

УДК 577, 171

О коронаросуживающем кардиотропном пептидном факторе гипоталамуса

М.Ш.Мурадян, А.А.Галоян

*Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: гипоталамус, пептид, нейрогормон, ИБС, гемостаз

В нейросекреторных клетках гипоталамуса синтезируются не только рилизинг гормоны, но и кардиотропные нейрогормоны – специфические регуляторы сердечного кровообращения и сердечно-сосудистой системы в целом.

На протяжении более двух десятков лет А.А.Галояном и сотрудниками был изучен широкий спектр фундаментальных возможностей новой семьи гипоталамических нейрогормонов “К”, “С”, “G”. Установлена высокая активность физиологического действия исследуемых веществ на сердечно-сосудистую систему [1-3].

Как показывают наши исследования, в гипоталамусе синтезируются не только коронарорасширяющие, но и коронаросуживающие пептидные соединения [5, 6].

Из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса впервые ионообменной хроматографией на амберлите марки Бекман 15А был выделен кардиотропный пептидный фактор (КПФ), обладающий мощной коронаросуживающей активностью.

Предполагается, что повышение количества этого полипептида в крови может привести к усугублению сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ИБС, что может привести к внезапной смерти, прямо зависящей от спазма сосудов сердца в связи с низким уровнем кислородного резерва в коронарном русле. Количественное определение содержания в крови кардиоактивных КПФ может указывать на глубину патологий, связанных с нарушениями сердечно-сосудистой деятельности, и может быть использовано в биохимических лабораториях кардиологических клиник при разработке вопросов профилактики и ранней диагностики этих патологий, а методы по выделению кардиоактивных нейрогормонов могут послужить основой для разработки и использования их в качестве препаратов при лечении ишемических болезней сердца (острый инфаркт миокарда, стенокардия и т.д.). Представленные нами данные могут помочь клиницистам

заранее определить наличие вышеуказанных полипептидов в крови больных, страдающих ИБС, и оказать соответствующую клиническую помощь.

Целью данной работы являлось всестороннее изучение этого пептида, исследование биохимических механизмов ишемической болезни сердца и создание эффективного препарата для изучения нейрогормональных механизмов спазматических болезней, лечения сердечно-сосудистых и геморрагических болезней сердечно-сосудистой системы.

Материал и методы

Кардиоактивные соединения гипоталамуса выделяли с помощью экстракции гипоталамической ткани по методу, описанному нами ранее [1, 2].

В качестве исходного сырья использовали гипоталамическую часть мозга крупного рогатого скота (бык, корова) независимо от возраста и породистости.

Сразу после декапитации животных свежеизвлечённую гипоталамическую часть тщательно очищали от оболочки (кровеносных сосудов, плёнки), промывали холодной дистиллированной водой. Очищенные гипоталамусы предварительно измельчали ножницами и гомогенизировали стеклянным гомогенизатором 0,25% уксусной кислотой из расчёта 1 л на 1 кг гипоталамуса. Гомогенизацию проводили при температуре 80° С в течение 30 мин.

Экстракт центрифугировали при 8 000-10 000 об/мин в течение 30 мин и отделяли верхний надосадочный слой – супернатант, а осадок, где находились крупные частицы, выбрасывали.

К первичному супернатанту добавляли 96° этиловый спирт в соотношении (1:5), тщательно взбалтывали и оставляли в холодильнике на 12 часов. Смесь первичного супернатанта с этиловым спиртом центрифугировали при 8 000-10 000 об/мин в течение 30 мин и снова отделяли супернатант обычным способом.

Для удаления липидов в эту жидкость добавляли хлороформ (1:5) и оставляли в холодильнике на ночь. Верхний слой декантировали. После удаления спирта и хлороформа водный раствор лиофилизировали на аппарате КС-30.

Лиофильно высушенный вторичный порошок в количестве 20 мг, который соответствует 570 мг свежей ткани гипоталамуса, растворяли в 2 мл 0,2 N аммоний-ацетатного буфера, рН 2,2, раствор наносили на колонку (размер колонки 0,9 x 15 см), заполненную амберлитом марки «Бекман» 15А. Элюцию проводили 0,3 N аммоний-ацетатным буферным раствором, рН 5,3. Скорость элюции составляла 5 мл/10 мин при температуре 50° С. Собирали фракции по 5 мл.

