

УДК 543.42.062:577.112.6:615.361.12.014.41:577.112.824

ПЕПТИДНИЙ СКЛАД ЕКСТРАКТІВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ СЕРЦЯ СВИНЕЙ ТА ПОРОСЯТ

Л. А. РОГОЗА, Т. С. ДЮБКО, С. Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: liliyarogoz@gmail.ru*

Відомо, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят стимулюють процеси репаративної регенерації. Тому, дослідження складу екстрактів має важливе значення для розуміння механізму їх біологічної дії. У роботі встановлено молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів серця свиней та поросят, а саме: на хроматограмах екстрактів серця свиней реєструється 3 піки, а серця поросят – 6. Характерною особливістю екстрактів серця свиней є відсутність пептидів з молекулярною масою 10 000 і більше. Різниця в інтенсивності флуоресценції екстрактів свідчить про те, що пептиди в екстрактах серця поросят містять більшу кількість доступних розчиннику залишків триптофану. Одержано синхронні спектри флуоресценції екстрактів, які дозволяють проводити ідентифікацію їх пептидного складу без визначення окремих його компонентів. Результати дослідження можуть бути використані для контролю та стандартизації пептидного складу екстрактів серця під час вивчення їхньої біологічної активності.

Ключові слова: екстракт серця свиней, молекулярно-масовий розподіл пептидів, гелпроникна хроматографія, спектрофлуориметрія.

Відомо, що пептидна регуляція відіграє важливу роль у підтриманні гомеостазу організму як у нормі, так і за різноманітних патологічних станів [1–5]. Встановлено, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят стимулюють процеси репаративної регенерації при патологіях відповідних органів [6–8]. Таку біологічну дію екстрактів пов'язують із наявністю в них регуляторних пептидів. На сьогодні регуляторні пептиди виділяють як самостійний клас речовин, що завершує ряд у метаболічній послідовності перетворення первинної генетичної інформації: геном–транскриптом–протеом–пептидом [1]. Очевидно, що набір пептидів може змінюватися відповідно до фізіологічного стану організму, зокрема може залежати від віку тварин. Дослідження пептидного складу екстрактів має важливе значення для розуміння механізму їх дії та для стандартизації біологічних препаратів на основі екстрактів органів тварин.

Метою роботи було встановити молекулярно-масовий розподіл (ММР) пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів серця свиней та новонароджених поросят і отримати їхні спектральні характеристики.

Матеріали і методи

Дослідження проведені відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», які схвалено III Національним конгресом з біоетики (2007 р., Київ) і погоджено з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.).

Серця статевозрілих свиней отримували на Харківському м'ясокомбінаті, а серця новонароджених поросят (18–24 год від народження) – в операційній віварію ІПКіК НАН України. Поросят доставляли з агрокомбінату «Слобожанський» Чугуєвського району Харківської області.

Серця подрібнювали ножицями на фрагменти з масою 2–5 мг і тричі відмивали фізіологічним розчином (рН 7,4). До фрагментів органів по краплях додавали 20%-й розчин кріопротектора ПЕО-1500 у співвідношенні 1 : 1, потім ретельно і обережно перемішували. Одержану завись фрагментів розфасовували в поліетиленові ампули об'ємом 20 мл та заморожували зі швидкістю охолодження 1 °С/хв. Цей процес проводили за допомогою програмного заморожувача УОП-6 виробництва СКТБ з ДВ

ІПКіК НАН України. Зразки заморожували до -70°C , а потім переносили в рідкий азот. Розмерзання матеріалу проводили на водяній бані при $37\text{--}40^{\circ}\text{C}$. Від кріопротектора фрагменти відмивали фізіологічним розчином. У цьому ж розчині фрагменти інкубували протягом 60 хв. Супернатант прогрівали на киплячій водяній бані 15 хв, після чого фільтрували через паперовий фільтр [9].

