УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ, 2020, том 140, № 2, с. 140–148

УДК 577.088

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ В СОСТАВЕ ПОЛИПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ

© 2020 г. И. К. Журкович[1], Н. Г. Ковров[1], Г. А. Рыжак[2], Е. С. Миронова[2, *], В. Х. Хавинсон[2, 3]

[1]Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

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

*e-mail: katerina.mironova@gerontology.ru

Поступила в редакцию 17.12.2019 г.
После доработки 17.12.2019 г.
Принята к публикации 30.12.2019 г.

Полипептидные комплексы, выделенные из сосудов, хрящей, слизистой оболочки бронхов, головного мозга, поджелудочной железы и синтезированные на основе анализа их аминокислотного состава короткие пептиды KED, AED, EDG, AEDL, EDR, KEDW, соответственно, обладают сходными биологическими эффектами. Методом УЭЖХ-МС в составе полипептидного комплекса сосудов выявлен трипептид KED (0.02%), в составе комплекса хрящей – трипептид AED (0.02%). В составе комплекса слизистой оболочки бронхов были выявлены трипептид EDG (0.028%) и тетрапептид AEDL (0.06%). Полипептидный комплекс головного мозга содержит в своем составе трипептид EDR (0.024%), комплекс поджелудочной железы – тетрапептид KEDW (0.035%). Биологические эффекты полипептидных комплексов обусловлены эффектами входящих в их состав коротких пептидов.

Ключевые слова: полипептидные комплексы, идентификация, пептиды, биологическая активность

DOI: 10.31857/S004213242002012X

ВВЕДЕНИЕ

Ранее методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) было показано, что в состав полипептидного комплекса эпифиза входит биологически активный пептид AEDG, обладающий теми же биологическими эффектами, что и полипептидный комплекс эпифиза (Хавинсон и др., 2017).

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии была разработана технология выделения ряда полипептидных комплексов из различных органов и тканей молодых животных (сосудов, хрящей, слизистой оболочки бронхов, головного мозга, поджелудочной железы). Кроме того, на основе анализа аминокислотного состава экстрагированных полипептидных комплексов были сконструированы и синтезированы короткие пептиды: трипептиды KED, AED, EDG, EDR и тетрапептиды AEDL, KEDW.

Полипептидный комплекс сосудов и короткий пептид KED обладают выраженными вазопротекторными свойствами и являются эффективными средствами в терапии патологии сердечно-сосудистой системы у людей пожилого возраста. KED способствовал коррекции метаболического сосудистого синдрома и заболеваний, сопровождающихся нарушением проницаемости сосудистой стенки и ломкостью капилляров (Китачёв и др., 2013). Одним из возможных механизмов действия пептида KED является эпигенетическая регуляция экспрессии генов, кодирующих белки-маркеры функциональной активности эндотелия (Козлов и др., 2016). KED при пероральном применении способствовал увеличению дистанции безболевой ходьбы на 40% по сравнению с контрольной группой (Китачёв и др., 2013). Кроме того, у этих же пациентов трипептид был эффективен в терапии васкулогенной эректильной дисфункции. После применения KED скорость кровотока в магистральных артериях полового члена статистически значимо возрастала по сравнению с контрольной группой (Китачёв и др., 2014). Кроме того, в экспериментах было установлено, что пептид KED нормализует микроциркуляцию у крыс с индуцированным пародонтитом. Применение этого пептида оказывало нормализующее влияние на состояние стенок капилляров, повы-

шая их резистентность и проницаемость, а также на состояние микроциркуляторного русла слизистой оболочки десны и пародонта (Хавинсон и др., 2006). В органотипических культурах клеток, полученных от молодых и старых животных, и в диссоциированных культурах эндотелиоцитов сосудов при их старении пептид KED стимулировал синтез пролиферотропного белка Ki67, экспрессия которого снижается при старении клеток. Методами молекулярного докинга выявлена возможность связывания пептида KED с промоторными участками гена *MKI67* (гена белка Ki67) (Хавинсон и др., 2014г). Пептид KED снижает синтез Е-селектина – молекулы адгезии, участвующей в формировании атеросклеротических бляшек, при старении эндотелия сосудов *in vitro* (Хавинсон и др., 2014а). Получены данные о повышении резистентности капилляров кожи у пациентов с гиповитаминозом под влиянием пептида KED, выражающиеся в уменьшении количества кровоизлияний по сравнению с контрольной группой при проведении манжеточной пробы Румпеля–Лееде–Кончаловского. Аналогичное повышение резистентности капилляров и нормализация микроциркуляции крови наблюдалась у больных сенильной пурпурой – заболеванием, поражающим людей пожилого и старческого возраста вследствие повышения ломкости сосудов (Хавинсон и др., 2006).

