

Пептидная карта гипоталамуса человека

А.А. Галоян, С.Г. Чаилян, К.Э. Даниелян, Л.А. Саакян*, В.Т. Карамян*

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

**ЕрГМУ им. М.Гераци*

375044, Ереван, ул. Паруйра Севака, 5/1

Ключевые слова: пептидная карта, гипоталамус, нейропептиды, гель-фильтрация, тонкослойная хроматография, ионообменная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография

Выявление процесса нейросекреции гормонов в магноцеллюлярных ядрах гипоталамуса является неоспоримым фактом эндокринной функции мозга [5–7, 9]. В последние годы из гипоталамуса различных животных нами получен ряд биоактивных соединений полипептидной природы [1–3, 6, 7]. В число этих соединений входят нейропептиды, различные нейротрансмиттеры, а также большое количество иммуномодуляторов, таких как тимозин β_4 , тимозин β_4 (1–39), тимозин β_1 , рецепторы иммуносупрессоров FK-506 (иммунофилин), CsA (циклофилин) и коронароактивные вещества полипептидной природы. Их можно подразделить на три основные группы: коронароактивные нейрого르몬ы К, С, G и их множественные формы; Ca^{2+} -независимые активаторы кальмодулинчувствительных ферментов под общим названием С-модулины; аллостерические модуляторы активности кальмодулина – нейропептиды, условно обозначенные ПФ1–ПФ5. Были разработаны методы очистки этих биоактивных соединений: тонкослойная хроматография (ТСХ), ионообменная хроматография, гель-фильтрационная хроматография и т.д.

В связи с известным фактом синтеза рилизинг-факторов в гипоталамусе интересны сообщения относительно возможного происхождения тиротропин-релизинг гормон ассоциированного пептида - 3, относящегося к так называемым “загадочным” пептидам, не в гипоталамусе, а в висцеральных органах. В последние годы обнаружен гипофизарный пептид, который имеет слабовыраженную Na^+ , K^+ АТФ-азную ингибиторную активность, а также обладает гипертензивным и тахикардальным эффектами [8]. Таким образом, гипоталамус является источником неизвестных гормонов.

Ранее для выделения пептидов из гипоталамуса

нами применялись методы ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, которые имеют ряд недостатков: зональное разделение соединений, длительность процесса, низкие селективность и чувствительность методики.

При разделении пептидных соединений методом ионообменной хроматографии наряду с обменным механизмом в удерживании играет роль также сорбционный эффект на матриксе сорбента, чем и объясняется низкая селективность разделения и зональный выход пептидных соединений.

Использование гель-фильтрации в хроматографии биологических соединений пептидной природы также ограничено из-за мешающей необратимой адсорбции. В ряде случаев этот отрицательный эффект уменьшается путем химической прививки углеродов к поверхности, например пористого стекла. Однако даже подобные модифицированные неподвижные фазы всегда необратимо удерживают часть таких соединений, как окситинин, гемоглобин, каталаза и т.д. Объясняется это, по-видимому, тем, что поверхность носителя сохраняет остаточную активность.

Цель данной работы: используя наиболее подходящую экспериментальную систему, получить из вторичного порошка гипоталамуса человека (ВПГЧ) пептидную карту для выделения в гомогенном виде новых нейропептидов для исследования их структурных особенностей, классификации, а также выявления эволюционной консервативности известных нейропептидов.

Материал и методы

Для выполнения работы использовались шесть

гипоталамусов человека. В эпикризах умерших от различных соматических заболеваний людей отсутствовали неврологические болезни и задержанное коматозное состояние до смерти. Гипоталамическую ткань брали через 6 ч после смерти. От момента смерти до взятия материала все трупы хранились при температуре 5°C.