В результате этих разделений в одной из полученных фракций 11 (рис.1) было выявлено мощное коронаросуживающее свойство, которое начинается через 15-20 минут и длится 2,5 и более часов.

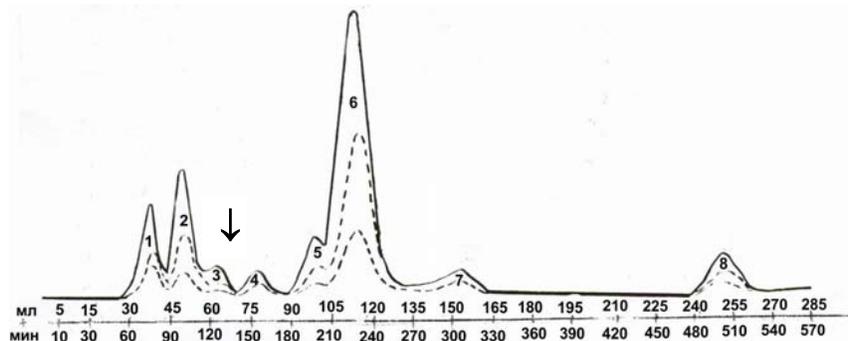


Рис.1. Хроматограмма основных свободных аминокислот и пептидов гипоталамуса крупного рогатого скота: 1 – лизин, 2 – гидроксизин 3 – коронаросуживающие пептидные факторы (КПФ), 4 – гистидин, 5 – х, 6 – NH₃, 7 – х, 8 – аргинин. Коронаросуживающие вещества выходят в объёме 50-55 мл буферного раствора (фракция 11 по 5 мл)

Коронаросуживающие вещества, КПФ, выходят в объёме 50-55 мл буферного раствора 11 фракции по 5 мл (которые соответствуют 10 биологическим дозам). Полученную фракцию высушивали на аппарате КС-30.

Активность фракции в отношении коронарного кровообращения проверяли на наркотизированных уретаном с хлоралозой кошках *in situ* по методу Кавериной Н.В. [4]. Сущность метода заключается в измерении объёмной скорости кровотока, проходящего через венозные сосуды сердца за единицу времени до и после введения препарата. Через 20 мин после внутривенного введения 11 фракции в дозе 50 мкг/кг массы животного, наблюдается постепенное уменьшение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца кошки в течение 2,5-3 часов. При этом кровяное давление не подвергается особым изменениям (рис.2). Этот факт свидетельствует о том, что выделенный пептид не является вазопрессинном и ангиотензином.

Таким образом, под коронаросуживающим влиянием КПФ количество крови, оттекающей из венозного синуса сердца за единицу времени, в динамике полностью соответствует изменению тонуса венозных сосудов сердца (средние данные 10 опытов).

Для дальнейшей очистки с целью получения гомогенного вещества сухая фракция 11 была подвергнута полупрепаративному и аналитическому разделению методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращённой фазе. Полупрепаративное разделение осуществ-

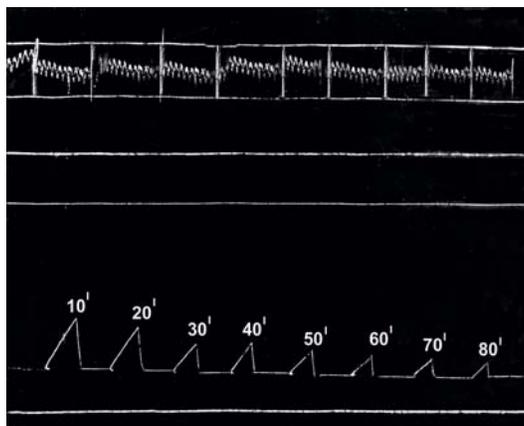


Рис.2. Активность N11 фракции в отношении коронарного кровообращения на наркотизированных уретаном с хлоралозой кошках, по методу Н.В.Кавериной. Как видно из рисунка, через 20 мин после внутривенного введения пептида в дозе 50 мкг/кг массы животного наблюдается постепенное уменьшение количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца кошки и этот эффект продолжается 2,5-3 час, при этом кровяное давление не подвергается особым изменениям. Сверху вниз: кровяное давление; отток крови из коронарного синуса, высота столбиков соответствует объемной скорости кровотока

ляли на колонке Lichrosorb RP-8 (1,6 x 25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Knavet», ФРГ) с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1% CF_3COOH (время изменения градиента – 1,5 часа), скорость элюции – 3 мл/мин.

