

И. А. Чернова¹, Д. В. Жилинский², Н. И. Чалисова³, Л. К. Шатаева¹

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ТЕЛЯТ И ОЦЕНКА ИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ И СТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

¹ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Россия, Санкт-Петербург.

² Биофармацевтическая компания ЗАО "Биокад", Россия, Санкт-Петербург.

³ Институт физиологии им И. П. Павлова РАН, Россия, Санкт-Петербург.

Разработан метод выделения смеси пептидов из головного мозга телят экстрагированием водным раствором уксусной кислоты с последующим фракционированием экстракта тангенциальной микрофильтрацией и твёрдофазной экстракцией. Выделенная смесь пептидов содержит компоненты с молекулярными массами от 0,1 до 3 кДа. Из этой смеси методом ионообменной хроматографии низкого давления на сульфокатионите Dowex 50WX8 выделен индивидуальный пептид, состоящий из 5 аминокислот: Arg, Lys, Gly, Ser, Leu. Биологическую активность полученного пептида оценивали в органотипической культуре эксплантатов мозга крыс линии "Вистар". Показано, что пептид проявляет выраженную тканеспецифическую и стимулирующую активность по отношению к эксплантатам мозга, превышающую активность коммерческих препаратов кортексин и церебролизин.

Ключевые слова: кора головного мозга; тангенциальная микрофильтрация; трековая мембрана; твердофазная экстракция; низкомолекулярные пептиды; ВЭТСХ; органотипическая культура эксплантатов.

Головной мозг является наиболее сложной биологической структурой, которая выполняет регуляторную и интегрирующую роль по отношению к процессам, протекающим внутри целостного организма. Основными структурно-функциональными единицами головного мозга являются нейроны, образующие между собой сложные межнейронные связи, которые определяют регуляторное влияние мозга на определённые функции организма. Органопрепараты и пептидные препараты, выделенные из мозга, применяются в медицине для лечения заболеваний нервной системы: кортексин, церебролизин, актовегин. Активными компонентами таких препаратов являются низкомолекулярные пептиды, масса которых не превышает 10 кДа [1 – 7].

Представленная статья посвящена использованию современного оборудования и мембранных материалов для выделения и фракционирования эндогенных пептидов из мозга телят с целью получения индивидуального биологически активного низкомолекулярного пептида. Преимуществом предлагаемого метода является экологичность предлагаемого решения из-за отсутствия в технологической цепочке органических растворителей.

Экспериментальная часть

В качестве сырья использовали головной мозг телят (возраст 6 – 12 мес), который замораживали при температуре не менее минус 40 °С и выдерживали при этой температуре не менее 2 мес. Процесс выделения и очистки пептидов включает следующие этапы.

1. Измельченное сырьё помещали в стеклянный реактор с мешалкой объёмом 4 л и заливали 5 % водным раствором уксусной кислоты до суммарного объёма суспензии 3 л. Соотношение массы мозговой ткани и

объёма раствора составляло 1:5. Затем поднимали температуру до 65 °С и при перемешивании экстрагировали сырьё в течение 2 ч. После окончания экстракции суспензию охлаждали при комнатной температуре до 50 °С. Затем надсадочную жидкость сифонировали и фильтровали через бязь.

2. Полученный экстракт фракционировали на трек-мембранном плазмодифильтре ПФМ-800 с номинальным размером пор 0,4 мкм (ЗАО "Плазмодифильтр", Санкт-Петербург). Экстракт подавали в камеру концентрата перистальтическим насосом в режиме рециркуляции. Фракционирование проводили при скорости рециркуляции суспензии в камере концентрата 30 – 40 л · ч⁻¹ и скорости фильтрации 1,5 – 2 л · ч⁻¹. Скорость фильтрации поддерживали не менее 25 мл · мин⁻¹ за счёт высокого напряжения сдвига [8, 9].