Для визначення ММР речовин пептидної природи використовували метод високоефективної геліпроникної хроматографії [10]. Перед цим екстракти фільтрували через фільтр «Міліпор» з діаметром пор $0,45\ \mu\text{м}$. Об'єм проби становив $0,1\ \text{мл}$. Гель-фільтрацію проводили при кімнатній температурі на колонці діаметром $16\ \text{мм}$ та довжиною $400\ \text{мм}$, заповнену полівініловим гелем TSKGel Toyorearl HW-40 Fine (Японія). Елюцію проводили фосфатно-сольовим буфером такого складу: Na_2HPO_4 та NaH_2PO_4 — $30\ \text{ммоль/л}$, NaCl — $100\ \text{ммоль/л}$, $\text{pH} = 7,5$. Елюент подавали в колонку через петльовий інжектор перистальтичним насосом (LKB-2132, Швеція) зі швидкістю $1,6\text{--}1,7\ \text{мл/хв}$. Хроматограми реєстрували при $\lambda\ 254\ \text{нм}$, за допомогою УФ-детектора (LKB-2238 Uvicord S11, Швеція), самописець (LKB-2210 Rekorder, Швеція), інтегратор Watear-746 (США). Попередньо колонка була прокалібрована речовинами з відомою Мм: інсуліном, глюкагоном, соматостатином та вітамінами B_2 і B_{12} . Молекулярні маси пептидів (в атомних одиницях маси) визначали за часом їх утримання відповідно до калібровки.

Флуоресценцію збуджували світлом з $\lambda\ 280\ \text{нм}$ (загальна флуоресценція) та $296\ \text{нм}$ (триптофанова флуоресценція). Вимірювання проводили на спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse (Австралія). Ширина вхідної та вихідної щілин монохроматорів становила $5\ \text{нм}$ [11]. Всі спектральні вимірювання виконували при 20°C в стандартних кюветах із кварцу $1\times 3\ \text{см}$. Обробку спектрів проводили в програмі Microcal Origin 6.0.

Результати статистично обробляли за допомогою пакета програм Statistica для Windows.

Результати та обговорення

На рис. 1 наведено типові хроматограми екстрактів серця свиней та поросят, з яких видно, що ММР пептидів в екстрактах залежить від віку тварин. Загальним для обох екстрактів є тільки один пік — В, котрий відповідає середній Мм речовин пептидної природи 1784 (табл. 1). Характерними особ-

ливостями ММР пептидів в цих екстрактах, по-перше, є різна кількість піків, а саме три піки в екстрактах серця свиней і шість — в екстрактах серця поросят. По-друге, в екстрактах серця свиней відсутній пік Р (Мм $10\ \text{тис.}$ і більше), який спостерігається на хроматограмах всіх раніше досліджених зразків екстрактів кріоконсервованих органів: печінки, селезінки, підшлункової залози та шкіри статевозрілих свиней і новонароджених поросят, а також селезінки свиней [6]. До того ж на хроматограмах екстрактів серця свиней є два піки С і D, які відповідають низькомолекулярним пептидам, і які відсутні на хроматограмах екстрактів серця поросят. На хроматограмах екстрактів серця поросят наявні піки високомолекулярних пептидів, які відсутні на хроматограмах екстрактів серця свиней.

Із наведених хроматограм видно, що відносна площа фракцій екстрактів значно різниться між собою. Під час дослідження біологічної активності екстрактів виявляються сумарні ефекти впливу пептидів на перебіг відповідної експериментальної патології. Але можна припустити, що регуляторний вплив пептидів кожної фракції буде в значній мірі специфічним саме для неї. Тому відповідну роль у прояві біологічної активності екстрактів можуть відігравати не тільки фракції, які

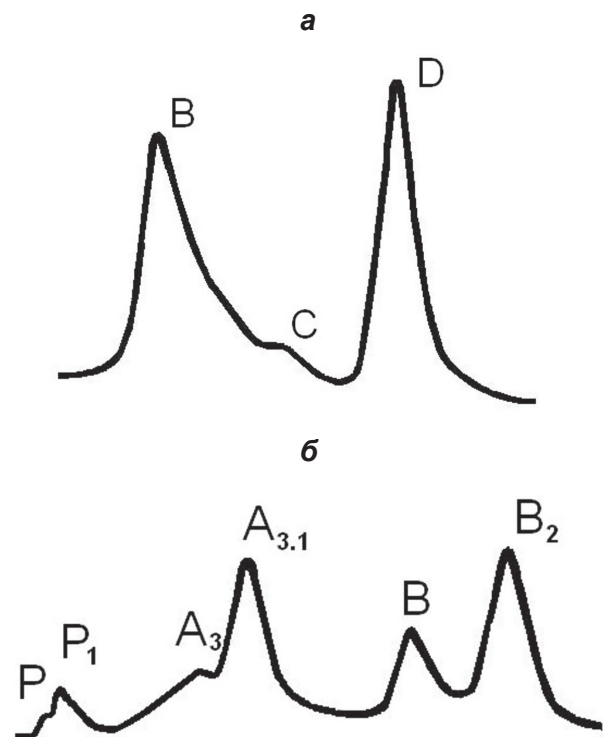


Рис. 1. Хроматограми екстрактів серця свиней (а) та серця поросят (б)