В результате деления получено 8 пиков. В пике 3 была обнаружена биологическая активность, обладающая мощным коронаросуживающим действием (рис.3). Эта фракция лиофилизована и подвергнута рехроматографии на колонке Nucleosil C_{18} (0,46 x 25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Muchetey–Nagel», ФРГ) с использованием градиента концентрации ацетонитрила от 5 до 60% в 0,1% CF_3COOH (время изменения градиента – 1 час, скорость элюции – 1 мл/мин). Пептид детектировали при 220 нм.

В результате этого разделения в пике фракции 3 была обнаружена биологическая активность, обладающая мощным коронаросуживающим действием – 300% (рис.4).

Для проверки гомогенности полученного препарата мы использовали следующие методы: высоковольтный бумажный электрофорез FN-15, буфер – уксусная кислота – муравьиная кислота (2:1), pH 1,9 и 0,5, при комнатной температуре в течение одного часа 2500 В, 60 А ($R_f=0,11$). Применяли нисходящую хроматографию на бумаге FN-11, растворитель бутанол – уксусная кислота–вода (4:1:5), $R_f=0,12$.

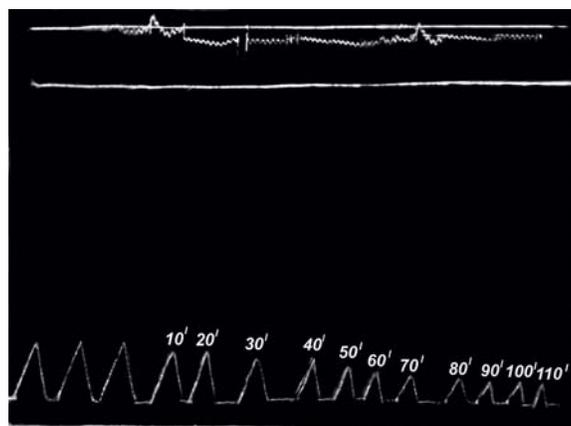


Рис.3. Для дальнейшей очистки КПФ сухая фракция 3 подвергнута полупрепаративному и аналитическому разделению методом высоковольтной жидкостной хроматографии (ВЖХ) в обращённой фазе на колонке Lichrosorb с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1% CF_3COOH

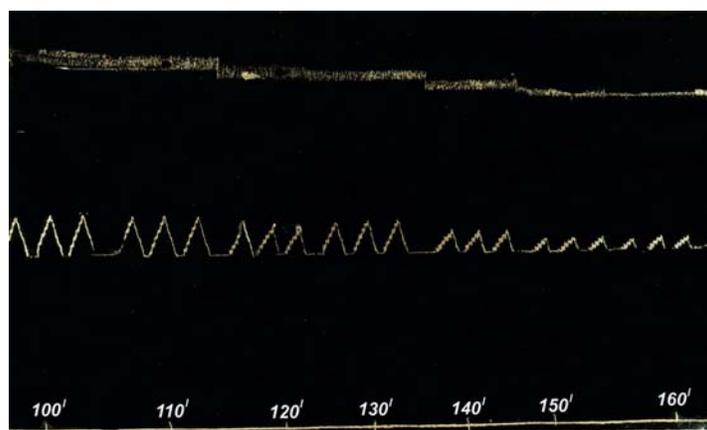


Рис.4. После очистки ВЖХ фракция 3 высушена и подвергнута рехроматографии на колонке Nucleosil C_{18} с использованием градиента концентрации ацетонитрила от 5 до 60% в 0,1% CF_3COOH . Пептид детектировали при 220 нм

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах Silufol UV 254, в системе метанол–хлороформ–вода (1:8:5) в течение 2 час ($R_f=0,27$). В опытах использовали 50 мкг КПФ.