Для получения вторичного порошка биоактивных соединений пептидной природы гипоталамуса человека ВПГЧ мы руководствовались методом выделения низкомолекулярных биологически активных соединений из гипоталамуса крупного рогатого скота, разработанным А.А. Галояном [4]. Оптимизируя последнюю стадию получения вторичного порошка ГТ с целью освобождения от высокомолекулярных соединений, мы использовали технологию разделения на мембранных фильтрах.

Первые попытки разделения были осуществлены с применением ТСХ. После нингидринового окрашивания и проявки были получены 7 полос шириной 3–4 мм. Однако имея в виду литературные данные относительно количественного содержания пептидных соединений в гипоталамусе, мы попытались выбрать наиболее эффективную систему разделения.

Дальнейшие эксперименты проводили на двухкомпонентной системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Biotronik BT-8100 (ФРГ). Система оснащена инжектором Rheodyne с использо-

ванием петли для образца объемом 50 мкл и детектором с полным сканированием в диапазоне 190–360 нм (Spektromonitor 5000) с компьютерным математическим обеспечением. Для предупреждения образования пузырьков в системе все растворы предварительно дегазировали гелием. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения, поиска и математической обработки данных. На этой системе для решения поставленной задачи была использована гель-фильтрационная колонка "Shodex". Однако, манипулируя всеми возможными параметрами (изменение ионной силы, тип элюента, скорость), мы не получили эффективного разделения. В поисках эффективной системы разделения мы использовали колонки "Biosphere Si-100 C8, C18" и "Biosphere Si-300 C8 и C18" (4,6x250 мм); ("Bioservis", Армения) и "Lichrosphere C18" (ФРГ) для обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Поскольку ВПГЧ содержит биоактивные соединения с большим диапазоном молекулярных масс, их разделение подразумевает применение колонок с дифференциальной пористой структурой. Для выбора оптимальных условий разделения был использован метод греко-латинского квадрата. Эксперименты, проведенные на колонках "Biosphere Si-100 C8 и C18", показали, что хроматография в режиме градиентного элюирования (ацетонитрил-вода, метанол-вода) в присутствии трифторуксусной кислоты (ТФУ) позво-