Комплекс хрящей и трипептид AED изучены при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, в частности дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника. Использование AED способствовало увеличению количества и усилению функции кальцитонин-продуцирующих клеток щитовидной железы, улучшало трофику клеток костной и хрящевой тканей и, таким образом, способствовало нормализации метаболизма клеток этих тканей (Хавинсон и др., 2007а). Применение трипептида AED статистически значимо улучшало минеральную плотность костной ткани скелета крыс (Поворознюк и др., 2007). Выявлено, что пептид AED обладает также выраженным нефропротекторным эффектом, способствуя снижению экскреции белка и концентрации электролитов в моче (Заморский и др., 2015). Установлено, что пептид AED активирует рост клеток почек, снижая экспрессию маркеров старения p16, p21, p53 и повышая экспрессию белка молодости SIRT-6 (Хавинсон и др., 2014в). Трипептид AED в 2 раза повышал пролиферативную способность и в 1.5 раза снижал уровень апоптоза в клетках почечного эпителия при их старении (Хавинсон и др., 2014б).

Комплекс слизистой оболочки бронхов, трипептид EDG и тетрапептид AEDL регулируют функции бронхолегочной системы. Установлено, что пептид AEDL способствовал нормализации клеточного состава ткани слизистой оболочки бронхов при анализе течения острого воспаления легких в результате бактериального повреждения, при хроническом фиброзном воспалительном процессе и сублетальном гипероксическом повреждении легких у животных (Khavinson et al., 2009). AEDL может связываться с ДНК и регулировать экспрессию генов и синтез белков, вовлеченных в дифференцировку и поддержание функциональной активности клеток бронхиального эпителия (Khavinson et al., 2014). Пептид EDG представляет собой синтетический трипептид, обладающий стресспротекторным действием. Стресспротекторные свойства пептида EDG реализуются посредством регуляции уровня биогенных аминов в головном мозге и крови, влияния на экспрессию гена *c-fos* и снижения активности энкефалиназ в крови (Хавинсон и др., 2007б).

Полипептидный комплекс головного мозга и трипептид EDR обладают нейропротекторными свойствами. Пептид EDR снижает апоптоз и повышает синтез серотонина в нейронах коры головного мозга при их старении. Пероральное применение пептида EDR было эффективным у больных с черепно-мозговой травмой, церебрастенией, при снижении памяти и внимания у лиц пожилого возраста (Умнов и др., 2013). Кроме того, пептид EDR обладает выраженным антиоксидантным действием (Хавинсон и др., 2013). В первичной культуре нейронов гиппокампа мышей в условиях амилоидной синаптотоксичности (модель болезни Альцгеймера) пептид EDR повышал количество грибовидных шипиков нейронов до уровня нормы (Красковская и др., 2017). После применения EDR улучшалась когнитивная деятельность макак-резусов (*Macaca mulatta*) (Кузнецова и др., 2019). Было также отмечено более стойкое повышение физической работоспособности в группе крыс, получавших трипептид EDR, которое не прекращалось и после окончания приема препарата (Беляева и др., 2015). EDR снижал влияние пренатального стресса на структуру поведения и когнитивные функции крыс за счет изменения активации серотонин- и дофаминергической систем и понижения активности каспазы-3 в мозге. При окклюзии сонных артерий введение EDR способствовало возрастанию содержания адренергических медиаторов ДОФА и дофамина в коре больших полушарий, адреналина и норадреналина в стволовых структурах (Менджерицкий и др., 2012; Карантыш и др., 2013).