3. Полученный фильтрат использовали для проведения твердофазной экстракции пептидов на сульфокатионите КУ-2-8 в водородной форме. Метод твердофазной экстракции использовали для удаления из фильтрата примесей РНК и ДНК, которые из-за молекулярной массы и высокой плотности отрицательных зарядов не могут связываться с отрицательно заряженным сорбентом. Экстракцию проводили в массообменниках колоночного типа (5 × 11 см) с верхним и нижним дренажом. После микрофильтрации экстракта фильтраты прокачивали через колонку с сорбентом при подаче раствора снизу-вверх со скоростью 100 мл · ч⁻¹ · см⁻², так что сорбент находился в состоянии взвешенного слоя.

4. После удаления фильтрата из экстрактора и промывки сорбента дистиллированной водой до оптической плотности на длине волны 260 нм 0,3 десорбцию пептидных компонентов и аминокислот осуществляли

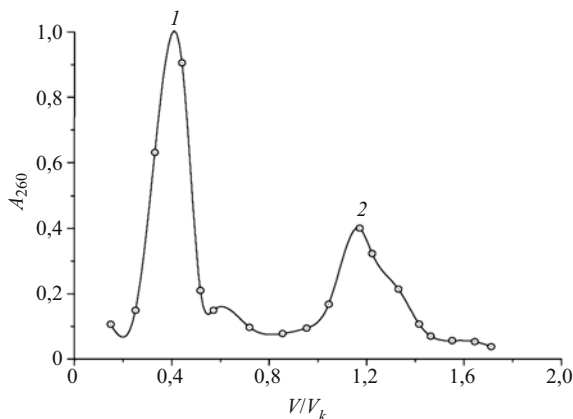


Рис. 1. Гель-хроматограмма экстракта из головного мозга теллят (разведение 1:10) на Сефадексе G-50 superfine; колонка $1,6 \times 34$ см. По оси абсцисс — относительный объём элюата: V — текущее значение пропущенного объёма, V_k — объём колонки. По оси ординат — оптическая плотность на длине волны 260 нм. Пик (1) — высокомолекулярные компоненты экстракта, пик (2) — низкомолекулярная фракция, содержащая пептиды и олигонуклеотиды.

0,5 М водным раствором аммиака при подаче раствора сверху вниз (со скоростью не более $4 \text{ мл} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$). На выходе из колонки собирали фракции раствора объёмом 20 мл, в которых измеряли pH, оптическую плотность при 260 и 280 нм и содержание α -аминного азота. После завершения десорбции элюаты объединяли, и суммарный раствор пептидов и аминокислот, выделенных из экстрактов мозга, концентрировали в роторно-пленочном испарителе фирмы ИКА модель RV06-ML при температуре не выше 45°C и остаточном давлении 10 мм рт. ст., что обеспечивало освобождение раствора от аммиака и концентрирование раствора в 8 раз до 100 мл. Полученный концентрат комплексного препарата использован для его дальнейшего фракционирования и получения индивидуального пептида.

5. Фракционирование комплексного пептидного препарата, содержащего аминокислоты, проводили с использованием ионообменной хроматографии низкого давления на сульфокатионите Dowex 50WX8 (DowChemical, USA) в Na-форме. Диаметр колонки 1,1 см, высота слоя сорбента 36 см. В качестве элюентов применяли цитратные буферные растворы с раз-

личным значением pH [10]. Цитратные буферные растворы $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ готовили растворением навесок лимонной кислоты 25,53 г и гидроксида натрия 15 г в воде. Полученный раствор имел значение pH 6,25 и ионную силу 0,2 М. Значения pH рабочих растворов в диапазоне от 4,25 до 12,25 получали путём добавления к нейтральному раствору 0,2 М растворов соляной кислоты и гидроксида натрия.

100 мг лиофильно высушенного суммарного пептидного препарата растворяли в 5 мл 0,01 н. раствора HCl. Раствор наносили на верхнюю часть колонки и элюировали пептидные компоненты последовательно 0,2 М цитратными буферными растворами со значениями pH 4,25 и 12,00. Элюцию проводили со скоростью $10 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$.

Отбор проб осуществляли при помощи коллектора фракций системы BioLogicLP (BioRad, USA); объём пробы составлял 1 мл. В каждой пробе определяли содержание α -аминного азота по окрашиванию нингидрином.