Таблиця 1. Питома площа фракцій пептидів різної молекулярної маси в екстрактах серця свиней та серця поросят

Пік	Молекулярна маса	Питома площа фракцій пептидів, %	
		Серце свиней	Серце поросят
P	12 000	—	0,5
P ₁	10 000	—	2,8
A ₃	4 597	—	8,5
A _{3,1}	3 895	—	31,9
B	1 784	52,3	17,9
B ₂	1 296	—	38,4
C	1 061	3,9	—
D	420	43,8	—

містять велику кількість пептидів, а і пептиди інших фракцій, кількість яких в екстрактах є незначною. Адже відомо, що біологічна дія регуляторних пептидів і деяких інших речовин як *in vitro*, так і *in vivo* виявляється за дуже низьких концентрацій. Робочі концентрації низки внутрішніх біорегуляторів, наприклад, пептидів і, власне, гормонів, часто знаходяться в інтервалі від 10⁻⁹ до 10⁻¹⁵ моль/л і навіть менше [12–14].

Вікові відмінності у складі екстрактів можуть бути пов'язані з різним фізіологічним станом клітин серця новонароджених поро-

сят і статевозрілих свиней, а також із різною проліферативною активністю.

Однією з особливостей фізіологічно активних пептидів є те, що вони утворюються із протеїнової молекули попередника шляхом протеолізу відповідно до потреб та можливостей організму [1]. Тому, мабуть, у відповідь на стрес, спричинений процесом заморожування/розморожування фрагментів серця, і запускаються механізми утворення пептидів із відповідною біологічною активністю. А їхній склад залежить від віку тварин, а саме від адаптаційних можливостей органа та його здатності до фізіологічної і репаративної регенерації. Можливий інший варіант, втрата, в значній мірі, спеціалізованими клітинами (у фазі G₀) здатності продукувати відповідні пептиди.

Флуоресценція більшості протеїнів і пептидів пов'язана, передусім, із триптофановими залишками, індольні кільця яких є чутливими флуорофорами [11]. На спектри флуоресценції речовин пептидної природи впливають процеси зв'язування субстратів, реакції асоціації і денатурації. Спектри флуоресценції тканинних екстрактів знаходяться в межах 290–450 нм (рис. 2, табл. 2). Під час збудження світлом (280 нм) максимум спектрів флуоресценції знаходиться в межах 340–358 нм, що може свідчити про наявність в екстрактах доступних для розчинника залишків триптофану [11]. Відмінності, які спостерігаються в спектрах флуоресценції екстрактів, вказують на те, що їхній склад залежить від джерела отримання, і вони вклю-