Комплекс поджелудочной железы и тетрапептид KEDW регулируют функции поджелудочной железы. У больных сахарным диабетом 2-го типа

Таблица 1. Режим хроматографического элюирования

Время, мин	Компонент А, %	Компонент В, %
0	100	0
3	100	0
9	35	65
12	35	65

под влиянием KEDW статистически значимо снижался уровень глюкозы натощак и при стандартном глюкозотолерантном тесте. Также отмечено уменьшение концентрации в плазме инсулина и индекса инсулинорезистентности (Коркушко и др., 2011). Применение курса KEDW приводило к снижению уровня глюкозы в крови старых самок макак-резусов. Действие KEDW также сопровождалось нормализацией уровня инсулина и С-пептида в плазме крови, что свидетельствует о его восстанавливающем эффекте нарушенной толерантности к глюкозе у старых животных (Гончарова и др., 2015). Установлено, что KEDW проникает через мембрану в ядро и ядрышко клетки (Fedoreyeva et al., 2011). Вероятно, его геропротекторное действие в отношении поджелудочной железы связано с регуляцией транскрипции генов факторов дифференцировки. Тетрапептид KEDW стимулировал экспрессию факторов дифференцировки ацинарных (Pdx1, Ptf1a) и островковых (Pdx1, Pax6, Pax4, Foxa2, NKx2.2) клеток поджелудочной железы в “молодых” и “старых” культурах. Индуцируемая KEDW дифференцировка клеток поджелудочной железы может являться одним из механизмов его антидиабетического и противовоспалительного действия (Хавинсон и др., 2012).

В связи с изложенным возникло предположение, что в описанных выше полипептидных комплексах могут содержаться короткие пептиды, имеющие сходную с ними биологическую активность. При этом ранее анализ пептидного состава полипептидных комплексов, экстрагированных из тканей животных, не проводился. Цель работы – идентификация коротких пептидов в полипептидных комплексах, выделенных из органов животных, методом ультраэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (УЭЖХ-МС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В Институте токсикологии ФМБА России методом УЭЖХ-МС был проведен анализ шести лиофилизированных препаратов полипептидных комплексов на содержание в их составе семи целевых коротких пептидов. Анализ выполнен с применением хроматографа Acquity UPLC I-class с тандемным МС-детектором TDQ Xevo (Waters, США), свидетельство о поверке № 242/8506-2018 от 31 октября 2018 г. Хроматографическая колонка Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1 × 100 mm. Подвижная фаза состояла из: компонента А — 0.05% раствор трифторуксусной кислоты в воде и компонента В — ацетонитрил.

Градиентное элюирование проводили согласно табл. 1.

Скорость потока элюента составляла 0.2 мл/мин. Температура термостата колонки – 40°С. Темпе-

Таблица 2. Условия МС-детектирования (Acquity)

Тип ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении (ESI)
Диапазон массовых чисел	50–1250 Да
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Температура газа-осушителя	350°С
Напряжение на капилляре	3.0 кВ
Скорость потока газа-осушителя	600 л/ч

