

А. А. Галоян и Р. М. Срапионян

### Об очистке коронарорасширяющего белка, выделенного из гипоталамуса

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. Х. Бунятыном 13/VII 1965)

Одним из нас (<sup>1</sup>) из гипоталамуса свиней и крупного рогатого скота был выделен белок, обладающий коронарорасширяющим влиянием. Ранее выделенные коронароактивные полипептиды (<sup>2</sup>) по нашему мнению не прочно связаны с данным белком.

Задачей настоящего исследования было разделение и очистка водорастворимого белка (фракция 4) с целью получения коронароактивного белка в индивидуальном виде.

Водорастворимые белки мозга были выделены и изучены электрофоретически на агар-агаре в лаборатории А. В. Палладина (<sup>3-5</sup>). Относительно водорастворимых белков гипоталамической части мозга в литературе нет данных.

Опыты были поставлены с гипоталамусами свиньи, барана, крупного рогатого скота. Извлекали мозг из только что убитых животных, готовили водный гомогенат (1:2), а затем путем центрифугирования при 9000 об/мин. получали экстракт, из которого фракционировали водорастворимые белки путем высаливания с помощью сернокислого аммония разной концентрации. В центрифугат добавляли сернокислый аммоний до 0,2 насыщения, оставляли на час при 0°С, после чего центрифугировали, полученный при этом осадок растворяли в небольшом количестве веронал-мединалового буфера, рН—8,6, а в центрифугат добавляли сернокислый аммоний для дальнейшего фракционирования при 0°С. Осадки диализовывали в течение 48 час., причем вначале против дистиллированной воды, а затем против веронал-мединалового буфера. После диализа производили лиофильную сушку и полученные порошки подвергали электрофорезу на агар-агаре. Разделение белковых веществ электрофоретическим методом на агаровом геле впервые описано Гордоном и сотрудниками (<sup>6</sup>), а в дальнейшем Грабаром (<sup>7</sup>). Оптимальные условия для разделения водорастворимых белков мозга были разработаны Н. М. Поляковой (<sup>8</sup>).

Готовили 3—4-процентный раствор лиофилизированного белка на веронал-мединаловом буфере, рН—8,6, с ионной силой 0,0125. В же-

лобки, вырезанные в агаровом геле, вносили 0,1—0,12 мл белкового раствора. Электрофорез длился 7 час. при градиенте потенциала 3 в/см, силе тока 0,3 МА на 1 см поперечного сечения. Пластинки после электрофореза помещали в 2-процентную уксусную кислоту, затем высушивали и окрашивали амидошварцем 10 В. Результаты электрофореза количественно оценивались как прямым денситометрическим измерением окрашенных пластинок, так и химическим методом определения количества белка в элюатах по Лоури (9). Вырезанные полоски агара сразу же после электрофореза помещали в центрифужные стаканы, замораживали в смеси сухого льда и ацетона и центрифугировали в течение 30 мин. при 8000 об/мин. При оттаивании агар расслаивался на твердую фазу и жидкую, состоящую из буфера и элюируемого белка, осадок агара вновь заливали веронал-мединаловым буфером до половины исходного объема, размешивали стеклянной палочкой, пока весь раствор превращался в гель. При повторном замораживании и центрифугировании геля извлекали оставшуюся часть белка. После чего всю жидкость концентрировали выпариванием при низких  $t$ , а в полученных концентратах определяли белок по Лоури (9) и исследовали биологическую активность в отношении коронарного кровообращения по методу Н. В. Кавериной (10).

Опыты ставились на кошках под уретановым наркозом и определяли количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца за единицу времени.

Вначале определяли активность белковой фракции (лиофилизированного порошка), а после ее обнаружения производили электрофоретическое разделение данной фракции, и в элюатах разделившихся фракций также определяли активность в отношении коронарного кровообращения.

После высаливания белкового экстракта сульфатом аммония, методом, описанным нами ранее (3), получены 5 фракций, из которых 4-ая белковая фракция оказалась активной в отношении коронарного кровообращения. А при более дробном высаливании белкового экстракта сернокислым аммонием по формуле

$$X = \frac{0,1 G (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG}{1000} \cdot S_2}$$

удалось выделить из гипоталамуса 10—13 фракций.

$X$  — вес соли, выраженный в граммах,

$S_1$  — степень насыщения (предыдущая),

$S_2$  — степень насыщения (настоящая),

$G$  — количество (г) сернокислого аммония в 1000 мл насыщенного раствора,

$V$  — кажущийся удельный объем сернокислого аммония в насыщенном растворе.