Физико-химические методы анализа

Для оценки молекулярно-массового распределения компонентов в пептидных препаратах использовали гель-хроматографию на Сефадексе G-50 ($1,6 \times 34$ см), superfine (Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили 0,05 М раствором NaCl с добавлением 0,02 % раствора NaN_3 со скоростью $6 \text{ мл} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ при температуре 25°C .

Концентрации маркерных аминокислот (препараты фирмы Sigma-Aldrich) и пептидов определяли по модифицированному методу Moore и Stein, который основан на реакции взаимодействия нингидрина с α -аминогруппой аминокислоты или пептида [11].

Компонентный состав пептидных препаратов мозга определяли с помощью метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на пластинах Sorbfil (Ленхром, Россия) в системе растворителей подвижной фазы: изопропанол — этилацетат — аммиак — вода (30:10:3,5:10, v/v) [12]. Предварительно пластины активировали при 100°C в течение 20 мин. Образцы исследуемого материала наносили на активированную пластинку с помощью микрошприца Hamilton 1700 в объёме 5 мкл. Исходная концентрация маркер-

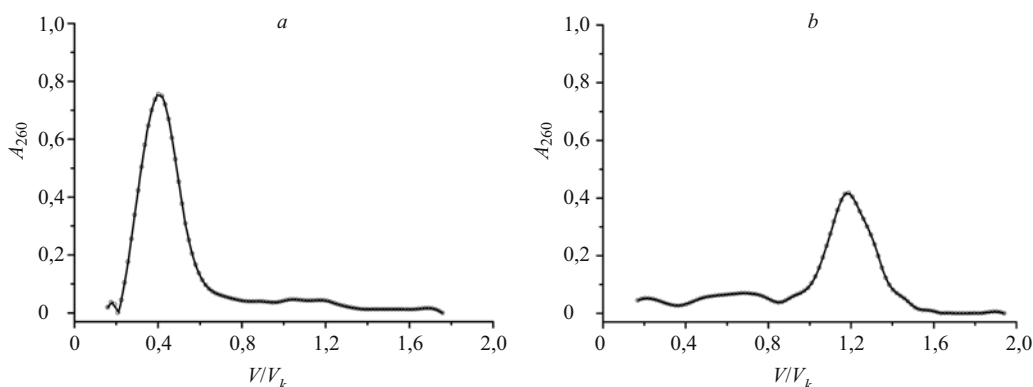


Рис. 2. Гель-хроматограммы 2 фракций, полученных методом тангенциальной микрофильтрации: концентрат (a) и фильтрат (b) экстракта из мозговой ткани. V/V_k — относительный объём (рис. 1). По оси ординат — оптическая плотность при длине волны 260 нм.

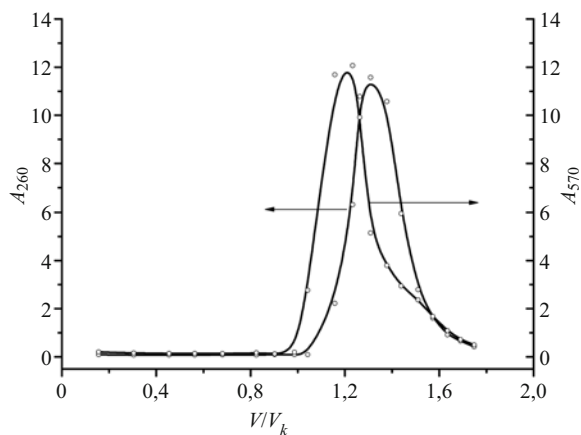


Рис. 3. Рехроматография пептидного фильтрата (*b*, рис. 2) на сефадексе G-50 superfine. V/V_k — относительный объем (рис. 1). По левой оси ординат — оптическая плотность на длине волны 260 нм, по правой оси ординат — на длине волны 570 нм.

ных аминокислот и исследуемых пептидов в наносимой пробе составляла $5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Пластинку помещали в камеру с подвижной фазой и выдерживали 60 мин при 20°C . Затем пластинку сушили в течение 15 мин при 20°C , выдерживали при 100°C и охлаждали до комнатной температуры. Хроматограмму опрыскивали раствором нингидрина ($0,3 \text{ г}$ нингидрина + 97 мл ацетона + 3 мл ледяной уксусной кислоты). После этого пластинки сушили при комнатной температуре в течение 10 мин и выдерживали при 100°C до проявления малиновых пятен на белом фоне.

