

В настоящей работе мы задались целью устранить причины адсорбции кардиотропного нейрого르몬а «С» (НС) при его гель-фильтрации на сефадексе G-10, используя обработанный глицинамидированным сефадекс, не исключая также возможности гетерогенности вышеуказанного нейрого르몬а. Одновременно приобретает большое значение разработка адекватного метода выделения, позволяющего получить достаточное количество НС.

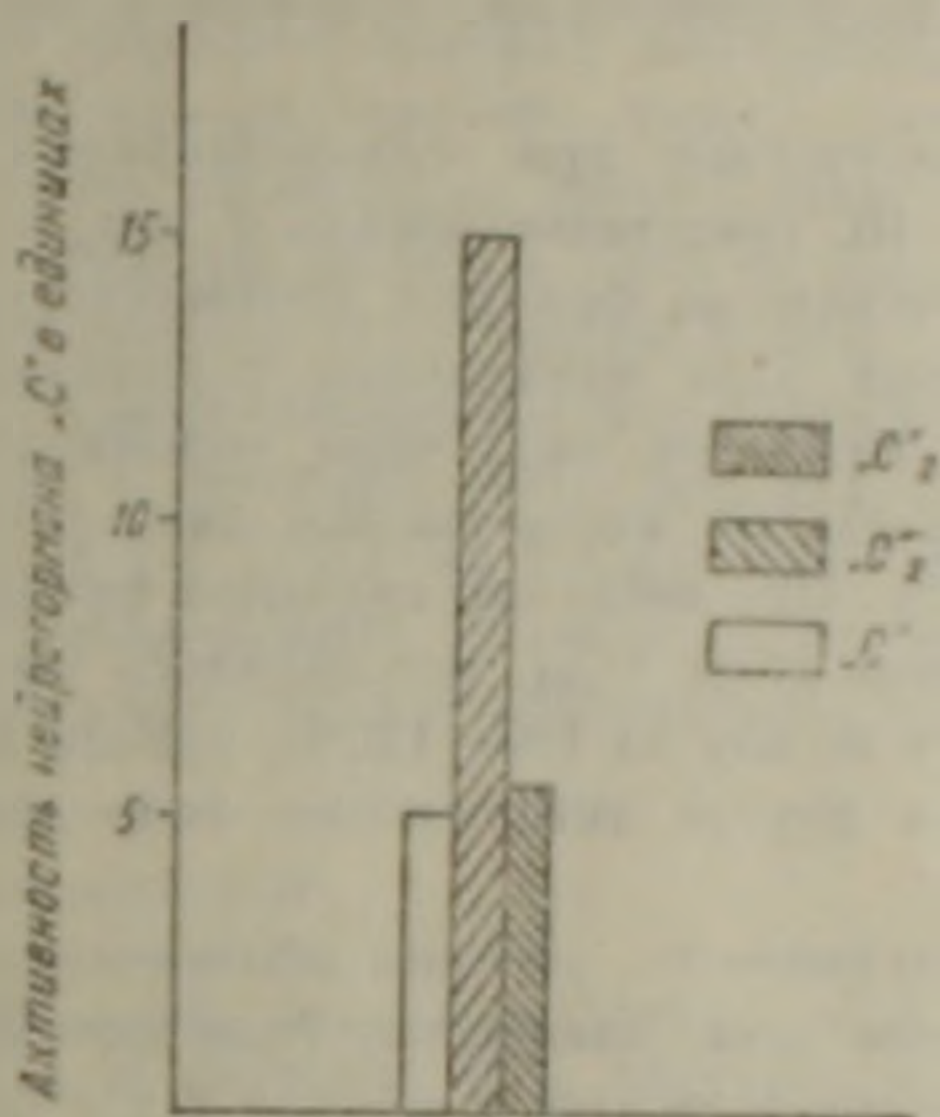


Рис 1. Сравнение действия фракций «С₁» и «С₂» на ФДЭ мозга крыс с действием нейрого르몬а «С».

В качестве основных материалов использовали коммерческие препараты: сефадекс G-10 фирмы Farmacia Fine Chemicals; диметилформамид (ДМФ) — Fisher Scientific Co; Chemical Manufacturing Division, N. Y.; глицинамид-гидрохлорид—Division of Becton, Dickinson and Co, Orangeburg, N. Y.; N₁N'-дициклогексилкарбодимид—Ferak Berlin; какодиловая кислота, Ferak Berlin.

Реакцию глицинамидирования вели по методу, разработанному Крэггом и сотр. (2) с некоторыми модификациями. Сефадекс G-10 в количестве 50 г суспендировали в 0,1 н растворе NaCl, промывали с помощью декантации сначала 0,5%-ным раствором Na-ЭДТА, а затем трижды дистиллированной водой, пока pH декантируемой воды не стал равным 6. Сефадекс уравнивали 400 мл смеси, состоящей из 50% ДМФ в 0,1 н буфере какодиловой кислоты pH 4,75, сюда же добавляли 10 ммоль глицинамида и 10 ммоль водорастворимого карбодимида. Для удаления реагентов последовательно промывали: 0,1 н раствором NaCl, дистиллированной водой до исчезновения реакции с нингидрином. Обработанный таким образом сефадекс G-10 или G-25 упаковывали в колонку размерами 1×50 см. В качестве маркера использовали 0,01%-ный водный раствор голубого декстрана. Элюция велась дистиллированной водой со скоростью 16 мл/час. В отобранных фракциях велась проверка биологической активности по известной

методике Моравитца и Цана (7) и определение активности фосфодиэстеразы (ФДЭ) по ранее описанному методу (8). Активность ФДЭ определяли по количеству гидролизованного субстрата циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в процессе его инкубации с ферментом. О гидролизе цАМФ судили по падению радиоактивности ³H-цАМФ, использованного в качестве маркера. За единицу активности нейрогормона «С» принимали такое количество препарата, которое ингибировало 1mE цАМФ фосфодиэстеразы гомогената мозга крысы за 1 минуту.