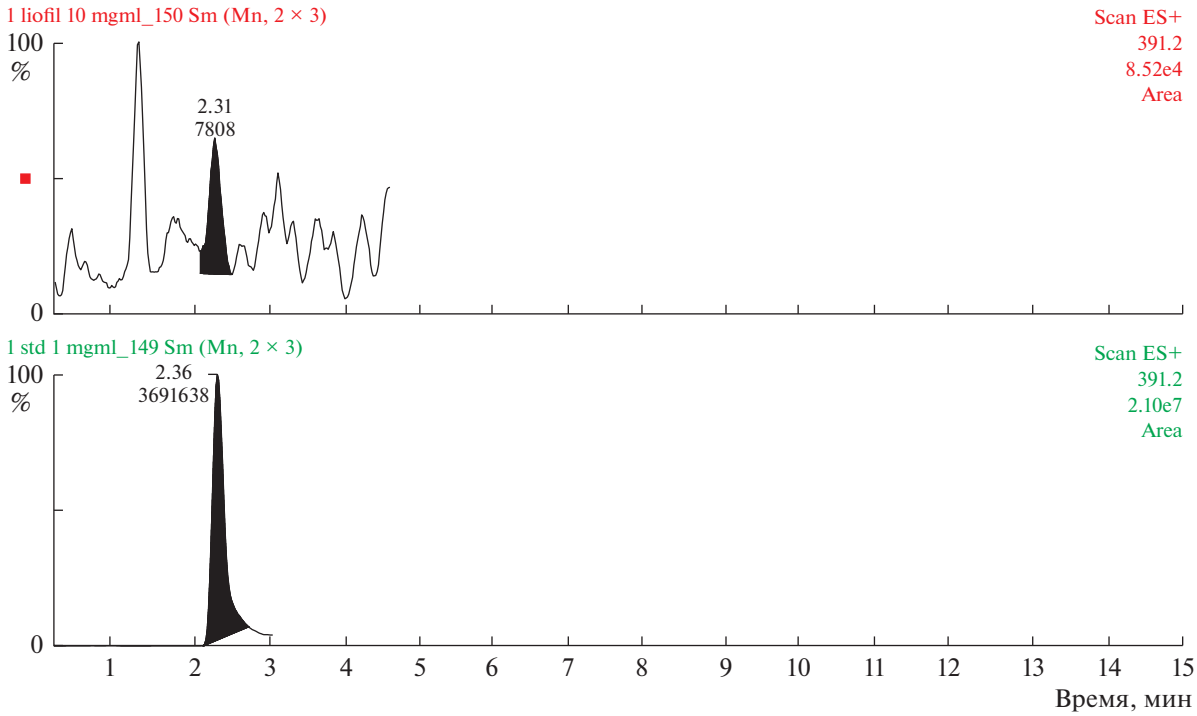

Рис. 1. Определение трипептида KED в комплексе сосудов методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма KED (стандартный образец), сверху – хроматограмма KED в составе комплекса сосудов.

ратура термостата отделения для проб – 7°С. Объем ввода пробы – 10 мкл.

Условия МС-детектирования представлены в табл. 2.

Испытуемые и стандартные образцы анализировали в виде 1 и 0.1% водных растворов соответственно.

Критериями идентификации пептидов служили хроматографические параметры удерживания и массовые числа.

Количественные измерения выполнены методом внешнего стандарта. Концентрацию целевого компонента в испытуемых препаратах в мг/г (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{SC_0 \times 100}{S_0},$$

где S и S_0 – площади пиков целевого компонента на хроматограммах растворов испытуемого и стандартного образцов соответственно; C_0 – концентрация определяемого пептида в растворе стандартного образца в мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что 0.02% состава комплекса сосудов представлено трипептидом KED (табл. 3, рис. 1). Содержание AED в комплексе хрящей аналогично – 0.02% (табл. 3, рис. 2). Трипептид EDG составляет 0.028% (табл. 3, рис. 3), а тетрапептид AEDL – 0.06% (табл. 3, рис. 4) в комплексе слизистой оболочки бронхов соответственно. Комплекс головного мозга содержит в своем составе 0.024% трипептида EDR (табл. 3, рис. 5), а комплекс поджелудочной железы – 0.035% тетрапептида KEDW (табл. 3, рис. 6).

Таким образом, короткие пептиды являются минорными компонентами исследованных препаратов полипептидных комплексов. Относительное содержание коротких пептидов составляет не более 0.6 мг/г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе полипептидных комплексов, выделенных из сосудов, хрящей, слизистой оболочки бронхов, головного мозга, поджелудочной железы, с помощью высокотехнологичных физико-химических методов анализа (УЭЖХ-МС) были выявлены пептиды KED, AED, EDG, AEDL,

