

## Предварительное введение препарата галармин в организм предотвращает очаговый некроз миокарда

С.Г. Чаилян, А.А. Галоян, М.С. Назарян, К.Э. Даниелян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА*

*375014 Ереван, ул. П. Севака, 5/1*

**Ключевые слова:** галармин, инфаркт, миокард,  $\alpha$ - $\beta$ -адренорецепторы, протекция, сердечный тропонин I, изадрин, адреналин

В мировой литературе имеются многочисленные данные о функциональных особенностях представителей семейства пролинбогатых пептидов. Одни относят их к пептидам-антибиотикам [6], другие – к пептидам, обеспечивающим защитную функцию слюны.

В лаборатории А. А. Галояна наряду с многочисленными биоактивными соединениями [1], нейрогормонами С, К, G [2] из магноцеллюлярных гранул гипоталамуса (п. supraortic, п. paraventricular) недавно был выделен и изучен новый нейропептид галармин, фрагмент нейрофизина-2 [3], являющийся высокоактивным нейротрофическим фактором, влияющим как на нейроны, так и на глию. Результаты исследований биохимического, иммунологического и физиологического механизмов действия препарата галармин свидетельствуют об универсальных и нейрорегуляторных особенностях этого соединения [4].

Имеются многочисленные данные относительно протекторного, антистрессорного действия простейших пролинсодержащих пептидов [5], являющихся частью многих известных нейропептидов. Однако механизмы протекции подобного типа пептидов изучены недостаточно. Воздействие протекторных агентов может осуществляться центральными механизмами, приводящими к повышению активности симпатической нервной системы при эмоциональном стрессе, при котором происходит увеличение содержания в плазме катехоламинов и их утилизация через адренорецепторы сердца, а также через локальные механизмы, опосредованные нарушением молекулярных биохимических процессов, которые в свою очередь могут быть детерминированы на генетическом уровне. В этом плане представляет интерес изучение вышеуказанного нового нейропептида галармина, что и явилось целью настоящего сообщения.

### Материал и методы

В нашей работе мы рассмотрели влияние галармина

на локальные механизмы повреждения миокарда, используя адреналовую и изодриновую модели. Выбор этих двух моделей, на наш взгляд, должен позволить выявить тип рецептора, посредством которого осуществляется эффект препарата галармин, так как известно, что если изадрин влияет только на  $\alpha$ -адренорецепторы, то адреналин оказывает свое влияние через  $\alpha$ - $\beta$ -рецепторы.

Степень повреждения миокарда оценивалась выбросом сердечного тропонина I (сТnI).

В экспериментах использовались животные массой 150–160 г (самцы).

*Изодриновая модель* заключалась в двукратном в/б введении изодрина (7 мг/100 г массы животного) с интервалом 24 часа. За два часа до введения препарата делали инъекцию препарата галармина.

*Адреналовая модель* проведена однократным введением адреналина (0,4 мг/100 г массы животного) в/б. За два часа до введения препарата делали инъекцию препарата галармин. Количественное определение сТnI осуществлялось на аппарате STRACUS CS фирмы Dade Behring. В основе теста лежит метод, осуществляемый по технологии Radial Partition Immunoassay (RPIA).

### Результаты и обсуждение

Контролем являлось количественное определение сТnI в плазме интактных животных. С помощью адреналовой модели проводилась оценка влияния препарата галармин на  $\beta$ - и  $\alpha$ -рецепторы. Как показали результаты (рис.1, 2), предотвращение выхода сТnI осуществляется при очень низких концентрациях галармина, что свойственно биоактивным соединениям. Из графика (рис.2) видно, что при инъекции препарата галармин в концентрациях от 5 до 12 мкг/100 г массы животных наблюдается подавление выброса маркера повреждения миокарда сТnI на 90% как при адреналовом, так и при изодриновом воздействиях. При этом