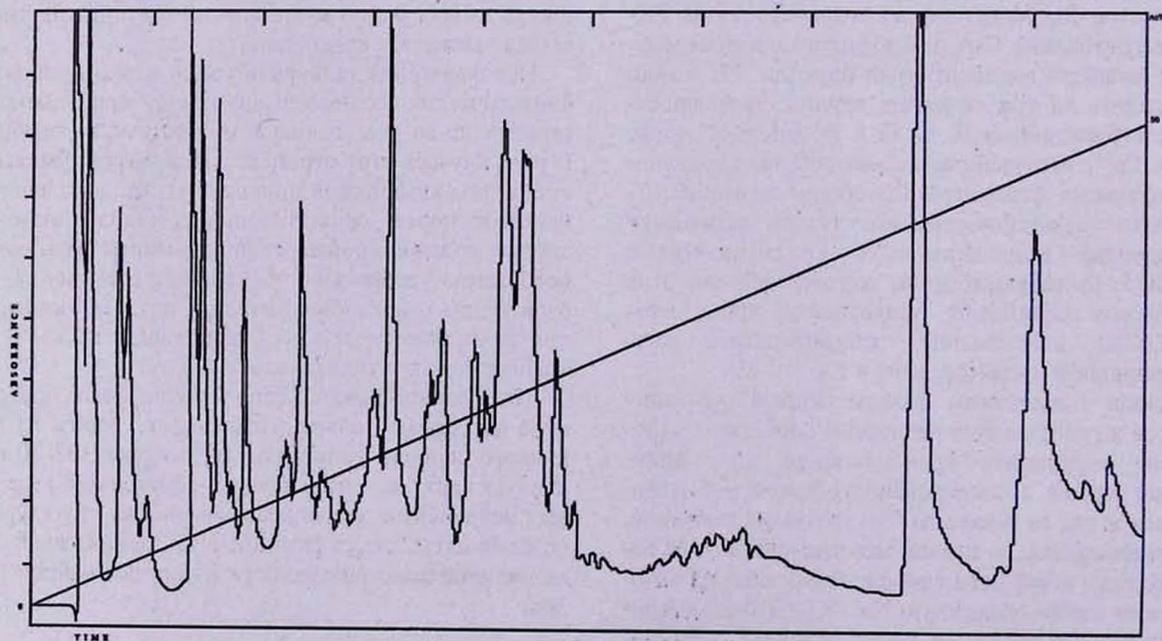


Рис. 1. Пептидная карта ВПГЧ.

Неподвижная фаза: тандемная система обращенно-фазовых колонок "Biosphere Si-100 C8" и "Biosphere Si-300 C18". Элюенты: ацетонитрил / 0,1% раствор ТФУ. Применялось градиентное элюирование со скоростью потока 1 мл/мин. Длительность эксперимента – 80 мин. Детекция осуществлялась при 210 нм.

ляет проводить разделение с высокой эффективностью лишь гидрофобных соединений. Хроматография на колонках "Biosphere Si-300 C8 и C18" в тех же условиях позволяла проводить эффективное разделение менее гидрофобных высокомолекулярных соединений. Следовательно, совмещение сорбентов с дифференциальной пористостью структур было бы наиболее оптимальным, однако оно технически затруднено, поскольку происходит неоднородное распределение сорбентов с дифференциальной пористостью структур.

Результаты и обсуждение

Математический анализ полученных экспериментальных данных, основанный на методе греко-латинского квадрата, позволил оптимизировать про-

цесс хроматографического разделения биоактивных соединений гипоталамуса на тандемной системе обращённо-фазовых колонок "Biosphere Si-300 C8" и "Biosphere Si-100 C18" в режиме линейно-ступенчатого градиентного элюирования с использованием ацетонитрил/вода в присутствии 0,1% ТФУ (рис.1).

На рис. 1 представлена карта ВПГЧ. Как видно из хроматограммы, система тандемных колонок даёт возможность для эффективного выборочного разделения тридцати пиков.

На рис.2 представлена рехроматографическая картина индивидуального соединения, свидетельствующая о гомогенности выделенных соединений, что даёт возможность судить об эффективности вышеописанной методики.

Таким образом, нам впервые удалось разработать методику получения пептидной карты гипоталамуса