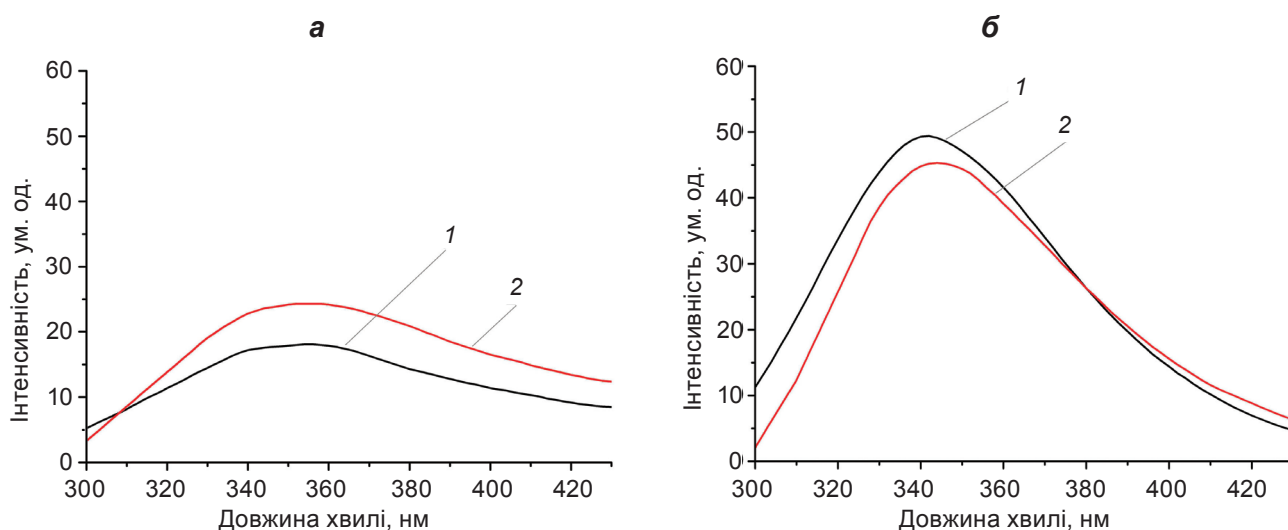


Рис. 2. Спектри флуоресценції екстрактів серця свиней (а) та серця поросят (б) при $\lambda_{36} = 280$ нм (1) та $\lambda_{36} = 296$ нм (2)

Таблиця 2. Характеристики спектрів флуоресценції екстрактів серця свиней та серця поросят

Зразок	Спектрофлуориметричні показники		
	Довжина хвилі збудження, нм	Довжина хвилі в максимумі флуоресценції, нм	Максимум інтенсивності флуоресценції, ум.од.
Екстракт серця свиней	280	354–356	24,4
	296	352–358	18,0
Екстракт серця поросят	280	342	49,4
	296	344	45,3

чають в себе пептиди, які різняться між собою за кількісним співвідношенням та амінокислотним складом.

Детальний аналіз спектрів флуоресценції пептидів провести важко, тому що він ускладнюється великою кількістю факторів, які впливають на флуоресценцію індольної складової, а також наявністю в більшості таких речовин триптофанових залишків.

Оскільки кожен залишок знаходиться в різному оточенні, то і спектральні властивості різні [11]. У разі дослідження суміші протеїнів або пептидів, до складу яких входить значна кількість триптофанових залишків у гетерогенному оточенні, важко співвіднести конкретні спектральні характеристики з окремим ароматичним амінокислотним залишком. У такому разі доводиться обмежуватися лише

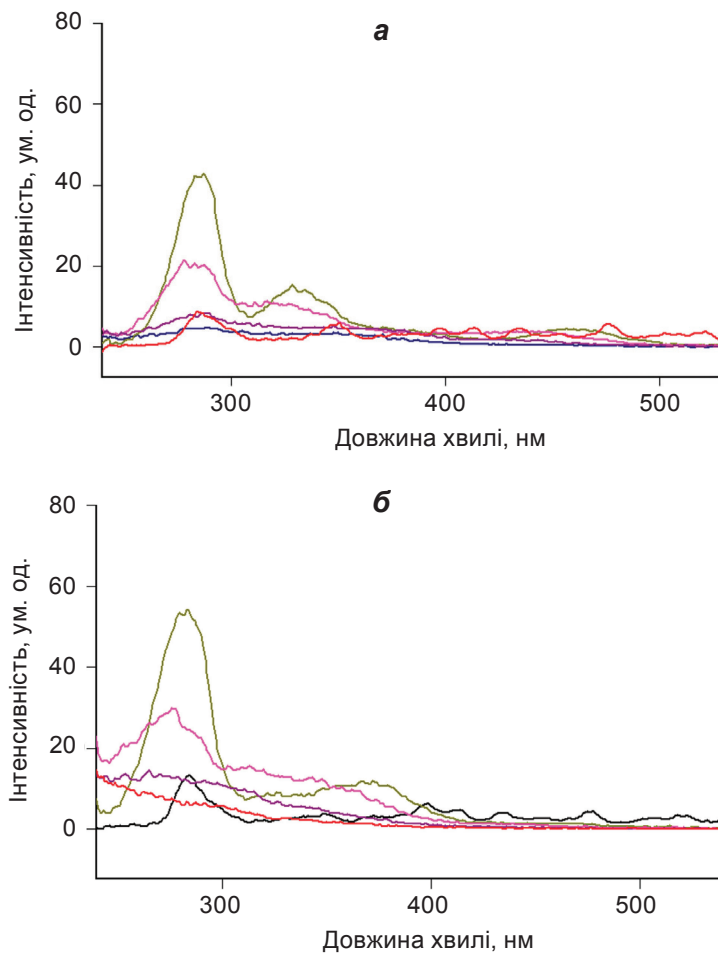


Рис. 3. Синхронні спектри флуоресценції екстрактів серця свиней (а) та серця поросят (б)