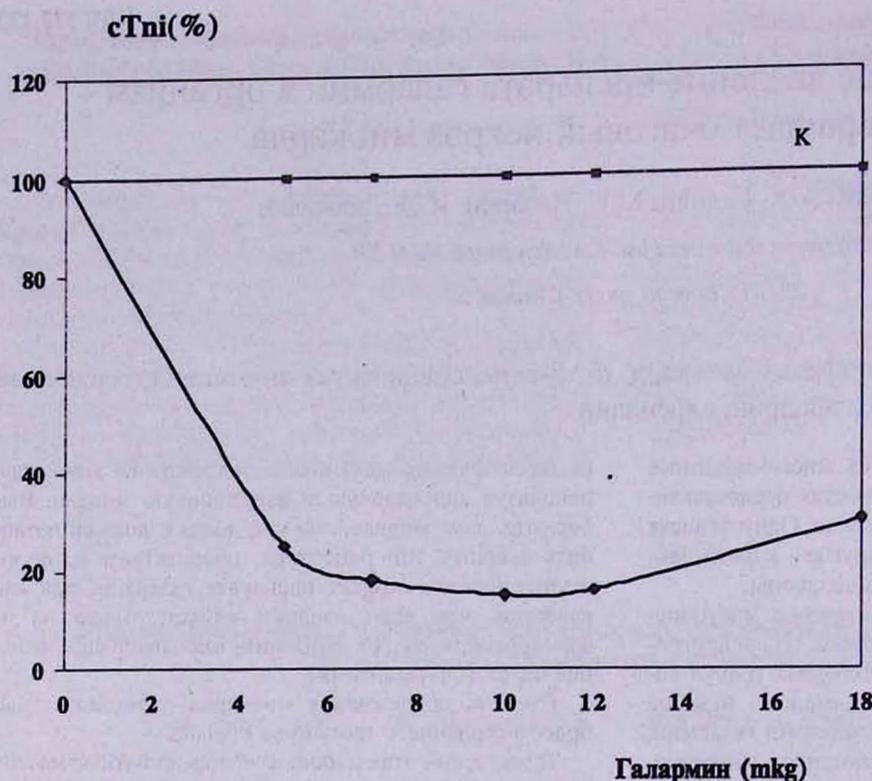


Рис. 1. Дозазависимый эффект препарата галармин на экстракцию сТnI из сердца в общий кровоток при адреналовом некрозе миокарда. Контроль (К) – 100% выброс сТnI (адреналовая модель без предварительного введения галармина).

экстракция сТnI в кровь у контрольных крыс составляла 6 нг/мл (адреналовая модель) и 3 нг/мл в среднем (изодриновая модель). Следует отметить, что уровень сТnI 1,5 нг/мл и выше присущ состоянию, при кото-

ром развивается острый инфаркт миокарда. Наиболее резкое подавление наблюдается при использовании препарата галармин в концентрациях от 10–12 мкг/100 г массы животного.

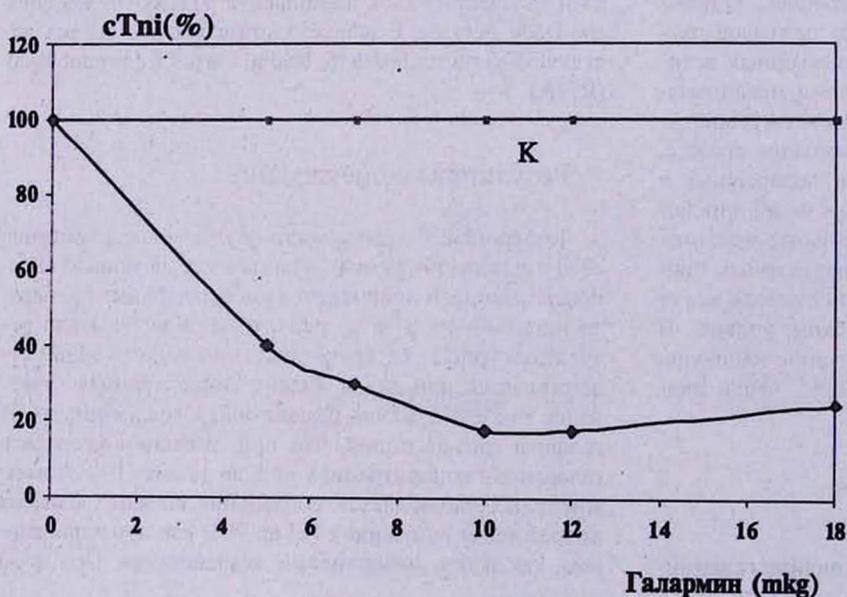


Рис. 2. Дозазависимый эффект препарата галармин на экстракцию сТnI из сердца в общий кровоток при изодриновом некрозе миокарда. Контроль (К) – 100% выброс сТnI (изодриновая модель без предварительного введения галармина).

