

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА В ОРГАНИЗМЕ КРЫСЫ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

ГАБРИЕЛЯН С. К., СРАПИОНЫАН Р. М., АБЕЛЯН Ж. Г., СААКЯН С. А.,
СЛАКЯН Ф. М., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН Армении, Ереван

Методом радиоиммунологического анализа изучено распределение нейроспецифического кардиоактивного белок-гормонального комплекса (белок-нейрогормон «С» — БНС) у крыс с экспериментальным инфарктом миокарда (ИМ). Указанная сердечная патология сопровождается опустошением БНС в мозгу, в особенности в гипоталамусе и мозжечке (в 80 и 12 раз) и одновременно значительным (примерно в 6—340 раз) увеличением в ряде висцеральных органов и периферической крови. Суммированные данные свидетельствуют также об убывающей последовательности уровня БНС в висцеральных органах у крыс с ИМ: селезенка > сердце > скелетная мышца > печень > почки > поджелудочная железа > легкие. Полученные данные позволяют заключить о возникновении при ИМ нового гомеостатического уровня БНС.

Результаты многолетних исследований [1, 2] трех белок-гормональных комплексов (БГК), обнаруженных нами более 25 лет тому назад в гипоталамусе ряда млекопитающих, позволили прийти к выводу, что они являются теми биохимическими системами, которые способны осуществить химическую регуляцию метаболизма и функций не только мозга, но и ряда висцеральных органов, в особенности сердца [3]. При диссоциации этих комплексов было установлено, что они состоят из неидентифицированных в настоящее время гликопротеинов [4] и низкомолекулярных нековалентно связанных с последними кардиоактивных гликопептидов [5], структурно родственных с кардиоактивными нейрогормонами «К», «С», «Г», ранее обнаруженными в том же регионе мозга [6]. Следует отметить, что отдиссоциированные гликопротеины в свою очередь являются предшественниками целого ряда новых биоактивных гликопептидов, в том числе и кардиоактивных [7]. Физиологическое действие этих соединений характеризуется избирательностью и высокой активностью: они расширяют периферические сосуды, стабилизируют кровяное давление, усиливают кровоток, повышают проницаемость капилляров, участвуют в процессах микроциркуляции [8], повышают ударный минутный объем и частоту сердечных сокращений [9].

Разработка соответствующих иммунохимических [10] и радиоим-

мунологических (РН) методов [11] позволила установить нейроспецифичность указанных БГК, выявив искомые комплексы с убывающей иммунореактивностью в структурах мозга в следующей последовательности: гипоталамус, мозжечок, кора больших полушарий, продолговатый мозг. В значительно меньших количествах (на три порядка по сравнению с нервной тканью) БГК-подобные иммунореактивности были выявлены в сердечной, скелетной мышцах, селезенке, печени, сыворотке крови. Одновременно применение метода РНА создавало возможность изучения динамики распределения этих БГК при патологических состояниях, в частности деструкции сердечной мышцы.

Целью настоящего исследования явилось изучение количественного содержания в мозгу и регионального распределения одного из специфических комплексов гипоталамуса—белок-нейрогормон «С» (БНС) в норме и в условиях моделирования у крыс экспериментальной ишемии миокарда (ЭИМ).

Материалы и методы

Опыты проводили на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 160—200 г. Экспериментальную ИМ вызывали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии. О максимальном развитии ИМ к 4-му дню судили по регистрации ЭКГ на аппарате 6 НЕК-3 (электроды игольчатые, крыса не фиксирована). У животных регистрировали ЭКГ в 3 стандартных отведениях. Записи производили до окклюзии венечной артерии, через 5 мин после окклюзии и перед забоем животных. Уже через несколько минут после окклюзии левой коронарной артерии у крыс были заметны выраженные ишемические изменения: в стандартных отведениях на ЭКГ возникает значительный подъем сегмента ST и увеличивается зубец T. Позднее, через 3 суток после окклюзии венечной артерии на ЭКГ наблюдаются признаки развившейся ИМ: как правило, отмечается комплекс QS или глубокий зубец Q. В качестве контроля использовали интактных и ложнопериоперированных животных. Ложная операция состояла в торакотомии и подведении лигатуры под артерию без затягивания лигатуры.

Через 4 дня после перевязки коронарной артерии у декапсированных животных выделяли различные регионы мозга (кора больших полушарий мозга, гипоталамус, мозжечок, продолговатый мозг) и ряд висцеральных органов (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, поджелудочная железа, скелетная мышца). Ткани гомогенизировали водой в соотношении 1:2 (масса:объем) и центрифугировали при 5000 об/мин. Из надосадочной жидкости белки осаждали сульфатом аммония в пределах 70—100%. Полученные осадки растворяли в веронал-мединаловом буфере (pH 8,6) и анализировали против воды в течение 48 ч. Лиофилизированные порошки тканевых экстрактов и сыворотки крови использовали в качестве антигена БНС [2]. Анти-сыворотку к БНС, выделенному из гипоталамуса, получали путем

иммунизации кроликов смесью этого комплекса с полным адьювантом Фрейнда по ранее разработанной схеме [10].

