

А. А. ГАЛОЯН, Р. М. СРАПИОНЯН, Г. Г. ГЕВОРКЯН

РАЗДЕЛЕНИЕ КОРОНАРОАКТИВНОГО БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ ЧАСТИ МОЗГА, НА ДЭАЭ-ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

В предыдущих исследованиях [1, 2] мы подробно останавливались на вопросах электрофоретического разделения коронароактивного белка на агар-агаре, а также его гелевой фильтрации на сефадексе G-100, в результате которого удалось получить два пика, причем коронароактивная белковая фракция была обнаружена в первом из них.

Последующие этапы очистки белковой фракции произведены с применением ионообменной хроматографии на целлюлозионитах. Этот метод был успешно разработан в 1956 г. Питерсоном и Собером [6, 7], которые создали новый тип ионообменников, имеющий гидрофильную матрицу на целлюлозной основе; их преимуществом является высокая емкость, чувствительность отбора и сохранение нативных условий [4]; отмечается незначительная повреждаемость белков на указанных колонках с их максимальным выходом, нередко достигающим 100%.

В настоящей работе мы использовали ДЭАЭ-целлюлозу, ибо, как показали наши предыдущие исследования, изучаемый белок является анионом. ДЭАЭ-целлюлоза является наиболее универсальным целлюлозионом и широко применяется для фракционирования белков, пептидов.

Методы исследования. Сухой порошок ДЭАЭ-целлюлозы в количестве 7 г суспендировали в 0,5 н растворе NaOH из расчета 1 г на 50 мл. Полученную суспензию фильтровали и отмывали водой и отстаивали в течение 20—30 мин.; надосадочную жидкость с неосевшими мельчайшими частицами сливали. Ионообменник суспендировали в новой порции воды, и через 20—30 мин. жидкость с неосевшими частицами сливали вновь. Процедуру повторяли до практически полного удаления неосевших частиц в надосадочной жидкости.

Перед внесением в колонку ионообменник уравнивали 0,005 М фосфатным буфером, высвобождаясь от воздушных пузырьков, с $pH=6,5$.

Навеску белкового препарата (1 пика вышедшего с сефадекса G-100) в количестве 30 мг растворяли в 2 см³ 0,005 М фосфатного буфера и вносили в колонку (0,9×50 см). После впитывания нанесенного образца производили градиентную элюцию со скоростью 15 мл/час по нижеприведенной схеме.

1. Фосфатный буфер 0,005 М, pH 6,5
2. Фосфатный буфер 0,02 М, pH 5,9

3. Фосфатный буфер 0,1 М, рН 5
4. 0,02 М раствор NaCl в 0,1 фосфатном буфере, рН 5
5. 0,1 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, рН 5
6. 0,5 М раствор NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, рН 5

В этой схеме элюирования используется значительный градиент концентрации соли в сочетании с небольшим понижением рН (от 6,5 до 5). В собранных фракциях (по 5 мл) определяли как содержание белка, так и его биологическую активность в отношении коронарного кровообращения на кошках под гексаналовым наркозом по методу Н. В. Кавериной [3].

Оптическую плотность элюатов определяли спектрофотометрически (СФ-4А) при длине волн 260, 280 мкм, а содержание белка—по методу Лоури [5].

Результаты. Как видно из табл. 1, а также рис. 1, белки, вышедшие с сефадекса G-100 в первом пике, с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе разделяются на 12—13 фракций, из которых две, проэлюировавшиеся в 5-ом и 7-ом пиках, являются коронарорасширяющими. В разных случаях мы наблюдали некоторое смещение пиков, однако интервал между указанными двумя фракциями, измеряемый как в мл элюирующей жидкости, так и во времени, всегда остается постоянным.

Таблица 1

Количество белка в элюатах (по Лоури)

№	Показание ФЭК-а	Количество белка в 0,5 мл бел- кового раствора	Общее ко- личество белка в элюатах (в γ)	№	Показание ФЭК-а	Количество белка в 0,5 мл белкового раствора	Общее количество в элюатах (в γ)
1—5	50	0	0	35	95	8	64
6	90	18	180	36—37	0	0	0
7	85	28	252	38—40	96	7	56
8	96	7	63	41	94	10	70
9	95	8	72	42	93	12	84
10	93	12	98	43—44	95	8	64
11	97	4	36	45—46	96	5	40
12	96	7	63	47—48	97	4	32
13	94	10	90	49—50	95	8	64
14	95	8	72	51	94	10	80
15—17	96	7	63	52—54	96	5	30
18—19	97	4	36	55	0	0	0
20—21	95	8	63	56—58	95	8	64
22	97	4	36	59—72	0	0	0
23—27	0	0	0	73	95	8	64
28—29	96	5	40	74	96	7	56
30	95	8	64	75—80	97	4	32
31	97	4	32	81—82	96	7	56
32	95	8	63	83	95	8	64
33—34	0	0	0	84—137	0	0	0