Фармакологическим и молекулярным клонированием идентифицированы три субтипа  $\alpha_1$ -адренорецепторов:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  и  $\alpha_{1C}$ . Гетерогенность  $\alpha_1$ -рецепторов выражается и в разнообразии подсубтипов рецептора, которые отличаются по своей длине, аминокислотной последовательности С-терминального домена. Количество  $\alpha_{1A}$  - и  $\alpha_{1B}$  -рецепторов у крыс по крайней мере в пять раз [12] выше чем у человека. Именно эти данные в наших экспериментах объясняют увеличение пиков выхода сТпI приблизительно в два раза при адреналом повреждении миокарда по сравнению с изодриновым, что может явиться прямым доказательством взаимодействия препарата галармин с  $\alpha_1$ -рецепторами. Функциональная роль  $\alpha_1$ -рецепторов была широко изучена на миокарде млекопитающих. Миокардиальный  $\alpha_1$ -рецептор может нести ответственность не только за активирование фосфолипазы С и фосфолипазы D, но и за регуляцию ионного транспорта, в частности ионов  $Ca^{2+}$  (L-тип  $Ca^{2+}$ -каналов), медленного транспорта  $K^+$  ионов, за ацетилхолинзависимые  $K^+$ -каналы. Более того, через  $\alpha_1$ -рецепторы могут быть активированы  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азы, а также  $Na^+/K^+$  обмен.

Комплексное воздействие всех этих механизмов на  $\alpha_1$ -рецепторы приводит к ярко выраженному положительному инотропному эффекту [9,11].

$\alpha_2$ -адренорецепторы у человека существуют в трех разных формах:  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ . Предполагается, что  $\alpha_2$ -рецепторы ингибируют выброс норадреналина в сердечной мышце миокарда человека при повышенной активности симпатической нервной системы.

Клонированы и фармакологически идентифицированы три субтипа  $\beta$ -адренорецепторов (рецепторы ассоциированные с гуанозинтрифосфатсвязывающим протеином):  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , возможно существование  $\beta_4$ -субтипа [10].

Контролирующим звеном сокращения миокарда являются фосфоламбан и сТпI, которые позволяют сердцу регулировать работу согласно гемодинамическим требованиям.  $\beta$ -адренергический путь фактически включает фосфорилирование фосфоламбана и сТпI, а также  $Ca^{2+}$ -каналов саркоплазматического ретикула и определяет инотропное состояние миокарда. Активация  $\beta_2$ -рецепторов ведет к стимуляции аденилатциклазы, увеличению ц-АМФ, активации протеинкиназы А и фосфорилированию контролирующего сокращение протеинов в миофиламенте. Фосфорилирование фосфоламбана, сТпI,  $Ca^{2+}$ -каналов приводит к более выраженному выбросу и аккумулярованию  $Ca^{2+}$ . В результате происходит более быстрое и сильное сокращение миокарда. Количественное соотношение  $\beta_1/\beta_2$ -адренорецепторов в предсердиях и желудочках сердца человека составляет 60–70 / 30–40% и 70–80 / 20–30% соответственно [8].

Несмотря на то, что количество  $\beta_1$ -рецепторов значительно превышает количество  $\beta_2$ -рецепторов, функциональная активность, опосредованная  $\beta_1/\beta_2$ -рецепторами, одинакова. Возможно, это объясняется тем фактом, что сердечные  $\beta_2$ -рецепторы эффективнее взаимодействуют с аденилатциклазой, чем  $\beta_1$ -рецепторы.

Так как большинство механизмов регуляции со-

### Protective properties (%)

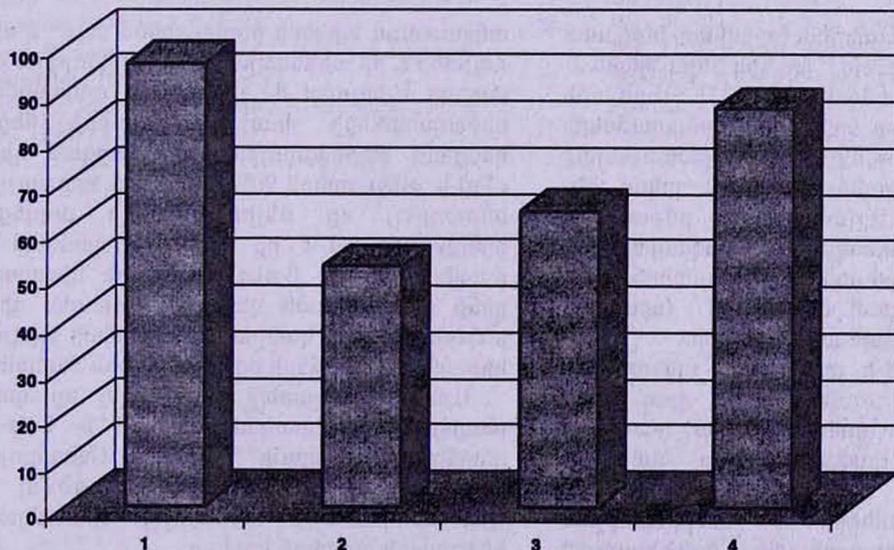


Рис. 3. Подавление выброса сТпI при воздействии блокаторов  $\beta$ -адренорецепторов:  
1 – контроль (интактные животные), 2 – пропранолол, 3 – карведилол, 4 – галармин