Радиоиммунологический анализ проводили с антисывороткой, реагирующей строго специфично с БНС. Метод основан на выявлении комплекса БНС-антитело с помощью хлорамина Т [12] против БНС, меченного ^{125}J . Иодированный БНС отделяли геле-фильтрацией через сефадекс G-25 с элюированием 0,05 М фосфатным буфером, содержащим 1%-ный БСА. Эксперименты проводили по методу Bolton, Hunter [13] с нашими модификациями [10]. Радиоактивность препаратов БНС измеряли на сцинтилляционном счетчике SL 4221 (Франция), рассчитывая величину, характеризующую зависимость между радиоактивностью и количеством связанного БНС. Полученные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Оценка специфичности полученной к бычьему БНС кроличьей сыворотки, разведенной 1 : 1000, была проведена по результатам двойной иммунодиффузии в агаровом геле. По единственной выявленной дуге преципитации мы могли судить об антигенной гомогенности БНС, а по отсутствию таких дуг преципитации при использовании двух других БГК в качестве антигена—о его достаточно высокой специфичности.

В данной работе в качестве антигенного комплекса БНС, как было уже описано выше, были использованы частично очищенные и лиофильно высушенные экстракты тканей крысы, выход которых колебался от 0,1 до 0,3% от сырой массы. При перекрестном иммуноэлектрофорезе кроличья антисыворотка к бычьему БНС положительно реагировала с водорастворимыми антигенными комплексами из мозга интактных животных и крыс с ИМ, что доказывало отсутствие ее видовой специфичности. Реакция преципитации, однако, не выявилась в случае использования в качестве антигенов экстрактов тканей висцеральных органов. Учитывая этот факт, в дальнейшем мы применили более чувствительный метод выявления БНС—РИА с использованием антигена, меченного ^{125}J . Пригодность иммунной сыворотки для РИ экспериментов оценивали по ее способности конкурировать с [^{125}J] БНС за связывание с немеченым антигеном. Так, было показано, что доза немеченого БНС, ингибирующего 50% связывание [^{125}J] БНС составляет примерно 50 нг.

Как уже отмечалось, БНС преимущественно локализован в мозгу. Нейроспецифичность БНС можно установить хотя бы по тому факту, что его содержание в нервной ткани (табл. 1) на три порядка превышает содержание в других тканях (табл. 2). Однако в самом мозгу БНС распределен неравномерно. Наибысшее его содержание отмечается в гипоталамусе, почти вдвое оно меньше в мозжечке, существенно уменьшается количество БНС в коре больших полушарий и про-

долговатом мозгу. Сопоставление определяемых концентраций ИР-БНС в висцеральных органах свидетельствовало об органичной специфичности этого биополимера. В убывающей последовательности содержание БНС выявляется в сердце, скелетной мышце, селезенке, печени. В остальных исследуемых тканях (легкие, почки, поджелудочная железа) нам не удалось обнаружить ИР-БНС. В крови определяемое

Таблица 1

Содержание БНС в мозгу у крыс ($M \pm m$, $n=4$)

Регионы мозга	Уровень БН : на 1 г сырой ткани	
	интактные крысы	крысы с ЭИМ*
Кора больших полушарий	$110,0 \pm 5,0$	$57,0 \pm 1,7$
Гипоталамус	$150,0 \pm 30,0$	$71,00 \pm 2,05$
Мозжечок	$840 \pm 15,0$	$69,0 \pm 4,2$
Продолговатый мозг	$50 \pm 2,0$	$73,0 \pm 6,9$

Примечание. * $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таблица 2

Количество БНС в различных висцеральных органах ($M \pm m$, $n=8$)

Органы	Уровень БНС на 1 г сырой ткани	
	интактные крысы	крысы с ЭИМ*
Сердце	$0,42 \pm 0,09$	$79,0 \pm 8,2$
Легкие	0	$63,0 \pm 4,2$
Почки	0	$77,0 \pm 3,4$
Печень	$0,08 \pm 0,01$	$65,0 \pm 5,6$
Селезенка	$0,23 \pm 0,08$	$79,0 \pm 4,7$
Поджелудочная железа	0	$15,0 \pm 6,2$
Скелетная мышца	$0,41 \pm 0,07$	$69,0 \pm 5,7$

Примечание. * $p < 0,001$ по сравнению с контролем

количество ИР-БНС оказалось равным 10 нг/мл крови, что позволило допустить возможность выброса этого комплекса в общую циркуляцию аналогично нейрофизиновым комплексам [14] при различных условиях, стимулирующих выход кардиотропного нейрогормона «С» [6]. Дальнейший целенаправленный транспорт БНС к органам-мишеням, в частности к сердцу, свидетельствует о его участии в регуляции соответствующих метаболических процессов. В связи с этим было целесообразно изучить распределение БНС при различных сердечных патологиях, в особенности при ИМ.