Данные спектрофотометрического определения элюатов на волне 280 мкм приведены на рис. 2; число пиков здесь достигает 13, и коронарорасширяющие фракции выявляются уже в 4 и 5 пиках.

Биологическое тестирование (рис. 3, 4) наглядно выявляет активность фракций в отношении коронарного кровообращения. Через 20 мин.

после внутривенного введения животным первой активности фракции (рис. 3) отмечается увеличение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца по сравнению с нормой. Этот эффект постепенно нарастает и достигает своего максимума на 65 мин., составляя 400% от исходной величины; при этом кровяное давление не подвергается чув-

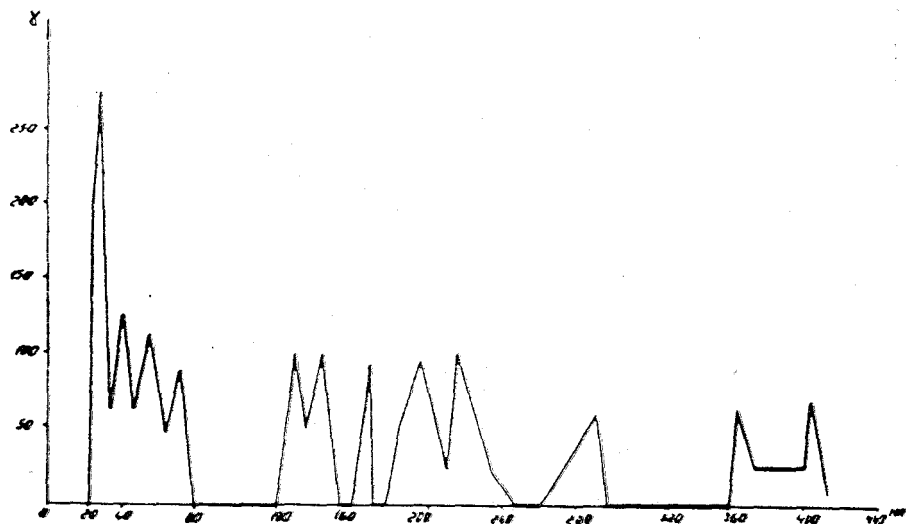


Рис. 1. Количество белка (по Лоури) в элюатах белковой фракции, разделенной на ДЭАЭ-целлюлозе (градиентная элюция).

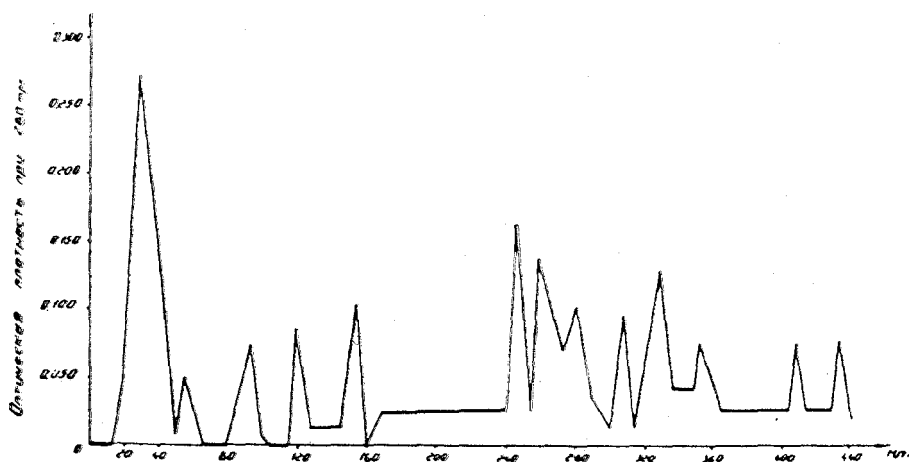


Рис. 2. Кривая спектрофотометрического анализа (280 мμ) элюатов белковой фракции, разделенной на ДЭАЭ-целлюлозе (градиентная элюция).