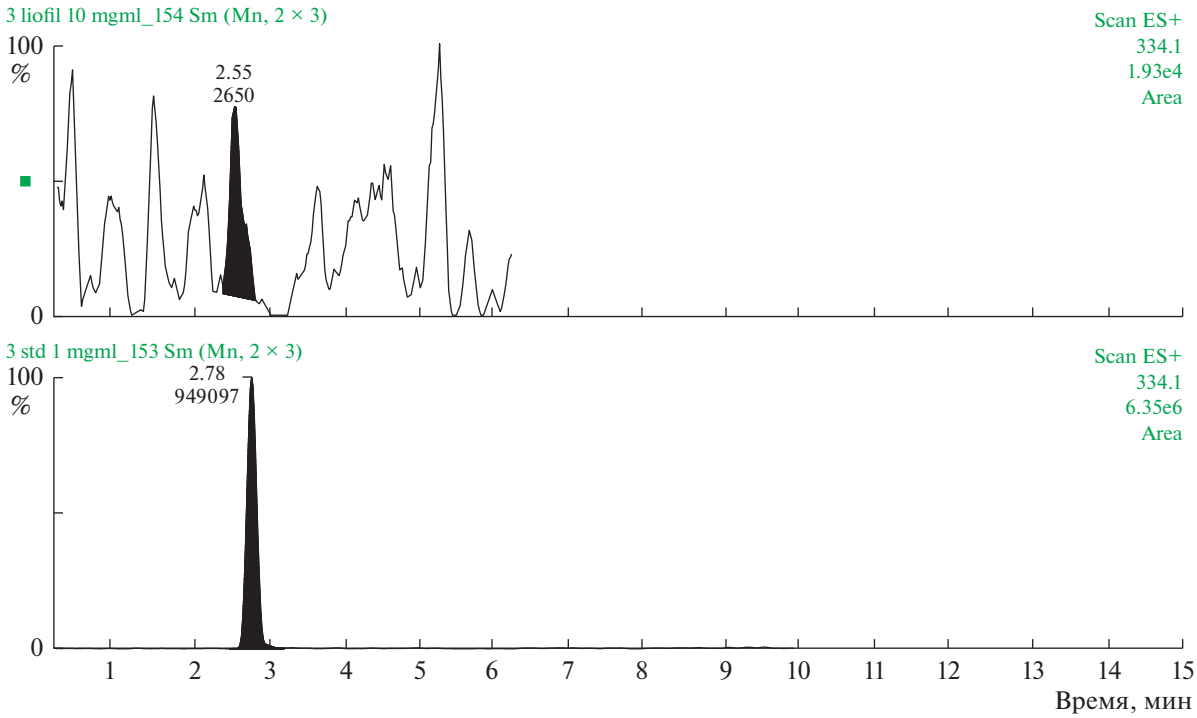

Рис. 2. Определение трипептида AED в комплексе хрящей методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма AED (стандартный образец), сверху – хроматограмма AED в составе комплекса хрящей.

EDR, KEDW, обладающие биологическими эффектами, сходными с полипептидными комплексами. Результаты проведенного исследования дают основание полагать, что изученные короткие пептиды, идентифицированные в полипептидных комплексах, являются их активными компонентами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Таблица 3. Определение коротких пептидов в комплексах методом УЭЖХ-МС

Полипептидный комплекс	Короткий пептид	Содержание пептида в комплексе, мг/г
Сосудов	KED	0.2
Хрящей	AED	0.2
Бронхов	EDG	0.28
	AEDL	0.6
Головного мозга	EDR	0.24
Поджелудочной железы	KEDW	0.35