В качестве препаратов сравнения использовали церебролизин (EbewePharma, Австрия) и кортексин (ООО Герофарм, Россия). Раствор церебролизина после вскрытия ампулы 1 мл использовали без разведения. Во флакон с лиофилизированным препаратом кортексина (10 мг) добавляли 1 мл дистиллированной воды и использовали полученный раствор.

Гидролиз выделенного индивидуального пептида проводили при температуре 110°C в 6 н HCl без доступа кислорода в течение 24 ч . Избыток HCl удаляли вакуум-выпариванием при температуре не выше 45°C и остаточном давлении 10 мм рт. ст. Для определения аминокислот в полученном гидролизате индивидуального пептида использовали таблицу R_f индивидуальных L-аминокислот.

Биологические методы анализа

Для оценки направленности влияния биологической активности пептидов использовали экспериментальную модель органоטיפической культуры тканей. В работе использовали тканевые эксплантаты месячных крыс линии «Вистар» [13]. Выделение и препарирование тканей мозга, а также тканей тимуса, эпифиза сердца, печени и селезёнки проводили под бинокулярным микроскопом МБС-1. В один (контрольный) ряд чашек Петри с $29 - 25$ эксплантатами добавляли по 1 мл только питательной среды. В другой ряд чашек с экспериментальными эксплантатами добавляли по 1 мл питательной среды с пептидами в определённой концентрации. Для установления оптимальной концентрации пептидов их вводили в культуральную сре-

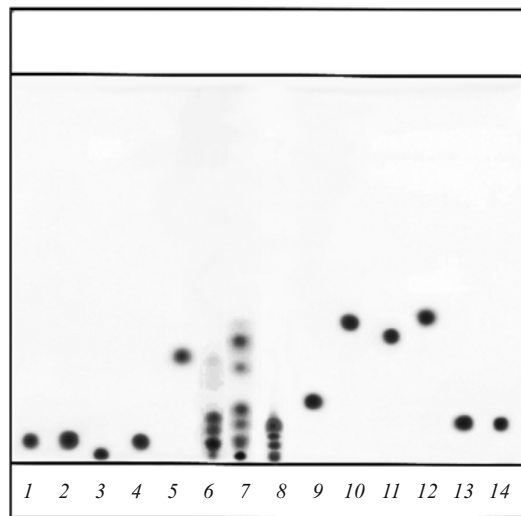


Рис. 4. ТСХ аминокислот и выделенной смеси пептидов головного мозга: 1 — Asp; 2 — Glu; 3 — Lys; 4 — Arg; 5 — Val; 6 — смесь пептидов; 7 — церебролизин; 8 — кортексин; 9 — Ala; 10 — Leu; 11 — Met; 12 — Trp; 13 — Ser; 14 — Gly.

ду в концентрациях $0,1, 0,5, 10, 20, 50 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37°C , через 3 сут просматривали размер эксплантатов под фазово-контрастным микроскопом и определяли эффективную концентрацию пептида. Так была определена эффективная концентрация $20 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$, так как значения соседних площадей эксплантатов сначала повышались, потом понижались. Биологическую активность определяли по индексу площади эксплантата (ИП), который рассчитывали в условных единицах как соотношение площади всего эксплантата (вместе с зоной выселяющихся клеток) к площади центральной зоны эксплантата; контрольное значение ИП принимали за 100% . Для расчета индекса площади эксплантатов использовали программу PhotoM 1.2. Достоверность различий в индексах площади оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Вероятность ошибки цифровых данных закладывалась в пределах 5% .

Результаты и их обсуждение

Компонентный состав уксусного экстракта из ткани головного мозга телят проанализирован методом гель-хроматографии (рис. 1); обнаружены 2 пика — высоко- и низкомолекулярных соединений.