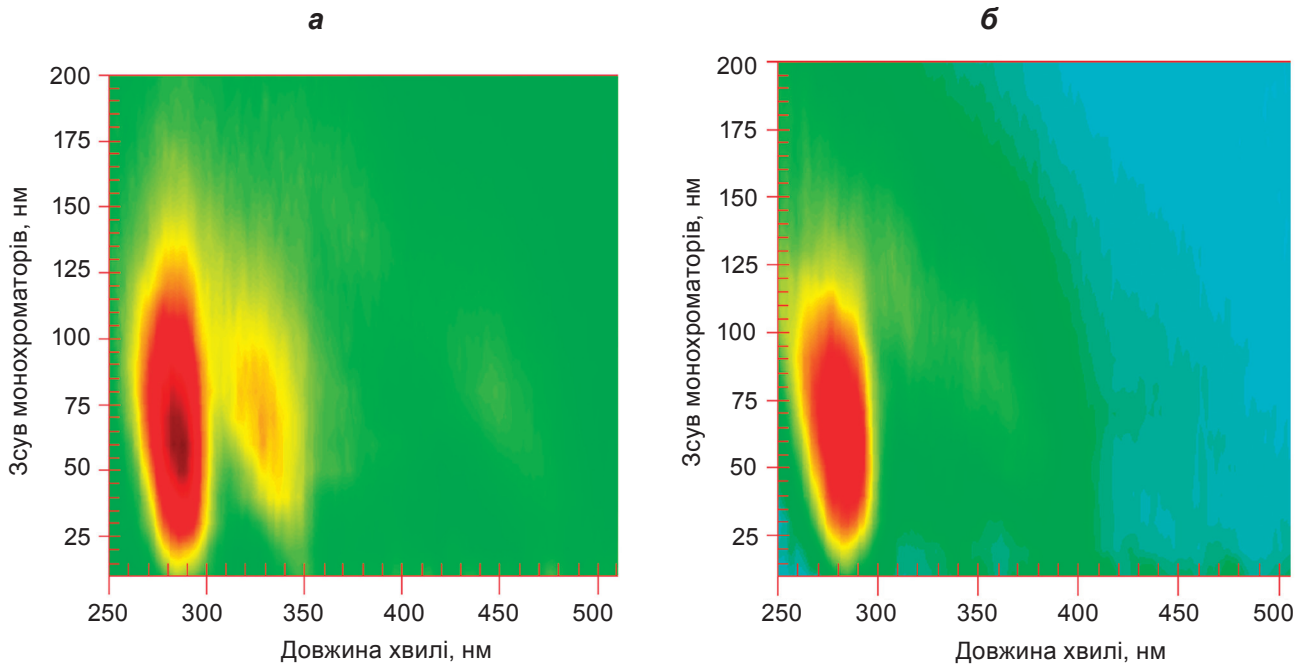


Рис. 4. Топограми синхронних спектрів флуоресценції екстрактів серця свиней (а) та серця поросят (б)

якісним описом спектральних властивостей груп цих залишків.

Додатковим підходом до оцінки складу екстрактів є їхні синхронні спектри, чутливі до зміни стану мікрооточення триптофанових і тирозинових залишків у протеїнах та пептидах. Синхронні спектри флуоресценції — це суперпозиція спектрів, зареєстрованих за різних величин зсуву монохроматорів збудження і флуоресценції. Оскільки кожен екстракт має унікальний склад, то йому буде притаманний свій набір синхронних спектрів флуоресценції.

На рис. 3 наведені синхронні спектри флуоресценції екстрактів серця свиней та серця поросят, одержані за допомогою величини зсуву монохроматорів збудження і флуоресценції від 10 до 200 нм. Синхронні спектри дають можливість виявити не тільки розбіжності в спектрах флуоресценції екстрактів, пов'язані з тим, що до їхнього складу входять різні пептиди, але й отримати їхні індивідуальні спектральні топограми, які є, по суті, спектральними характеристиками відповідних екстрактів (рис. 4). Наведені дані підтверджують можливість ідентифікації екстрактів за топограмами їхніх синхронних спектрів. Такий підхід може бути використаний для стандартизації препаратів, біологічна дія яких заснована на наявності в них відповідних пептидів. Синхронні спектри

також можуть бути корисними для експрес-оцінки екстрактів під час їх одержання тощо.

ПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ СЕРДЦА СВИНЕЙ И ПОРОСЯТ

Л. А. Рогоза, Т. С. Дюбка, С. Е. Гальченко, Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: liliyarogoz@mail.ru

Известно, что экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят стимулируют процессы репаративной регенерации. Поэтому, исследование состава экстрактов имеет большое значение для понимания механизма их биологического действия. В работе определено молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах криоконсервированных фрагментов сердца свиней и поросят, а именно: на хроматограммах экстрактов сердца свиней регистрируются 3 пика, а сердца поросят — 6. Характерной особенностью экстрактов сердца свиней является отсутствие пептидов с молекулярной массой 10 000 и больше. Различие в интенсивности флуоресценции экстрактов свидетельствует о том, что пептиды в экстрактах сердца поросят

содержат большее количество доступных для растворителя остатков триптофана. Получены синхронные спектры флуоресценции экстрактов, которые позволяют проводить идентификацию их пептидного состава без определения отдельных компонентов. Результаты исследования могут быть использованы для контроля и стандартизации пептидного состава экстрактов сердца при изучении их биологической активности.

Ключевые слова: экстракт сердца свиней, молекулярно-массовое распределение пептидов, гельпроникающая хроматография, спектрофлуориметрия.

PEPTIDE COMPOSITION OF EXTRACTS OF CRYOPRESERVED PIGS' AND PIGLETS' HEART FRAGMENTS

*L. A. Rohoza, T. S. Dyubko,
S. Ye. Galchenko, B. P. Sandomirsky*

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: liliyarogoza@mail.ru

It is known that extracts of cryopreserved organ fragments of pigs and piglets stimulate the processes of reparative regeneration. Therefore, the study of the extracts is essential for understanding the mechanism of their biological effects. In this paper was studied the molecular mass distribution of peptides in the extracts of cryopreserved heart fragments of pigs' and piglets', i.e., the chromatograms of pigs' heart extracts show 3 picks, whilst piglets' heart extract show 6 picks. The peculiarity of pigs' heart extracts is the absence of peptides with molecular mass of 10,000 and more. The differences in the intensity of extracts fluorescence prove that the peptides in pigs' heart extracts contain greater amount of tryptophan residues accessible for solvent. The synchronous fluorescence spectra of extracts were obtained which allows the identification of extract without assessment of their components. Results shown in this research could be used for control and standardization of heart extracts peptide composition under investigation of their biological quality.

Key words: extract of pigs' heart, molecular-mass distribution of peptides, gelpenetrating chromatography, spectrofluorimetry.

1. *Говорун В. М., Иванов В. Т.* // Биорг. хим. — 2011. — 37, № 2. — С. 199–215.
2. *Веснина Л. Э., Гаркович А. Л., Грицай Н. Н. и др.* / Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы практического применения) / Под ред. И. П. Кайдашева, В. П. Мищенко, В. К. Рыбальченко. — К.: Здоров'я, 2003. — 392 с.
3. *Хавинсон В. Х., Кветная Т. В.* // Рос. хим. журн. — 2005. — 49, № 1. — С. 112–117.
4. *Mancinelli L., De Angelis P. M., Annulli L. et al.* // Mol. Cancer. — 2009. — 8(55), N 1. — P. 1–11.
5. *Valor L. M., Grant S. G. N.* // Behav. Genet. — 2007. — 37, N 1. — P. 18–30.
6. *Гальченко С. Є.* // Пробл. кріобіол. — 2005. — 15, № 3. — С. 403–406.
7. *Hassane F. S., Saleh A. F., Abes R. et al.* // Cell. Mol. Life Sci. — 2010. — 67, N 5. — P. 715–726.
8. *Muller S.A., Kohajda T., Findeiss S. et al.* // Anal. Bioanal. Chem. — 2010. — 398, N 7–8. — P. 2867–2881.
9. *Пат. 64381 А UA, МПК⁷ А61К35/12.* Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / Гальченко С. Є., Шкодовська Н. Ю., Сандомирський Б. П., Грищенко В. І.; ІПКіК; — Опубл. 16.02.2004; Бюл. № 2.
10. *Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г. та ін.* / Практическая газовая и жидкостная хроматография. — СПб.: СПбГУ, 2002. — 620 с.
11. *Демченко А. П.* / Люминесценция и динамика структуры белков. — К.: Наук. думка. — 1988. — 277 с.
12. *Григорьев Е. И., Хавинсон В. Х., Малинин В. В. и др.* // Радиц. биол. радиоэкол. — 2003. — 43, № 3. — С. 358–362.
13. *Егоров В. В.* // Там же. — С. 261–264.
14. *Kang H., Michaels M. A., Berner B. R., Syamal K. D.* // J. Immunol. — 2005. — 174. — P. 3135–3136.

Отримано 16.11.2012