ствительным изменениям. Описанная картина наблюдается в течение 90 мин., в то время как продолжительность действия второй фракции в тех же условиях относительно кратковременна—45—50 мин. (рис. 4). Коронарорасширяющее действие последней проявляется на 10 мин. после внутривенного введения фракции; достигает максимального развития на 25 мин., увеличиваясь более чем на 90% от контрольного уровня. При

этом в отдельных случаях наблюдается некоторое падение кровяного давления, что, однако, не носит закономерного характера.

При сравнении эффекта влияния двух коронарорасширяющих фракций, вышедших с ДЭАЭ-целлюлозы, с эффектом влияния коронарорас-

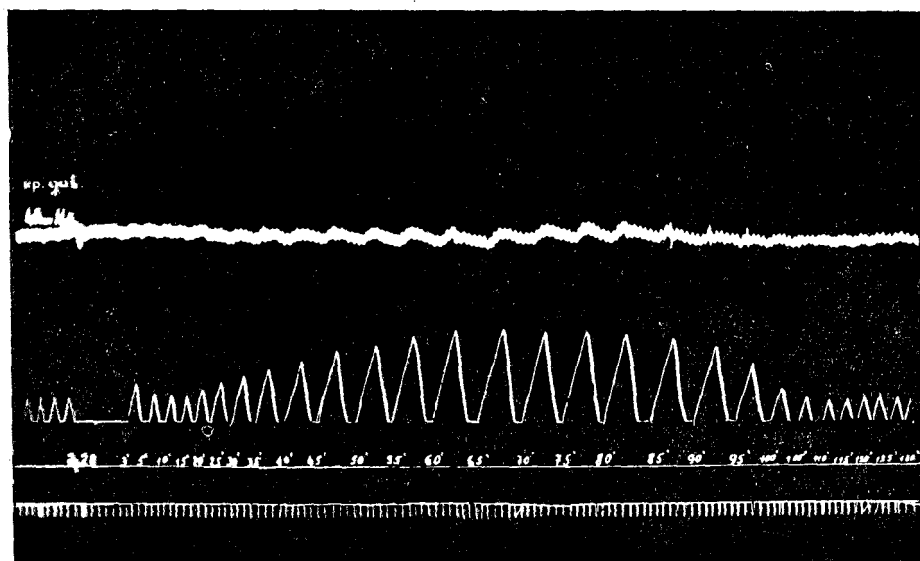


Рис. 3. Изменение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца под влиянием I-й коронарорасширяющей фракции, вышедшей с колонки ДЭАЭ-целлюлозы. Обозначения сверху вниз: 1. Кровяное давление. 2. Кривая изменения количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца. 3. Отметка времени.

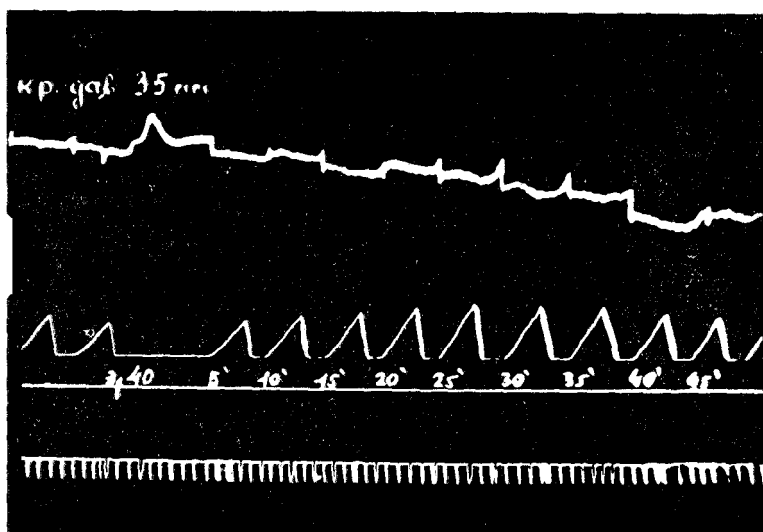


Рис. 4. Изменение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца под влиянием II-ой коронарорасширяющей фракции, вышедшей с колонки ДЭАЭ-целлюлозы. Обозначения те же, что и на рис. 3.

