

УДК 615.224

БИОХИМИЯ

С. С. Мисирян, Р. М. Срапионян, Ф. А. Медведев,
член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

Масс-спектральный анализ трех кардиоактивных соединений,
полученных из сердца крупного рогатого скота

(Представлено 19/X 1979)

Нам удалось показать наличие в сердце ряда животных (крупный рогатый скот, кошки, свиньи, крысы) трех кардиоактивных низкомолекулярных начал^(1, 2). При изучении некоторых физико-химических свойств этих фракций выяснилось, что они обладают кислыми свойствами, нингидрин-отрицательны и не дают окраски при хлорировании. Указанные фракции сохраняют свою биологическую активность при всех видах гидролиза (ферментативный, щелочной, кислотный) и проявляют способность ингибировать фосфодиэстеразу 3',5'-аденозинмонофосфата гомогената мозга⁽²⁾. Активные начала, выделенные из сердца, оказывают влияние на биосинтез гликогена путем активирования или ингибирования фосфорилазы в различных органах⁽³⁾.

Полученные данные дали основание предположить сходство коронароактивных соединений, выделенных из сердца, с нейрогормоном «С».

В настоящем исследовании мы задались целью подойти к расшифровке химической структуры вышеуказанных соединений методом масс-спектрального анализа и подтвердить их сходство с нейрогормоном «С».

Из сердечной мышцы крупного рогатого скота выделяли низкомолекулярные вещества по описанному ранее методу⁽⁴⁾.

Очистку кардиоактивных соединений проводили по схеме, включающей гель-фильтрацию на сефадексе G-10, ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе, бумажную хроматографию в системе растворителей бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5) и рехроматографию в системе растворителей пиридин — ацетат — вода (1:10:100).

Окончательная очистка была осуществлена на глицинамидированном сефадексе G-10 по методу Крега⁽⁵⁾, модифицированному нами⁽⁶⁾.

В качестве основных реактивов использовали: сефадексе G-10 фир-

мы Pharmacia Fine Chemicals, диметилформамид (ДМФ)—Fisher Scientific Co; Chemical Manufacturing Division, глицинамидгидрохлорид—Division of Becton, Dickinson and Co, Orangeburg, N.Y; N, N'—дициклогексилкарбодимид—Ferak Berlin, какодиловую кислоту—Ferak Berlin.

Сефадекс G-10, обработанный методом, описанным ранее, упаковывали в колонку размером 1×50 см (7). В качестве маркера использовали 0,01%-ный водный раствор голубого декстрана. Элюция велась дистиллированной водой со скоростью 10 мл/час.

Кардиотропную активность фракций определяли по известному методу (7). Ацетилирование высокоочищенных и лиофилизированных образцов осуществляли смесью уксусного ангидрида и пиридина в соотношении 1:1 (8). После упаривания образцы анализировали методом хромато-масс-спектрального анализа, предварительно растворяя их в пиридине.

Работу проводили на квадрупольном хромато-масс-спектрометре фирмы «Finnigan» (США) с автоматической системой обработки данных и стеклянной капиллярной колонкой—25 м с фазой SE—30. Температурный режим—150—290°, инжектор и переходные линии—280°. Газ-носитель гелий с потоком 1,5 мл/мин. Масс-спектры получены методом электронного удара при энергии ионизации 70 эв в диапазоне массовых чисел 41—650.

Как показали исследования, каждая из трех коронароактивных фракций, выделенных из сердца крупного рогатого скота, при гель-фильтрации через глицинамидированный сефадекс G-10, диссоциируется на 2 изоформы, обладающие коронарорасширяющей активностью.

1-ая коронароактивная фракция, условно обозначенная нами S_1 , диссоциирует на 2 изоформы S_1' и S_1'' , которые отличаются друг от друга профилем элюции (2-й и 11-й объемы) соответственно, по данным спектрофотометрирования и биологическими свойствами.

Коронарорасширяющий эффект фракции S_1' более продолжительный—3,5 ч и более ярко выражен. При введении этой фракции происходит увеличение объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца на 200—250% по сравнению с нормой.