кращения миокарда осуществляется при задействовании  $\beta_1$ -рецепторов, то второй цикл экспериментов проводится на изодриновой модели, для ответа на вопрос: реализуется ли действие препарата галармин как через  $\alpha$ -, так и через  $\beta$ -рецепторы. В наших экспериментах на изодриновой модели при в/б введении препарата галармин в дозе 5–12 мг на 100 г массы крысы мы получили 90% предотвращение выброса cTnI, что указывает на полное подавление повреждения миокарда.

Так как изодрин осуществляет положительный инотропный эффект преимущественно через  $\beta_1$ -рецепторы, то можно предположить, что действие препарата галармин осуществляется блокированием как  $\alpha_1$ -, так и  $\beta_1$ -рецепторов.

При введении галармина в организм крысы из расчета 100мкг / 100г массы наблюдается обратный эффект, то есть стимуляция повреждения миокарда адреналовой моделью в 4–5 раз превышает контроль (введение в организм адреналина), а в случае изодриновой модели – в 2 раза.

При воздействии только галармина на крыс (100 и 25мкг / 100 г массы) уровень cTnI в плазме крови соот-

ветствовал контролю. Так как хронически симпатический эффект на сердце опосредуется у пациентов через  $\beta$ -адренорецепторы, весьма логично предположить, что применение препарата галармин при различных сердечных патологиях может привести к улучшению состояния.

Существует ряд механизмов, объясняющих положительное действие антагонистов  $\beta$ -адренорецепторов: восстановление чувствительности [16], уменьшение активности  $G_1$  - белков, что соответственно уменьшает инотропный эффект [14], понижение активности GRK2 (ассоциированная с G-белком рецепторная киназа-2) [7], восстановление сократительных функций сердца посредством уменьшения значения соотношения сила / частота сокращения согласно феномену Боудитч-Трепа [15].

Для выяснения механизма действия галармина необходимо проведение дальнейших экспериментов, однако наблюдаемый дозависимый эффект пептида свидетельствует о преимуществе последнего как биогенного соединения, по сравнению с положительным эффектом антагонистов  $\beta_2$ -рецепторов – карведилола, пропранолола (рис.3).

Постуила 29.08.02

### Գալարմին դեղամիջոցի նախնական ներմուծումը օրգանիզմ կանխում է սրտամկանի օջախային նեկրոզը

Ս.Գ. Չախյան., Ա.Ա. Գալոյան.,Մ.Ս. Նազարյան., Զ.Է. Դանիելյան

Ուսումնասիրվել է գալարմինի (սրտի ինոտրոպ հարուստ պեպտիդ, որը ներկայացնում է իրենից մեյրոֆիզին 2-ի ճեղքման արգասիք և անջատվել է Ա.Ա. Գալոյանի լաբորատորիայում խոշոր եղջերավոր անասունների հիպոթալամուսի մեյրոսեկրետոր գրանուլներից ազդեցությունը սրտամկանի վնասման լուրջ մեխանիզմների վրա: Աշխատանքի ընթացքում օգտագործվել են ադրենալային և իզոպրոտերենոլային մոդելներ: Սրտամկանի վնասման աստիճանը որոշվել է արյան մեջ cTnI (սրտային տրոպոնին I) քանակության անջատմամբ:

Պարզվել է, որ cTnI-ի լիակատար անջատումը արյան մեջ կանխվում է գալարմինի շատ ցածր (10մկգ /100գ կենդանու զանգվածի վրա) կամ շատ բարձր (100 մկգ/100գ զանգվածի վրա) կոնցենտրացիաների դեպքում, որը բնորոշ է քիտակտիվ, հորմոնալ միացություններին: Ի տարբերություն իզոպրոտերենոլայինի, սրտամկանի ադրենալային վնասվածքի դեպքում տեղի է ունենում cTnI-ի