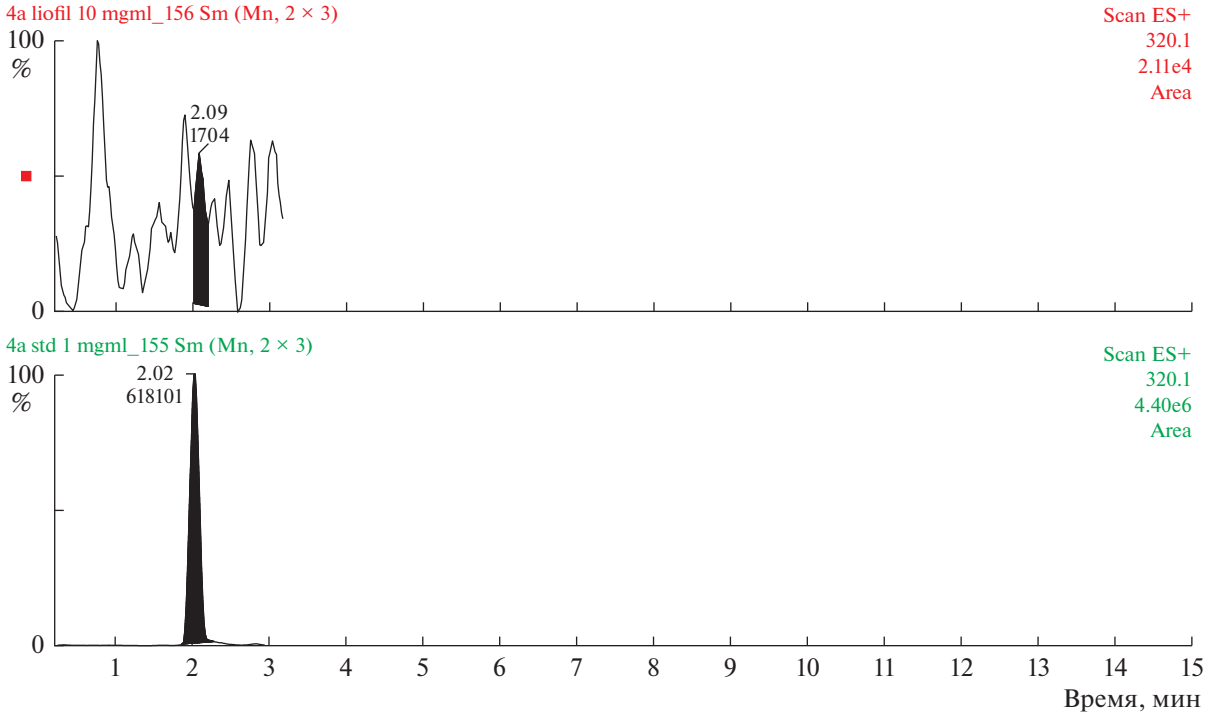

Рис. 3. Определение трипептида EDG в комплексе слизистой оболочки бронхов методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма EDG (стандартный образец), сверху – хроматограмма EDG в составе комплекса слизистой оболочки бронхов.