дириющего белка, выделенного сернистым аммонием, можно заметить следующее: неочищенный коронарорасширяющий белок расширяет коронарные сосуды через 20—25 мин., а через 60—70 мин. количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, увеличивается на 300—400% и продолжается в течение 3—4 и более часов. Однако, как мы видели, при разделении белка на ДЭАЭ-целлюлозе (и при разделении на сефадексе G-100) продолжительность действия активных элюатов сравнительно короче. По-видимому, сумма разделенных активных фракций обеспечивает длительность эффекта. Не исключена возможность потери определенной части активности в процессе разделения сефадексом или ионообменником, но важно, что коронарорасширяющая активность белка сохраняется. Выход двух коронарорасширяющих белков после разделения на ДЭАЭ-целлюлозе не вызывает сомнений. Вместе с тем возникает вопрос: являются ли обе эти фракции одним и тем же белком или они различны по своей природе? Учитывая их различную биологическую активность, большое расстояние между двумя фракциями при выходе из колонки, а также наши прежние наблюдения, установившие наличие **двух** низкомолекулярных коронарорасширяющих фракций в гипоталамусе, мы допускаем существование в нем двух различных белковых носителей. Этот вопрос можно окончательно решить после установления химической природы и структуры указанных белков, что возможно только при получении их в индивидуальном виде.

Наши исследования показали отсутствие липопротеидов, фосфолипидов и других соединений, присутствующих в большом количестве в неочищенном белке, в элюатах активных фракций, выделенных ДЭАЭ-целлюлозой.

Можно полагать, что выделенные ДЭАЭ-целлюлозой белковые фракции достаточно хорошо очищены, но трудно утверждать, что они являются индивидуальными белками. Для выяснения этого вопроса следует определить N-концевые аминокислоты, их гомогенность при ультрацентрифугировании и произвести последующее электрофоретическое разделение белков на крахмальном геле по Смитису и т. д.

В ы в о д ы

1. На ДЭАЭ-целлюлозе белки, вышедшие в 1-м пике с сефадекса G-100, разделяются на 12—13 фракций.

2. Коронарорасширяющие фракции обнаруживаются в 2-х различных пиках (первый выходит по истечении 120—130 мл элюирующей жидкости, второй через 160—175 мл).

3. Первая активная фракция увеличивает количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца на 400%, причем эффект сохраняется в течение 90 мин., а вторая — лишь на 90% с продолжительностью действия менее чем 45—50 мин.

4. Исходя из наших исследований, полагаем, что выделенные фракции являются различными белками.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 20.I 1967 г.

Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ, Գ. Գ. ԳԵՎՈՐԿՅԱՆ

**ՈՒՂԵՂԻ ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԱՅԻՆ ՇՐՋԱՆԻՑ ԱՆՋԱՏՎԱԾ ՊՍԱԿԱԶՆՎ
ԱՆՈՐՆԵՐԸ ԼԱՅՆԱՑՆՈՂ ՍՊԵՏԱԿՈՒՅԻ ԲԱԺԱՆՈՒՄԸ
ԴԷԱԷ-ՑԵԼՅՈՒՈՂԱՅՈՎ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Մեր նախորդ հետազոտություններում ցույց է տրված, որ հիպոթալամուսից անջատված պսակաձև անոթները լայնացնող սպիտակուցները միատարր չեն, բաղկացած են 13—14 սպիտակուցային ֆրակցիաներից: Սեֆադեքս G-100-ի միջոցով նա բաժանվում է երկու խմբի, որոնցից մեկում գտնվում է ակտիվ սպիտակուցը:

Սույն հետազոտությամբ մենք խնդիր ենք դրել դիէթիլամինաէթրիցելուլոզայով (սյունային խրոմատոգրաֆիայով) բաժանել և ստանալ միատարր սպիտակուց:

Հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ այդ սպիտակուցը բաժանվում է 12—13 ենթաֆրակցիաների, որոնցից երկուսը ակտիվ են: Ենթադրվում է, որ այդ երկու սպիտակուցները հանդիսանում են տարբեր ակտիվ հորմոնների կրողներ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Срапионян Р. М. ДАН АрмССР, т. 42, 4, 1966.
2. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Биолог. журн. Арм. XIX, 9, 1966.
3. Каверина Н. В. Фармакология и токсикология, I, 39, 1958.
4. Николаев А. Я. Успехи химии, т. 32, вып. 9, 1963.
5. Lowry O. H. et al., J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
6. Peterson E. A., Sober H. A. J. Am. Chem. Soc., 78, 751, 1956.
7. Sober H. A., Gutter F. J., Wykoff M. M., Peterson E. A. J. Am. Chem. Soc., 78, 756, 1956.