Как показали результаты исследований в модельных экспериментах у крыс на 4-е сутки после перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии в гипоталамусе и мозжечке происходит резкое уменьшение БНС (табл. 1)—примерно в 20 и 12 раз соответственно.

Слабее уменьшается содержание БНС в коре больших полушарий мозга—в 2 раза. В продолговатом мозгу, наоборот, наблюдается некоторое увеличение содержания БНС. ИМ не только ускоряет высвобождение БНС из мозга, приводя к увеличению его содержания в крови, но и значительно повышает его содержание в ряде органов и тканей. Из висцеральных органов максимальный уровень БНС отмечается в селезенке, примерно в 340 раз превосходящий исходный (табл. 2). Значительное и примерно одинаковое (в 160 и 170 раз) повышение содержания БНС выявляется также в сердце и скелетной мышцах, а также в печени, легких, почках и поджелудочной железе. Данные, приведенные в табл. 2, позволяют заключить об убывающей последовательности уровня иммунореактивного БНС в висцеральных органах у крыс с ИМ: селезенка > сердце > скелетная мышца > печень > почки > поджелудочная железа > легкие. Резкое увеличение содержания БНС в селезенке и сердце у крыс с ИМ по сравнению с таковыми у интактных животных и одновременно опустошение в мозгу предполагает, по-видимому, возникновение при этой патологии нового гомеостатического уровня этого нейроспецифического белок-гормонального комплекса. На основании этих данных можно судить о его реальном участии в метаболических процессах в этих органах при ИМ, направленном в частности, на повышение периферического тканевого, в особенности, миокардиального кровотока. Несомненно, факт увеличения содержания БНС в сыворотке крови, сердце и ряде висцеральных органов недостаточно информативен для установления его влияния при ИМ. Однако, учитывая резкое увеличение БНС в сердце, можно, по-видимому, считать его маркером повреждения миокарда. Кроме того, нельзя не учесть высокую биологическую активность БНС, а именно: эффективное коронарорасширяющее действие, значительное улучшение кровоснабжения сердца в условиях ИМ и, следовательно, увеличение доставки кислорода к сердцу, регуляция обменных процессов в этом органе, и наконец, непосредственное влияние на изолированные клетки сердечной мышцы. Приведенные факты позволяют предположить, что БНС стабилизируют и приостанавливают некротические процессы в миокарде.

DETERMINATION OF THE CONTENT OF NEUROSPECIFIC PROTEIN-HORMONAL COMPLEX IN ORGANISM OF RATS WITH THE EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

GABRIELIAN S. K., SRAPIONIAN R. M., ABELIAN Zh. G., SAHAKIAN S. A.,
SAHAKIAN F. M., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

By means of radioimmunoassay method the distribution of neuro-specific cardioactive protein-hormonal complex (protein-neurohormone ^{125}I -PNC) in rats with experimental myocardial infarction (MI) has

been studied. The cardiac pathology mentioned is accompanied by devastation of PNC in brain, especially in hypothalamus and cerebellum (80 and 12-fold, correspondingly) and by its simultaneous (с. 6—340 fold) increase in a number of visceral organs and in peripheral blood. The data summarized is indicative of decreasing sequence of PNC levels in visceral organs of rats with MI: spleen > heart > skeletal muscle > liver > kidney > pancreas > lungs. The data obtained permit to suggest the appearance of new homeostatic level of PNC at MI.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Докл. АН АрмССР, т. 42, № 4, с. 210—213, 1966.
2. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, (под ред. Бунятына Г. Х.), Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 97—104, 1976.
3. Ga'ouyan A. A., Srapionian R. M. Neurochem. Res., v. 8, № 12, p. 1511—1535, 1983.
4. Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 109—116, 1987.
5. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Медведев Ф. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, № 5, с. 302—306, 1978.
6. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 13, с. 89—98, 1978.
7. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Медведев Ф. А., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 70, №3, с. 182—186, 1980.
8. Ростомян М. А., Абрамян С. С., Галоян А. А., Кровообращение, т. 4, с. 3—8, 1977.
9. Halle W., Srapionian R. M., Oehme P., Ga'ouyan A. B. Acta Biol. Med. Germ. v. 35, p. 265—267, 1976.
10. Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, № 2, с. 20—24, 1985.
11. Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Укр. биох. журн., т. 61, № 3, с. 53—58, 1989.
12. Greenwood F. G., Hunter W. M., Gilwood J. S. Biochem. J., v. 89, p. 114, 1963.
13. Bolton A. E., Hunter W. M. Biochem. J., v. 133, p. 529, 1973.
14. Lang R. E., Huttie W. Acta endocrinology, v. 94, suppl. № 34, p. 56—57, 1980.

Поступила 26 XII, 1990.