В настоящей статье приводятся данные о разделении электрофорезом на агаровом геле 4-ой белковой коронароактивной фракции, выделенной первым способом (2).

Визуально на электрофореграмме обнаружены 8 фракций, из



Фиг. 1. Денситометрическая кривая растворимых белков гипоталамуса, выделенных при 0,4 насыщении сульфатом аммония.

коих 6 фракций направляются в сторону отрицательного полюса, а две — в сторону положительного полюса. Однако, при денситометрировании электрофореграмм выявляется до 14 фракций. Опыты показали, что активная фракция движется к положительному полюсу. На денситометрической кривой, изображенной на фиг. 1 ей соответствует 6, 7, 8-ая фракции. Эти

данные показывают, что выделенный нами белок является гетерогенным.

После внутривенного введения этой активной фракции кошкам через 5—6 мин. отмечается увеличение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца на 100%. Этот эффект продолжается 35 мин., а через 60 мин. увеличение количества крови достигает до 200%, что продолжается в течение 1,5—2 часов и более. За весь период опыта у животных не наблюдалось заметного изменения кровяного давления.

У некоторых кошек наблюдается незначительное падение кровяного давления, но у большинства животных кровяное давление почти не изменяется. Следует отметить, что частичная очистка 4-ой белковой фракции электрофоретическим методом приводит к некоторым изменениям характерного для 4-ой фракции влияния на сердце. Таким образом, электрофоретическим методом удастся разделить 4-ую белковую фракцию на ряд белковых фракций, из которых одна является коронароактивной.

Выводы 1. Белки гипоталамуса, выделенные сернокислым аммонием в зоне 0,3—0,4 насыщения, электрофорезом на агаре делятся на 14 фракций.

2. Фракция,двигающаяся к положительному полюсу имеет коронарорасширяющее свойство.

3. После внутривенного введения кошкам элюата данной фракции количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца через 5—6 минут резко увеличивается и этот эффект продолжается в течение 60—90 минут. При этом кровяное давление у большинства животных не подвергается заметным изменениям.

4. Результаты опытов показали, что 4-ая белковая фракция не является гомогенной.

Институт биохимии Академии наук  
Армянской ССР

**Հիպոթալամուսից անջատված պսակաձև անոթները լայնացնող սպիտակուցի մաքրման մասին**

1964 թ. Ֆալոյանի կողմից հիպոթալամուսային շրջանից անջատված 1 եզել սպիտակուց, որը լայնացնում է պսակաձև անոթները: Սույն հետազոտությամբ մենք խնդիր ենք դրել էլեկտրոֆորեզի եղանակով ստանալու պսակաձև անոթները լայնացնող սպիտակուցային ֆրակցիան լաբոր ձևով:

Փորձերի արդյունքները պարզեցին, որ ակտիվ սպիտակուցը բաժանվում է 14 ֆրակցիաների, որոնցից մեկը՝ զեպի դրական բեռը գնացողը, պսակաձև անոթները լայնացնում է:

**ЛИТЕРАТУРА — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ր**

<sup>1</sup> А. А. Галоян, ДАН АрмССР, т. 38, № 5, 305 (1964). <sup>2</sup> А. А. Галоян, «Известия АН АрмССР», т. 16, № 1 (1963). <sup>3</sup> Н. М. Полякова и В. К. Лешко, Укр. биохим. журн., т. 34, № 10 (1962). <sup>4</sup> А. В. Палладин, Физиол. журн. СССР, т. 23, 727 (1947). <sup>5</sup> Н. М. Полякова и М. К. Малышева, ДАН, т. 144, 1394, (1962). <sup>6</sup> А. Г. Гордон и др., Coll. Tr. Chim. Tcheosl., 15, 1, 1950. <sup>7</sup> П. Грабар и П. Буртэн, Иммуноэлектрофоретический анализ, изд. иностр. лит., М., 1963. <sup>8</sup> Н. М. Полякова, III Всесоюзная конференция по биохимии и с. Сб. докладов под редакцией А. В. Палладина и Г. Х. Бунятына 25, 1963. <sup>9</sup> О. Г. Лоури и др., J. Biol. chem., 193, 265, 1961. <sup>10</sup> Н. В. Каверина, Фармакология и токсикология, 1, 39, 1958. <sup>11</sup> Г. Нейрат и К. Бэйли, Белки, том 1, изд-во инос. лит. 1959.