2-0-глюкопиранозид-2,4-диоксицикло-гекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты (справа).

На рис. 3 приведена структурная формула указанных соединений в случае, если гликозидная связь образуется с 4-ой гидроксигруппой

диоксициклогексена: соответственно можно читать—лактон 4-0-глюкопиранозид -2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты (слева)

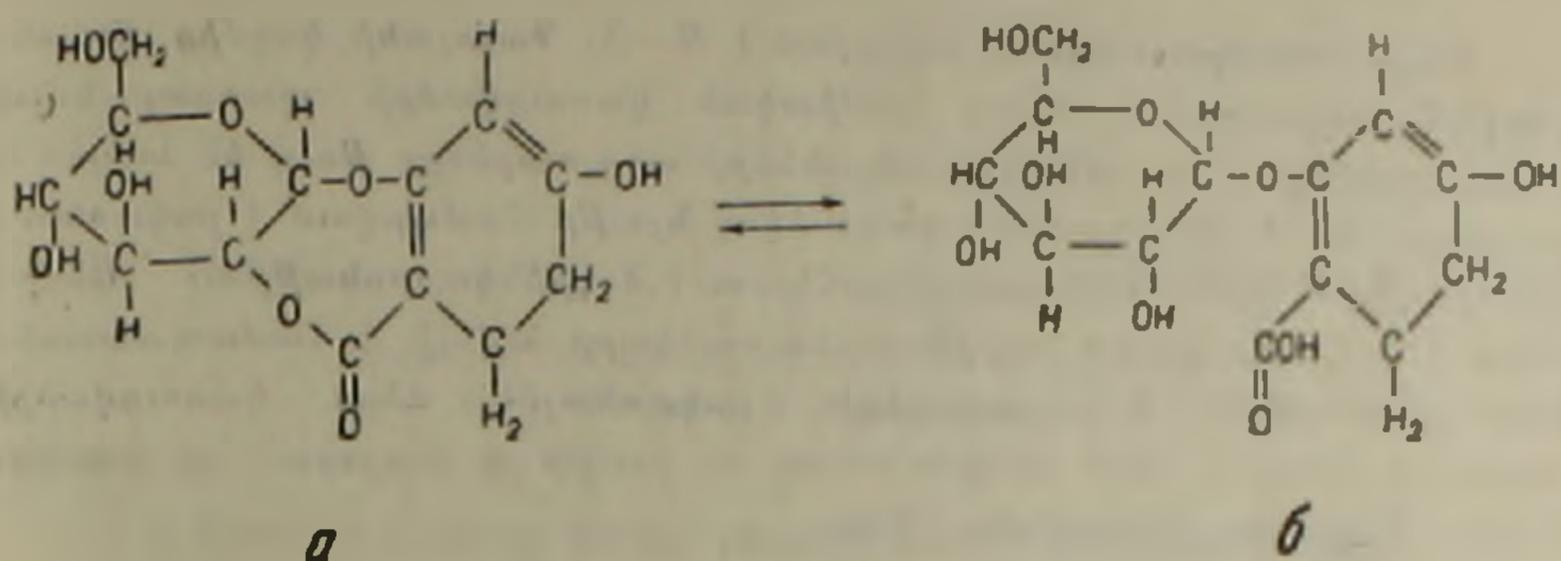


Рис. 2. Возможная химическая структура нейrogормона «С» в равновесном состоянии, водная среда (гликозидная связь у 2-ой гидроксн группы): а—лактон-2-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты; б—2-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты

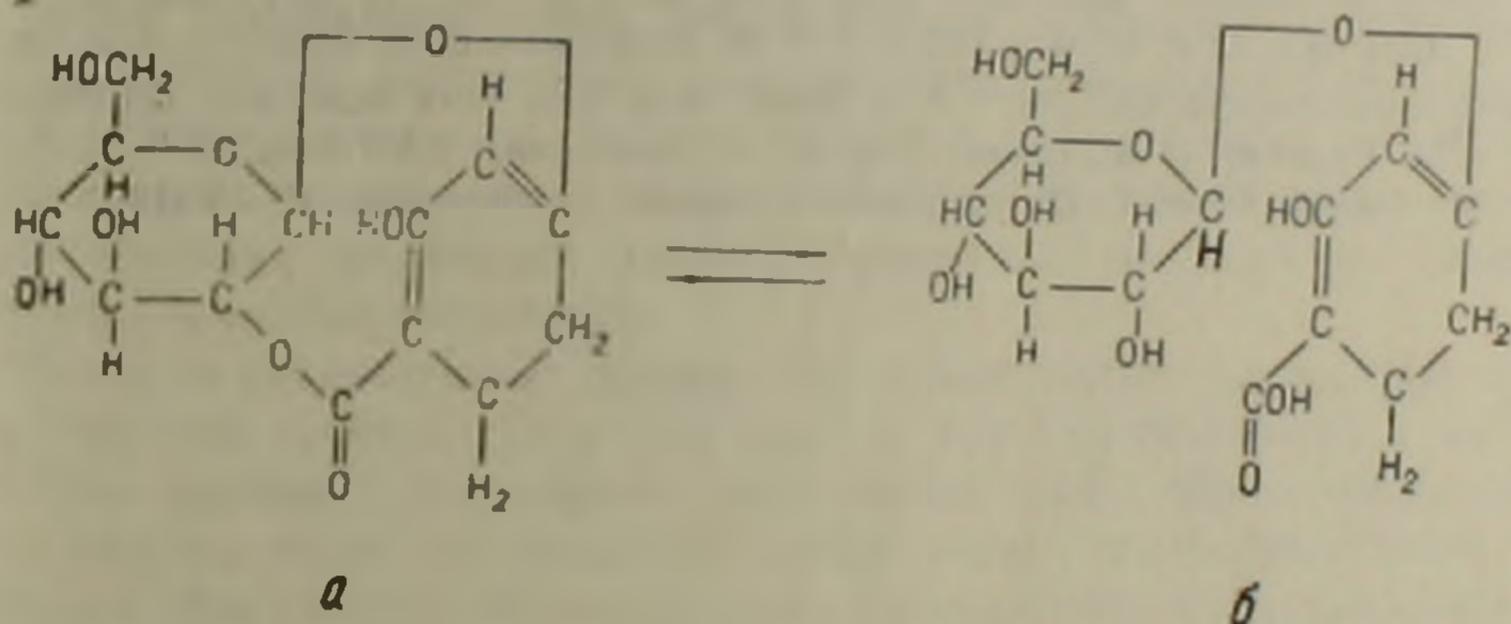


Рис. 3. Возможная химическая структура нейrogормона «С» в равновесном состоянии, водная среда, (гликозидная связь у 4-ой гидроксн группы): а—лактон-4-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты, б—4-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса-1,3-диэнкарбоновой кислоты

и 4-0-глюкопиранозид-2,4-диоксициклогекса—1,3-диэнкарбоновой кислоты. Причем глюкоза берется условно, так как не исключено, что может быть другая гексоза, например, галактоза или манноза, условно принимается также конфигурация гексозы. Необходимо отметить, что масс-спектр указанного вещества более соответствует структуре 2-С-глюкозида шикимовой кислоты (лактонсвая форма) так как после кислотного гидролиза оно не утрачивает своей биологической активности. Указанные данные мы считаем предварительными.

Выражаем глубокую благодарность О. С. Чижову за помощь и ценные замечания при анализе масс-спектрограмм.

Մի ֆանի տվյալներ ներհոսումն «С»-ի ֆիմիական կառուցվածքի մասին

Սույն հետազոտությունը նվիրված է Ա. Ա. Գալոյանի կողմից հայտնաբերված ներհոսումն «С»-ի ֆիմիական կառուցվածքի պարզաբանմանը Մասս-սպեկտրալ ուսումնասիրությունների արդյունքները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ 47,15 րոպեյում դուրս եկող նյութը համարվում է լակտոն-4-Օ-գլյուկոպիրանոզիդ-24-դիօքսիցիկլոհեքսա-1,3-դիենկարբոնաթթու Անհրաժեշտ է նշել, որ նշված նյութի մասս-սպեկտրը ավելի է համապատասխանում շիկիմաթթվի 2-Օ-գլյուկոզիդի (լակտոնային ձևը) կառուցվածքին նկատի ունենալով այն հանդամանքը, որ նյութը չի կորցնում իր ակտիվությունը թթվային հիդրոլիզից հետո

#### ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԻՈՒՄ ԵՄՔՆՈՒՆ

- <sup>1</sup> А. А. Галоян, ДАН Арм. ССР, т. 4, № 3 (1962). <sup>2</sup> А. А. Галоян, С. С. Алексанян, ДАН Арм. ССР, т. 58, № 3 (1974). <sup>3</sup> А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, М. А. Погосян, Бюлл. эксп. биол. и мед., 8, 820 (1977). <sup>4</sup> А. А. Галоян, А. С. Киракосова, Г. А. Сарибекян, Т. Х. Марукян, ДАН Арм. ССР, т. 64, № 5, (1977). <sup>5</sup> А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, ДАН Арм. ССР, 65 № 3 (1977). <sup>6</sup> Р. М. Срапионян, С. А. Саакян и А. А. Галоян, Вопр. бнох. мозга, 11, 97 (1976). <sup>7</sup> В. J. Davis, Ann. New York Acad. Sci., 121, 404 (1964). <sup>8</sup> А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, Р. А. Александян, ДАН Арм. ССР, т. 51, № 1 (1970). <sup>9</sup> H. C. Chen, L. C. Creig and E. Stonar, Biochemistry, 11, 19 (1972).