Для препаративного разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных компонентов экстракта была использована микрофльтрация на плоскомембранных картриджах (плазмодифильтры ПФМ-800) при высоких скоростях прокачивания экстракта в ресурсной камере. Реологические свойства раствора и скорость потока в ресурсной камере оказывают решающее влияние на микрофльтрацию суспензий и коллоидных растворов в щелевых и капиллярных картриджах. При достаточно высоких скоростях потока и напряжениях сдвига высокомолекулярные компоненты и коллоидные частицы, присутствующие в экстракте, распределяются по сечению просвета щели по массе, форме и размеру. В то же время молекулы меньшего

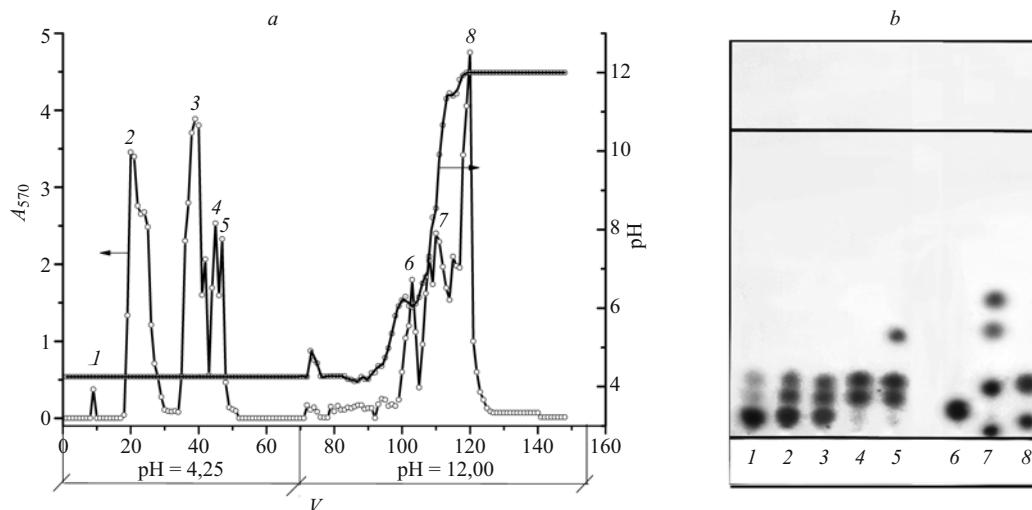


Рис. 5. Фракционирование пептидов мозга на сульфокатионите Dowex 50WX8 (а). Тонкослойная хроматограмма фракций, полученных при десорбции (б).

размера вытесняются из средней области потока к фильтрующей поверхности и удаляются в камеру фильтрата тангенциальным конвекционным потоком. Гидродинамические условия в камере концентрата при тангенциальной фильтрации снимают диффузионное лимитирование вблизи фильтрующей мембраны и обеспечивают непрерывное удаление в фильтрат низкомолекулярных компонентов экстракта [9].

На рис. 2 представлены гель-хроматограммы для продуктов микрофильтрации экстракта: концентрата (а) и фильтрата (б).

Рехроматография фильтрата (рис. 3) обнаруживает присутствие значительного количества олигонуклеотидов (по оптической плотности при 260 нм) и пептидов (по интенсивности окраски проб нингидрином при длине волны 570 нм, что соответствует содержанию α -аминного азота). Видно, что пик олигонуклеотидов смещён в область более низких молекулярных масс по сравнению с пиком пептидов. Среднее значение молекулярных масс этих компонентов не превышает 2,5 кДа.

Для отделения олигонуклеотидных примесей от целевых эндогенных пептидов использовали твёрдофазную экстракцию пептидов на сульфокатионите КУ-2-8 в водородной форме. Этот сорбент селективно связывает аминокислоты и пептиды, тогда как олигонуклеотиды удаляются вместе с раствором. Десорбцию пептидов проводили 0,5 М водным раствором аммиака, который затем удаляли в роторно-пленочном испарителе при остаточном давлении 10 мм рт. ст. и температуре не выше 45 °С, при этом концентрирование раствора увеличилось в 8 раз (до 100 мл).

Методом ВЭТСХ (рис. 4) проводили сравнение полученной смеси пептидов головного мозга с коммерческими пептидными препаратами, выделенными из мозга — церебролизин и кортексином.