անջատման պիկերի բարձրացում մոտ 2 անգամով: Հայտնի է, որ ադրենալինը ի տարբերություն իզոպրինի ազդում է ինչպես  $\beta$ -, այնպես էլ  $\alpha$ -սրտամկանային ռեցեպտորների վրա: Գալարմինի ներարկման դեպքում ադրենալային համակարգում դիտվում է cTnI-ի անջատման 90% կանխում, որը թույլ է տալիս ենթադրել, որ մեյրոսեկրետի ազդեցությունը իրականացվում է իր ինոտրոպ դրական էֆեկտի մասնավորապես  $\beta$ -ռեցեպտորների միջոցով: Իզոպրինի ազդեցության դեպքում մույնպես դիտվում է ինֆարկտի լրիվ կանխում գալարմինի արդյունավետ կոնցենտրացիաների օգտագործման ժամանակ:

Այսպիսով, կարելի է պնդել որ գալարմինի ազդեցությունը իրականացվում է  $\beta$ - և  $\alpha$ -ռեցեպտորների բոլորային միջոցով: Հետագայում գալարմինը կարող է օգտագործվել որպես անտագոնիստային դեղամիջոց սրտամկանի սուր ինֆարկտի բուժման համար:

## Preliminary administration of PRP into the organism prevents the development of acute myocardial infarction

S.G.Chailyan., A.A. Galoyan., M.S. Nazaryan., K.E. Danielyan

During the last 20 years our studies have convincingly demonstrated that long-term treatment of patients with heart failure with  $\beta$ -adrenoreceptor antagonists has a beneficial effect. However, most of the antagonists are not native compounds by their nature and the work with them is difficult because of the negative effect revealed during in vivo experiments. Taking into account the latter, it is clear that working with biogenetic, native compounds has its advantages.

The main aim of this work is to reveal the PRP (prolin rich protein which has been isolated in A.A. Galoyan's laboratory from hypothalamic neurosecretory granules and is a product of the neurophizin 2 splitting) doze-

dependent influence on acute myocardial infarction.

In our works we have used myocardial infarction models obtained by injection of appropriate concentrations of adrenalin or isoproterenol into rat organism. Myocardial injury level has been checked by quantitative determination of cTnI using ELISA.

It has been established that PRP pretreatment protects the rat organism from acute myocardial injury. The data obtained allow to suppose that PRP realizes its effect through  $\alpha$ - and  $\beta_1$ -adrenoreceptors. In the future PRP can be used as an adrenoreceptor antagonistic preparation in treatment of patients with acute myocardial injury.

### Литература

1. Galoyan A.A., Gurvits B. Ya., Shuvalova L.A. et al. Neurochem. Res., 1992., 17, 8, p.773.
2. Galoyan A.A. Dokl. Acad. Nauk Arm SSR., 1964, 38, 5, p. 305.
3. Markossian K.A., Gurvits B. Ya., Galoyan A.A. Нейрохимия, 1997, 16, 1, с.22.
4. Galoyan A.A., Kipriyan T.K., Sarkissyan J.S. et al. Neurochem. Res., 2000, 25, 6, p.791.
5. Абрамова М.А., Самонина Г.В., Ашмарин И.П. Нейрохимия, 1996, Н13(3), с. 53.
6. Agerberth B., Gunne H., Odeberg J. et al. Vet. Immunol. Immunopathol., 1996, 54 (1-4), p.127.
7. Bhargava V., Shabetai R., Mathidsen R.A. et al. Am. J. Cardiol., 1998, 81, p.1130.
8. Brodde O. E. Pharmacol. Rev., 1991, 43, p. 203.
9. Endoh M., Tamura K., Hashimoto K. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1970, 175, p. 377.
10. Kaumann A.J. Br. J. Pharmacol., 1996, 117, p. 93.
11. Kissling G., Blickle B., Ross C. J. Physiol.(Lond.), 1997, 499, p.195.
12. Price D.T., Chari R.S., Berkowitz D.E. Mol. Pharmacol., 1994a, 46, p. 221.
13. Peters S.L.M., Batink H.D., Michel M.C. Br. J. Pharmacol., 1998, 123, p. 952.
14. Ping P., Gelzer-Bell R., Roth D., Insel P.A., Hammond H.K. J.Clin. Invest., 1995, 95, p.1271.
15. Robert N. Willette, Nambi Aiyar, Titan-Li Yue et al. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999, 289, p.48.
16. Sigmund M., Jakob H., Becker H. Eur. J. Clin. Pharmacol., 1996, 51, p. 127.