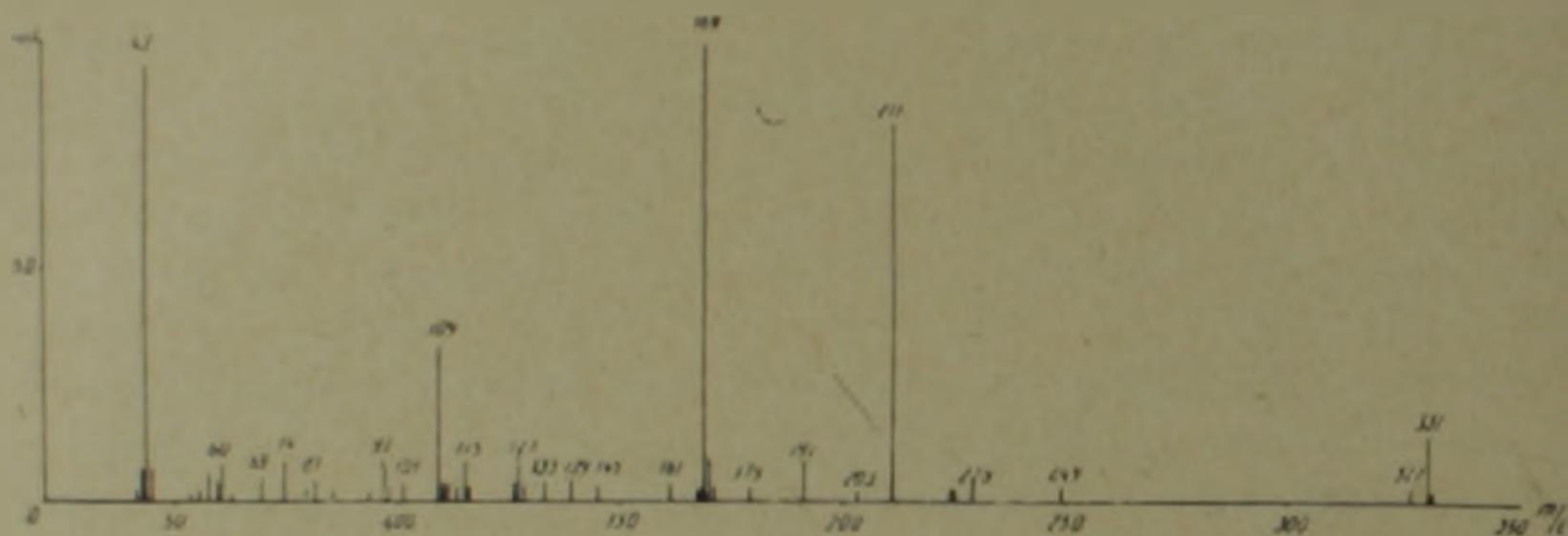
Фракция S_1'' расширяет кровеносные сосуды всего на 100—120% и эффект ее действия менее продолжительный и составляет приблизительно 1 ч.

Аналогичная картина наблюдается при гель-фильтрации через глицинамидированный сефадекс G-10 остальных двух активных начал, условно обозначенных нами как S_2 и S_3 . Каждая из этих фракций в свою очередь диссоциируется на 2 изоформы (S_2' , S_2'' и S_3' , S_3'') соответственно, которые аналогичны изоформам S_1' и S_1'' и отличаются друг от друга по тем же параметрам.

Хромато-масс-спектральный анализ коронароактивной фракции S_1' показал, что основная масса вещества выходит со временем удерживания 33,4 мин. Площадь хроматографического пика, реконструиро-

ванная по максимальному в спектре иону с m/e 169, составляет 45 700 условных единиц.

Масс-спектр вещества со временем удерживания 33,4 мин (рисунок) аналогичен масс-спектру нейрого르몬а «С», выделенного из мозга, ранее выходившего со временем 47,15 мин⁽⁸⁾. Расхождение во времени удерживания, по-видимому, объясняется введением нового температурного режима хроматографического разделения, которое вели при начальной температуре 150° вместо 80° как ранее.



Масс-спектр ацелированного производного коронарорасширяющего вещества, выделенного из сердца крупного рогатого скота (S'_1): на оси абсцисс—масса фрагментов вещества (m/e); на оси ординат—относительная интенсивность в процентах

Масс-спектр вещества S'_2 качественно аналогичен веществу S'_1 . Однако наблюдается различие соотношений интенсивностей основных пиков масс-спектра. В отличие от S'_1 максимальным в спектре является пик с m/e 211, а не 169, а пик с m/e 331 имеет вдвое меньшую интенсивность.

Характер масс-спектра вещества S'_3 сходен с масс-спектром вещества S'_1 и отличается повышенной интенсивностью пика с m/e 331 (с приблизительной разницей на 11%).