Данные рис. 4 показывают, что церебролизин (позиция 7) имеет наибольшее количество низкомолекулярных компонентов, включая, по-видимому, свободные аминокислоты.

Для фракционирования выделенной смеси пептидов мозга использовали ионообменную хроматографию на сульфокатионите Dowex 50WX8 в натриевой форме (рис. 5, а). В качестве элюентов применяли цитратные буферные растворы с различным значением pH, что позволяет разделять пептиды с разными изоэлектрическими точками и разным содержанием гидрофобных аминокислотных остатков [10].

Все пептидные фракции мозга, полученные при десорбции (рис. 5, б), содержат от 2 до 4 компонентов. Только фракция 6 имеет в своём составе один компонент, т.е. получен индивидуальный пептид. Эта фракция была лиофильно высушена, и индивидуальный пептид подвергнут гидролизу (при 110 °С в 6 н. HCl без доступа кислорода в течение 24 ч). Затем гидролизованный пептид растворяли в 25 % этаноле и исследовали

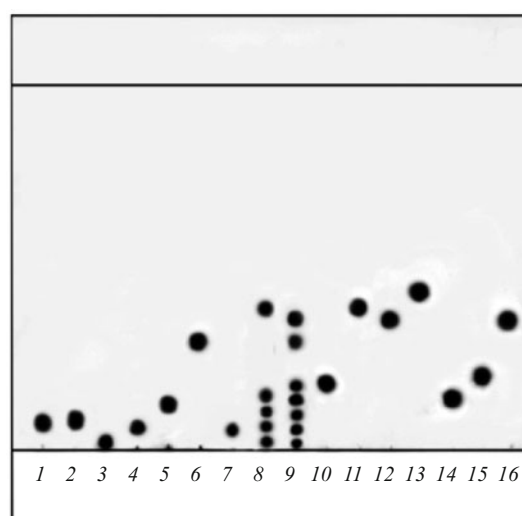


Рис. 6. ВЭТСХ аминокислот и гидролизата индивидуального пептида мозга после ионообменной хроматографии на катионите Dowex 50WX8: Позиции 1–6 и 10–16 маркерные аминокислоты (1 — Asp, 2 — Glu, 3 — Lys, 4 — Arg, 5 — Gly, 6 — Val), позиция 7 — индивидуальный пептид мозга, позиция 8 — гидролизат индивидуального пептида мозга, 9 — смесь аминокислот (Asp+Glu+Lys+Arg+Ala+Met+Gly); (10 — Ala; 11 — Leu; 12 — Met, 13 — Trp, 14 — Ser; 15 — Thr; 16 — Tyr).

Сравнение биологической активности пептидных препаратов мозга

Изменение ИП, % по отношению к контролю			
Индивидуальный пептид головного мозга	Смесь пептидов головного мозга	Церебролизин	Кортексин
+ 29*	+ 16*	+ 20*	+ 23*

* Доверительный диапазон $p < 0,05$ по сравнению с контролем, обнаружены статистически значимые различия активности изучаемых пептидов.

довали его аминокислотный состав с помощью тонкослойной хроматографии (рис. 6).

Как видно из рис. 6, в состав выделенного индивидуального пептида мозга входят следующие аминокислоты: Arg, Lys, Gly, Ser, Leu.

Биологическую активность смеси пептидов головного мозга и индивидуального пептида, выделенного методом ионообменной хроматографии, оценивали по стимуляции роста эксплантатов ткани мозга. В таблице представлены результаты измерения биологической активности пептидов и коммерческих препаратов при концентрации белка в изучаемых образцах $20 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что индивидуальный пептид, выделенный из смеси пептидов мозга, обладает наиболее выраженным стимулирующим действием на ткани мозга крыс по сравнению с действием исходной смеси пептидов и коммерческих геропротекторов церебролизина и кортексина. Пептиды, выделенные из мозга, увеличивают зону роста эксплантатов головного мозга, но не влияют на рост эксплантатов других тканей (тимус, эпифиз, сердце, печень, селезёнка).