Результаты, полученные при гель-фильтрации нейрогормона «С» через сефадекс G-10, свидетельствовали о том, что указанное активное соединение выходило во фракции, соответствующей 10-ому объему элюирующего буфера. При применении глицинамидированного сефадекса были обнаружены две различные коронарорасширяющие фракции. В ожидаемом объеме элюировалась лишь наименьшая часть активности, около 30%. При введении активной фракции указанной зоны, условно обозначенной нами «С₂», наблюдалось увеличение коронарного кровотока кошек *in situ* на 100—120%, причем действие этого начала, по сравнению с другой активностью—непродолжительное, в течение 1,5 часа.

Основная же активность, условно обозначенная нами «С₁», была сосредоточена в 1-ом пике, элюируясь 7-ым объемом буфера. Эффект указанной фракции продолжался в течение 3-х и более часов, увеличивая коронарный кровоток на 200—250% по сравнению с нормой.

Фракции «С₁» и «С₂» отличаются также способностью в различной степени ингибировать ФДЭ 3'5'-цАМФ мозга (таблица). При сравнении действия фракции «С₂» с действием нейрогормона «С» в наших опытах с ферментом гомогенатов мозга крысы удалось показать, что вышеуказанная фракция проявляет столь же сильный ингибирующий эффект. Наряду с этим выяснилось, что ингибирующий эффект фракции «С₁» превосходит почти в три раза подобное действие нейрогормона «С» (рисунок).

Таблица

Изменение активности ФДЭ мозга крыс под действием коронарорасширяющих фракций

Фракции	Количество гидролизованного субстрата, %		Степень ингибации, %	Активность в единицах на 1 мл
	контроль	опыт		
«С»	84	74	10	0,5
«С ₁ »	85	60	25	1,6
«С ₂ »	80	69,7	10,3	0,6

Следовательно, вместо ожидаемого суммирования эффекта ингибиции наблюдается обратная картина. Механизм этого явления пока не выяснен полностью, можно лишь допустить возможность наличия в активном комплексе другого соединения, которое препятствует проявлению характерного для ИС действия как на коронарное кровообращение, так и на ингибирование ФДЭ цАМФ мозга.

По предварительным данным таким соединением может быть коронаросуживающая фракция, которая диссоциируется от нейрогомона «С» лишь при гель-фильтрации через глицинамидированный сефадекс. Одновременно происходит диссоциация нейрогомона «С» на две коронарорасширяющие фракции, одна из которых является весьма эффективным ингибитором ФДЭ цАМФ мозга. Одинаковый профиль элюции через неглицинамидированные сефадексы, сходство биологической активности и ингибирующего эффекта на ФДЭ 3'5'-цАМФ диссоциированных друг от друга на глицинамидированном сефадексе фракций позволяет предположить наличие в гипоталамусе двух изоформ или аналогов кардиоактивного нейрогомона «С».

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ Իդրակից-անդամ Ա. Ա. ԿԱՆՅԱՆ, Ռ. Մ. ՍՐԱԳՈՒՆՅԱՆ,
Ռ. Ս. ԿԱՐԱԳԵՏՏԱՆ, Յ. Մ. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Ս. Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ, Գ. Ա. ՍԱՐԻՐԵԿՅԱՆ

Իլիցինամիդացված սեֆադեքս G-10-ի միջոցով դիսոցված նեյրոհորմոն
«С»-ի երկու իզոմերների հայտնաբերման մասին

Հետազոտությունների արդյունքները պարզեցին, որ սեֆադեքս G-10-ի ղիցինամիդացումից հետո, երբ վերջինիս ազսորրցիոն հատկությունները նվազում են, նեյրոհորմոն «С»-ն, որը նախկինում նույն սեֆադեքսի վրա դուրս էր գալիս միայն մեկ զոնայում, այժմ բաժանվում է երկու մասի, որոնցից յուրաքանչյուրն օժտված է պսակաձև անոթալայնիչ, ինչպես նաև ցիկլիկ-ԱՄՖ, ֆոսֆոդիէսֆերազայի ընկձման հատկությամբ: Սույն տվյալները վկայում են «С» նեյրոհորմոնի երկու իզոմերների («С₁», «С₂») առկայության մասին:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ K. L. Carraway and D. E. Koshland, *Biochim. Biophys. Acta*, 160., 272—274. (1968). ² Y. Porath, *Separ. Sc.*, 2, 507, (1967). ³ Y. Porath, Y. C. Yanson and T. Laas, *J Chromatography*, 60, 167(1971) ⁴ B. Gelotte, *J Chromatography*, 3, 330 (1960). ⁵ Hao—Chia Chen, C. Lyman, Creig and E. Stoner, *Biochemistry*, 11, 19(1972). ⁶ T. Y. Richard et al., *Anal. Biochemistry*, 82, 23 (1977). ⁷ P. Z. Morawitz und A. Zahn, *Deutsch. Arch. Klin Med.*, 116, 364 (1914). ⁸ А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц, М. А. Погосян, *Вопр. биохимии мозга*, Изд. АН Арм. ССР, 11, 83 (1976).