Учитывая гомогенность фракций, в дальнейшем мы сделали попытку идентифицировать и дать количественную характеристику кардиотропных фракций при прямом вводе пробы в источник ионов масс-спектрометра (без предварительного хроматографического разделения). Образцы вводили непосредственно в источник и нагревали до 300° в течение 3,5 мин, причем максимум испарения основного вещества приходился на 230°. Кривые испарения всех трех образцов с помощью ЭВМ реконструировались по основным фрагментам фракции S'_1 с массовыми числами 331, 211 и 169 (таблица). При одинаковых условиях очистки и анализа образца площадь под этими кривыми можно считать мерой концентрации данного вещества.

Из данных таблицы вытекает, что в масс-спектрах всех трех фракций, полученных при прямом вводе пробы в источник ионов, доминируют фрагменты с m/e 169, 211 и 331. Совпадение временных точек максимумов реконструированных кривых испарения каждой из трех

фракций свидетельствует о том, что эти фрагменты относятся к одному индивидуальному соединению.

Масс-спектрометрические характеристики трех кардиоактивных фракций, полученных при прямом вводе проб

m/e	Время *, мин			Площадь, усл. ед.			S_i/S_{100} %		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
169	2.50	2.38	2.44	475100	44970	13936	100	100	100
211	2.50	2.38	2.44	422215	35058	10417	88.8	77.8	74.7
331	2.50	2.38	2.44	92368	8022	3296	19.4	17.8	23.6

* Временная точка максимума реконструированной кривой испарения.

Сопоставление величин измеренных площадей во всех трех образцах свидетельствует о максимальном относительном содержании коронароактивного вещества во фракции S_1' .

Качественное сходство масс-спектров и одинаковое время удерживания во всех трех образцах может свидетельствовать о наличии в сердце крупного рогатого скота различных структурных изомеров кардиоактивного соединения, причем один из них — S_1' подобен нейрогормону «С», выделенному из гипоталамуса.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

ՈՒ. Ս. ՄԻՍԻՐՅԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱԳԻՈՆՅԱՆ, Յ. Ա. ՄԻՒՂԵԴԵՆԻ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ ԲՊԲակից-անդամ
Ա. Ա. ԴԱՂՅԱՆ

Խոշոր եղջերավոր անասունների սրտից անջատված երեւ կարդիոակտիվ միացությունների մասս-սպեկտրալ անալիզը

Խոշոր եղջերավոր անասունների սրտից անջատվել է երեք կարդիոակտիվ միացություններ, որոնք ազդում են սրտի անոթների շրջանառության վրա: Խրոմատո-մասս-սպեկտրալ անալիզի մեթոդով ուսումնասիրվել է նշված միացությունների քիմիական բնույթը:

Պարզվել է, որ վերոհիշյալ երեք միացություններից մեկը, որը պայմանորեն անվանվել է S_1' -նյութ, իր ֆրագմենտներով նման է հիպոթալամուսից անջատված նեյրոհորմոն «С»-ի ֆրագմենտներին, իսկ մյուս երկուսը (S_2 , S_3) ըստ կրկույթին հանդիսանում են վերջինիս իզոմերները:

ЛИТЕРАТУРА—ՎՐԱՇՆՆԵՐՆԵՐ

¹ Р. М. Срапионян, А. А. Галоян, ДАН АрмССР, т. 56, № 3 (1973) ² С. С. Мисирян, Р. М. Срапионян, М. Т. Бхелян, Г. А. Сарибекян, А. А. Галоян, Биологический журн. Армении, т. 32, № 5 (1979). ³ С. С. Мисирян, Ж. Г. Абемян, Р. М. Срапионян, А. А. Галоян, Биологический журн. Армении, т. 32, № 5, (1979). ⁴ А. А. Галоян, Авторское свидетельство № 403214 по заявке № 1208585 (1968). ⁵ Hao Chia Chen, Numan G. Creig, E. Soper, Biochemistry, 11, 19 (1972). ⁶ А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, С. А. Саакян, Ф. М. Саакян, Г. А. Сарибекян, Р. О. Карапетян, ДАН Арм. ССР, т. 67, № 3 (1978). ⁷ P. Z. Mogawitz, A. Zahn, Dt Arch. Klin. med., 116, 364 (1914). ⁸ А. А. Галоян, Р. М. Срапионян, Ф. А. Медведев, ДАН Арм. ССР, т. 66, № 5 (1978).