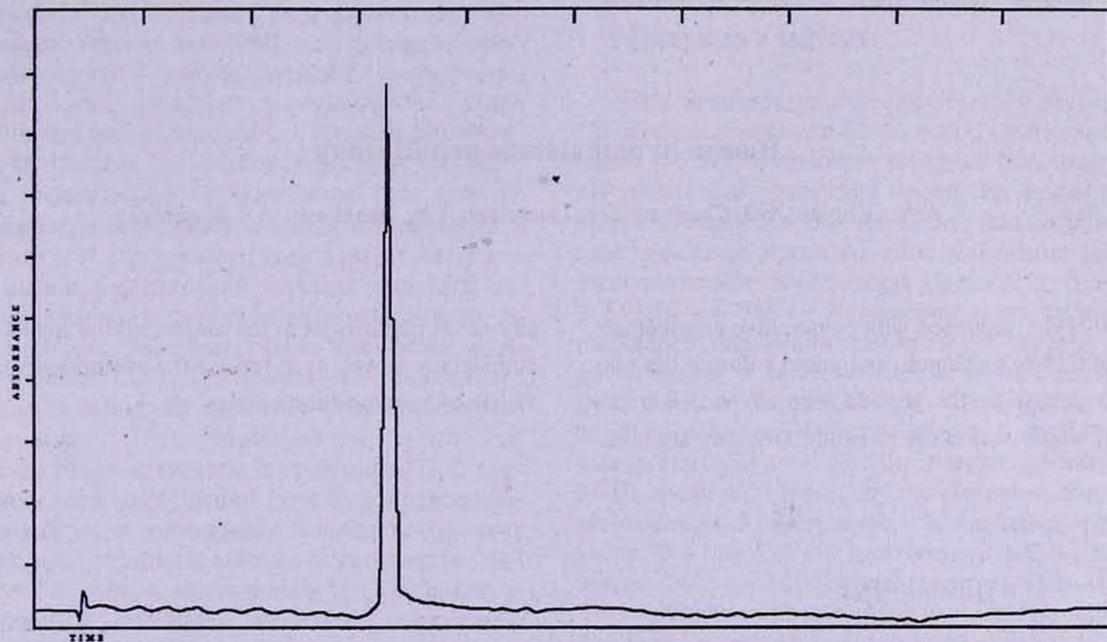


Рис. 2. Рехроматографическая картина соединения N11

Неподвижная фаза: "Lichrosfer C18" (4.6 x 250 мм). Применялось изократическое элюирование со скоростью потока 1 мл/мин. Элюенты: ацетонитрил/0,1% раствор ТФУ (30/70). Детекция осуществлялась при 210 нм.

человека, которая дает возможность с высокой эффективностью из гипоталамуса человека выделять в гомогенном состоянии пептидные соединения для дальнейшего изучения их структуры, свойств, клас-

сификации, а также для выявления эволюционной консервативности известных биоактивных соединений.

Поступила 22.05.02

Մարդու հիպոթալամուսի պեպտիդային քարտեզը

Ա.Ա. Գալոյան, Ս.Գ. Չաիլյան, Զ.Է. Դանիելյան, Լ.Ա. Սահակյան, Վ.Տ. Բարամյան

Կիրառելով ՇՖ ԲԷՀԶ մեթոդը Շ8 և Շ18 աշտարակների հաջորդական դասավորությամբ հնարավորություն ստեղծվեց ստանալ մարդու հիպոթալամուսի պեպտիդային քարտեզը, որը հնարավորություն կընձեռի հիպոթալամուսի մազնոցելյուլար կորիզներից անջատել, նույնա-

կանացնել և դասակարգել նախկինում անհայտ ներդապեպտիդներ, ինչպես նաև ճշգրտել հայտնի ներդապեպտիդների էվոլյուցիոն կայունությունը:

Human hypothalamus peptide map

A.A. Galoyan, S.G. Chailyan, K.E. Danielyan, L.A. Sahakyan, V.T. Karamyan

RP-HPLC equipped with consecutive arrangement of C8 and C18 (4.6x250mm) and guard columns has permitted to determine the peptide map of human hypothalamus, which will allow to isolate, identify and clas-

sify novel peptides from the magnocellular nuclei of hypothalamus as well as to precise the evolutionary conservatism of known neuropeptides.

Литература

1. Galoyan A.A. Moscow: Nauka. 1997.
2. Գալոյան Ա.Ա., Արիկյան Վ.Տ., Մարկոսյան Կ.Ա., Գրեշից Բ.Կ. Нейрохимия, 1998, 15, с. 1.
3. Գալոյան Ա.Ա., Գրեշից Բ.Կ., Լի Մ.Դ. և ծր. Докл. НАН Арм ССР, 1996, с. 117.
4. Գալոյան Ա.Ա. Докл. НАН Арм ССР. 1962, 34, 3, с. 109.
5. Guillemin R. Science, 1978, 202, p. 390.
6. Davtyan T.K., Muradyan E.B., Avanesyan L.A. et al. Neorokhimiya, 1998, 15, p. 45.
7. Markossian K.A., Gurvits B.Ya., Galoyan A.A. J. Neurochemistry, 1997, 69, S202B.
8. Mori M., Yamada M., Satoh T., Murakami M., Iriuchijima T., Kobayashi I. Science, 1978, 202, p. 18.
9. Schally A.V. Science, 1978, 202, p. 18.