Хроматограммы проявляли 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Согласно данным высоковольтного бумажного электрофореза, нисходящей и тонкослойной хроматографии, получен гомогенный КПФ. Для выяснения пептидной природы вещества КПФ подвергали кислотному гидролизу в 6 N HCl при 110°C в течение 21-24 часов, щелочному

гидролизу в 1 N NaOH при комнатной температуре в течение 24 часов. Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в 0,1 N аммоний-бикарбонатном буфере, pH 8, при 37°C в течение 1-24 час. Соотношение фермент/субстрат поддерживали 1:80. Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом.

Во всех случаях гидролиза происходит исчезновение биологической активности, свидетельствующее о том, что вышеуказанное вещество имеет пептидную природу.

Аминокислотный анализ кардиоактивных соединений определяли после гидролиза препарата на аминокислотном анализаторе D-500-США. Полученные данные показывают, что в составе КПФ находятся, в основном, лизин, гидроксизин, NH₂, гистидин, аргинин. По коэффициенту распределения на хроматографической бумаге, по фармакологическому действию полученное вещество отличается от ранее обнаруженных коронаросуживающих и коронарорасширяющих веществ и является низкомолекулярным нингидринположительным соединением, обладающим щелочным свойством.

Результаты и обсуждение

Успехи современной нейроэндокринологии обусловлены достижениями в раскрытии нейрохимических аспектов взаимодействия нервных и гормональных факторов регуляции, среди которых важное значение приобретает вопрос о молекулярных механизмах взаимодействия гормонов с медиаторами и модуляторами синаптической передачи. Открытие пептидных биорегуляторов явилось перспективным достижением молекулярной биологии, физиологии, биохимии и медицины.

Одним из актуальных вопросов, связанных с проблемой нейропептидов, является их функциональная роль и способ воздействия на нейрональные процессы сердца, оказывающих, тем самым, модулирующее действие на биологические реакции сердца.

Исходя из вышесказанного, в нашем исследовании мы попытались всесторонне изучить роль КПФ в нейрональных механизмах спазматических болезней сердечно-сосудистой системы, поскольку предполагается, что повышение количества этого пептида в крови может привести к усугублению сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ИВС, которое может привести к внезапной смерти, что прямо зависит от спазма сосудов сердца в связи с низким уровнем кислородного резерва в коронарном русле.

Предоставленные нами данные могут помочь клиницистам заранее определить наличие вышеуказанных полипептидов в крови у больных, страдающих ИВС, и оказать соответствующую клиническую помощь.

Нами разработан метод, позволяющий с помощью пептида вызывать новую модель ишемической болезни сердца, которую можно использовать в лабораториях для получения острого малокровия сердечной мышцы, имеющей, в свою очередь, актуальное значение в области медицинской диагностики.

У больных стенокардией определено увеличение в крови вышеуказанной сосудосуживающей фракции разработанным нами методом. Тем самым, мы можем говорить об эффективном лекарственном средстве для лечения ишемической болезни сердца.

Резюмируя многочисленные данные, можно сделать вывод, что нейроспецифические пептидные биорегуляторы являются эффективными маркерами ряда патологических состояний сердечно-сосудистой системы.

Поступила 17.07.12

Կարդիոակտիվ անոթասեղմիչ պեպտիդի վերաբերյալ հիպոթալամուսում

Մ.Շ.Մուրադյան, Ա.Ա.Գալոյան

Ինչպես ցույց են տալիս մեր կողմից կատարված աշխատանքները, հիպոթալամ-նեյրոհիպոֆիզար համակարգում, բացի մինչ այժմ հայտնի կարդիոակտիվ միացություններից, սինթեզվում է հիմնային բնույթի հզոր անոթասեղմիչ անհայտ պեպտիդային միացություն, որն իր սրտի անոթների վրա թողած ազդեցության մեխանիզմներով, ֆիզիկա-քիմիական և կենսաբանական հատկություններով տարբերվում է նախապես հայտնի նմանատիպ միացություններից և ունի առանձնահատուկ նշանակություն սրտի սպազմատիկ հիվանդությունների և հատկապես ինֆարկտի պայմաններում: Պեպտիդի ազդեցությունը կատոնների վրա *in situ* տևում է 2,5-3 ժամ, և, ի տարբերություն մի շարք հայտնի անոթասեղմիչ այլ միացությունների, արյան ճնշման վրա էական ազդեցություն չի գործում: Մեր կողմից կատարված ուսումնասիրությունները թույլ են տալիս բժիշկներին վաղորոք որոշել վերը նշված պեպտիդի առկայությունը հիվանդի արյան մեջ, որը թույլ կտա նախօրոք ախտորոշել հիվանդությունը և ցույց տալ համապատասխան անհետաձգելի բժշկական օգնություն հիվանդին:

Մեր կողմից մշակվել է սուր սակավարյունության փորձարարական մոդել լաբորատոր պայմաններում, որը կարող է ունենալ ակտուալ նշանակություն սպազմատիկ հիվանդությունների հետազոտման, բուժման և կանխարգելման համար: Այս տեսակետից տեսական և գործնական մեծ նշանակություն ունի այս պեպտիդային

միացության անջատումը, կլինիկայում նրա քանակական փոփոխությունների դինամիկայի ուսումնասիրությունը, որը հնարավորություն կընձեռի բացահայտել նրա ֆիզիոլոգիական ազդեցության մոլեկուլյար մեխանիզմները:

Պեպտիդի անջատման, մաքրման և իդենտիֆիկացման համար մեր կողմից մշակվել են տարբեր մեթոդներ՝ թղթային քրոմատոգրաֆիա, հել-ֆիլտրացիա, իոնափոխանակիչ սյունային հեղուկ քրոմատոգրաֆիա, նրբաշերտ հեղուկ քրոմատոգրաֆիա, բարձր վոլտային հեղուկ քրոմատոգրաֆիա:

On cardioactive contractile peptide in the hypothalamus

M.Sh. Muradyan, A.A.Galoyan

According to our previous studies a new base type unknown peptide compound is synthesized with sound contractile function in the hypothalamus-neurohypophyseal system besides the known up to present cardioactive compounds. It differs from the known similar compounds by the mechanisms of impact on cardiac vessels, as well as its physical, chemical and biological properties, and possesses unique significance in the pathogenesis of cardiac spasmodic diseases, namely of myocardium infarction. The peptide effect on cats in situ continues for 2,5 h and more. Unlike other known contractile compounds, it does not induce significant effect on blood pressure. Studies carried out by us allow the physicians to make a preliminary estimation of the indicated peptide in the patient's blood which will promote early diagnosis and arrangement of the corresponding urgent medication.

In laboratory conditions we have succeeded to elaborate an experimental model inducing an acute blood anemia, which is important for studying the spasmodic diseases, their treatment and prevention. In this respect the isolation of this peptide in clinics and study of the quantitative changes dynamics will allow to reveal the molecular mechanisms of its physiological effect, which is of a theoretical and applicable significance.

We have elaborated different methods for peptide isolation, purification and identification using paper chromatography, gel filtration, ion-exchange column liquid chromatography, thin-layer liquid chromatography and high-voltage liquid chromatography

Литература

1. *Галоян А.А.* Выделение новых биологически активных соединений из гипоталамо-нейрогипофизарной системы. ДАН АрмССР, 1962, т.34, 3, с. 109.

2. *Галоян А.А., Мурадян М.Ш., Демирчян Дж.К.* Способ выделения низкомолекулярных биологически активных веществ из гипоталамуса крупного рогатого скота. Изобретение. Авт. св. N496034, 1975 г., Москва.
3. *Галоян А.А., Мурадян М.Ш., Алексанян Р.А.* Способ получения средства, обладающего коронарорасширяющим действием. Авт. св. N1176474, 1985 г.
4. *Каверина Н.В.* Фармакология и токсикология, М., 1958, 1, с.39.
5. *Мурадян М.Ш., Галоян А.А.* Выделение, очистка и некоторые физико-химические характеристики нового коронаросуживающего нейропептида гипоталамуса крупного рогатого скота. Тезисы докл. III Всесоюзной конференции по нейроэндокринологии, Харьков, 1988, с.166.
6. *Muradian M.Sh., Galoyan A.A.* The use of new coronary constrictory peptides at the early diagnosis of ischemic disease of heart. Int. Symposium "The European Heart House", Abstract, 1997, May 15-17, Kopenhagen, Denmark.