Установлено, что выделенный индивидуальный активный пептид имеет аминокислотный состав: Arg, Lys, Gly, Ser, Leu. Молекулярная масса пептида составляет 561 Да. Для индивидуального пептида, выделенного предлагаемым способом из мозга, определены не только его молекулярные характеристики, но и его тканеспецифическая ориентация и биологическая активность по отношению к мозговой ткани. Ака-

демик И. П. Ашмарин предложил гипотезу о том, что короткие пептиды комплементарно связываются с двойной спиралью ДНК в ядерном хроматине и участвуют, таким образом, в пролиферации клетки [1]. В настоящее время эта гипотеза подтверждена экспериментально [2]. По-видимому, двухспиральная макромолекула ДНК клеток ткани головного мозга может рассматриваться как молекулярная мишень коротких пептидов [14].

Можно предположить, что пептиды, выделенные разработанным методом из мозга телят, представляют базу для создания на их основе новых лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, *Нейропептиды // Биохимия мозга*, Изд-во С.-Петерб. ун-та (1999), сс. 232 – 266.
2. И. П. Ашмарин, *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева)*, **49**(1), 4 – 7 (2005).
3. Н. Ю. Сотникова, О. А. Громова, Е. А. Новикова, *Цитокины и воспаление*, **3**(2), 34 – 39 (2004).
4. В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон, О. В. Чайка и др., Патент РФ № 2104702, *Бюл. изобрет.*, **13**, 02.20 (1998).
5. П. Д. Шабанов, *Психофармаколог. Биолог. Наркология*, **8**(3 – 4), 2399 – 2432 (2008).
6. О. К. Гранстрем, Е. Г. Сорокина, М. А. Салыкина и др., *Нейроиммунология*, **8**(1 – 2), 34 – 40 (2010).
7. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(2), 8 – 15 (2011).
8. А. Ю. Соловьёв, Д. В. Жилинский, И. А. Чернова и др., *Мембраны*, **44**(4), 22 – 26 (2009).
9. A. Shauly, A. Wasch, and A. Nir, *J. Reology*, **42**, 1329 – 1331 (1998).
10. А. А. Дёмин, И. А. Чернова, Л. К. Шатаева, *Ионообменная сорбция биологически активных веществ*, Изд-во С.-Петерб. ун-та, Санкт-Петербург (2008), сс. 118 – 121.
11. S. Moore and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 – 388 (1948).
12. К. И. Сакодинский, В. В. Бражников, С. А. Волков и др., *Аналитическая хроматография*, Химия, Москва (1993), сс. 336 – 373.
13. Н. И. Чалисова, В. А. Пеннийнен, А. В. Комашня и др., *Докл. РАН*, **406** (1), 1 – 4 (2006).
14. A. Y. Solovyev, S. I. Tarnovskaya, I. A. Chernova, et al., *International J. of Biol. Macromolec.*, **78**, 39 – 45 (2015).

Поступила 03.07.15

ISOLATION OF PEPTIDES FROM CALF BRAIN TISSUE AND EVALUATION OF THEIR TISSUE-SPECIFIC AND STIMULATING ACTIVITY

I. A. Chernova¹, D. V. Zhilinski², N. I. Chalisova³, and L. K. Shataeva¹

¹ Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

² BIOCAD Biopharmaceutical Company, Strelina, St. Petersburg, 198515 Russia

³ I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

* e-mail: irina.chernova@gmail.com

A method of isolating total peptide mixture and individual peptides from calf brain tissue has been developed based on the extraction with aqueous acetic acid solution followed by tangential cross-flow microfiltration and solid-phase extraction. The isolated peptide mixture contained components with molecular weights within 0.1 – 3 kDa. From this mixture, low-pressure ion-exchange chromatography on Dowex 50WX8 sulfocationite separated an individual peptide consisting of Arg, Lys, Gly, Ser, and Leu amino acids. The biological activity of this pentapeptide was estimated on organotypic brain slice culture explants of Wistar line rats. It is established that the peptide possesses high tissue-specific and stimulating activity with respect to explants of brain tissue, which exceeds that of the reference drugs cortexin and cerebrolysin.

Keywords: cerebral cortex tissue; cross-flow microfiltration; track membrane; solid-phase extraction; low-molecular-weight peptides; thin-layer chromatography; explant organotypic culture.