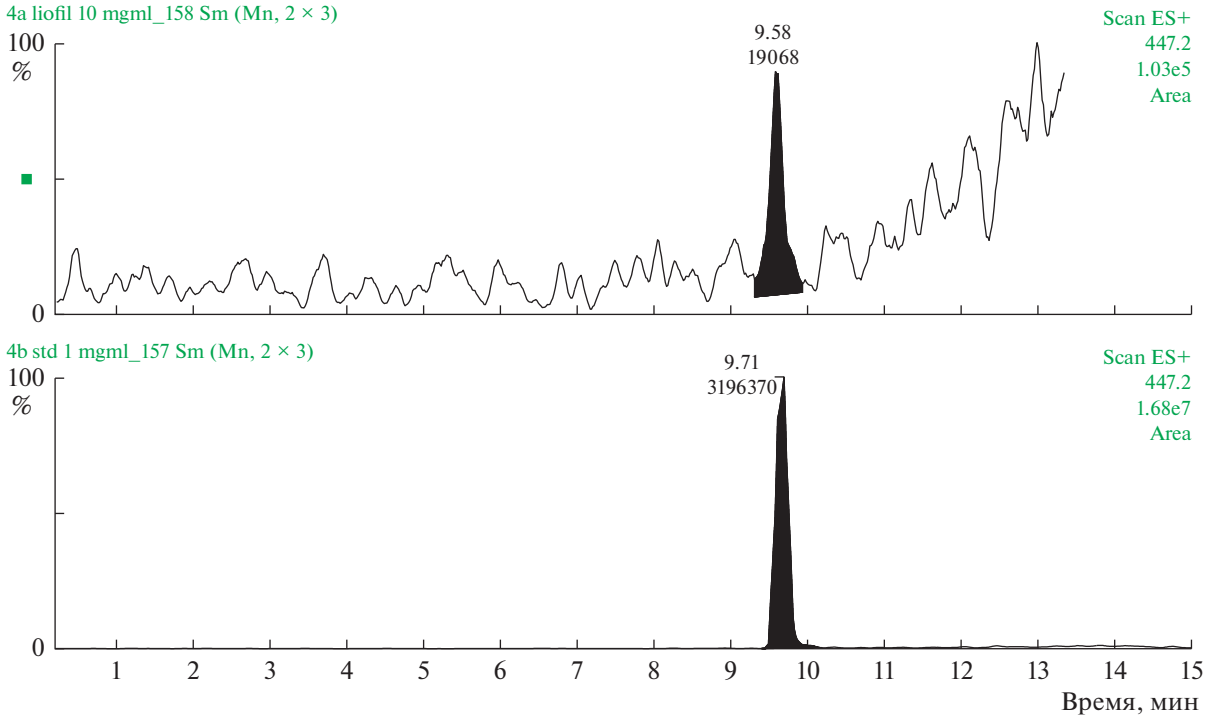

Рис. 4. Определение тетрапептида AEDL в комплексе слизистой оболочки бронхов методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма AEDL (стандартный образец), сверху – хроматограмма AEDL в составе комплекса слизистой оболочки бронхов.

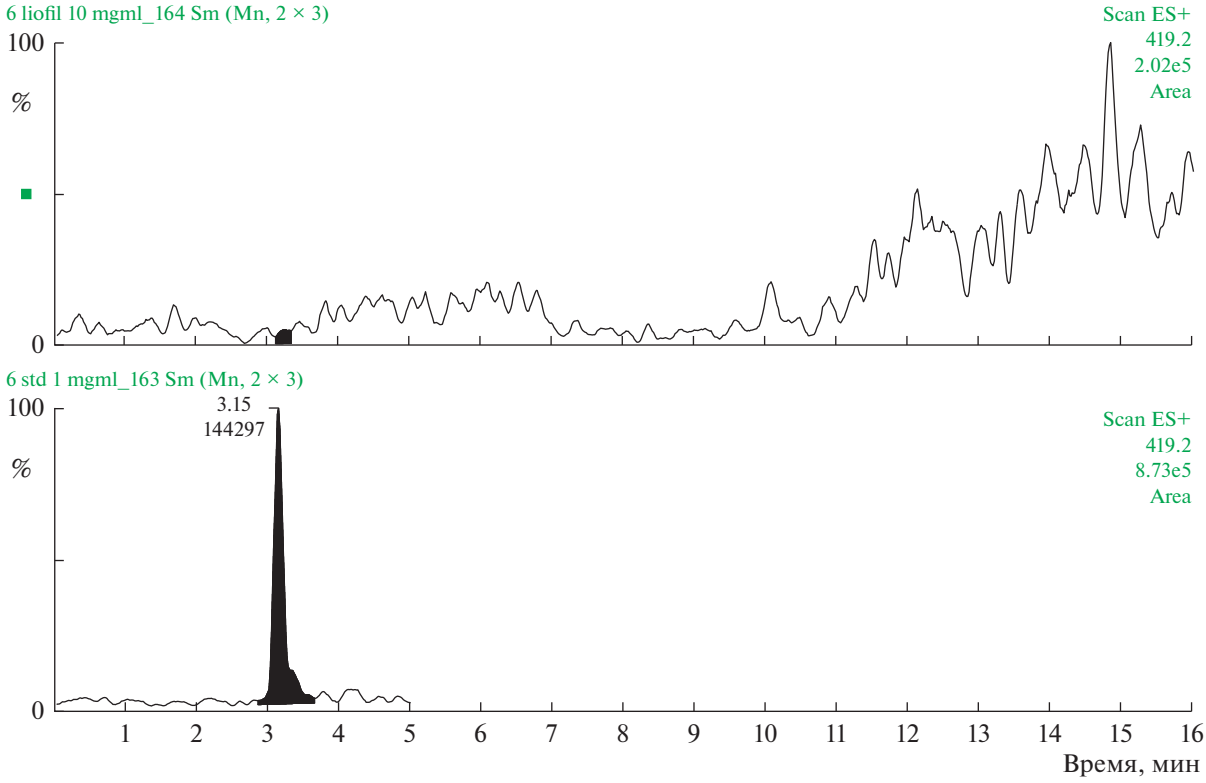

Рис. 5. Определение трипептида EDR в комплексе головного мозга методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма EDR (стандартный образец), сверху – хроматограмма EDR в составе комплекса головного мозга.

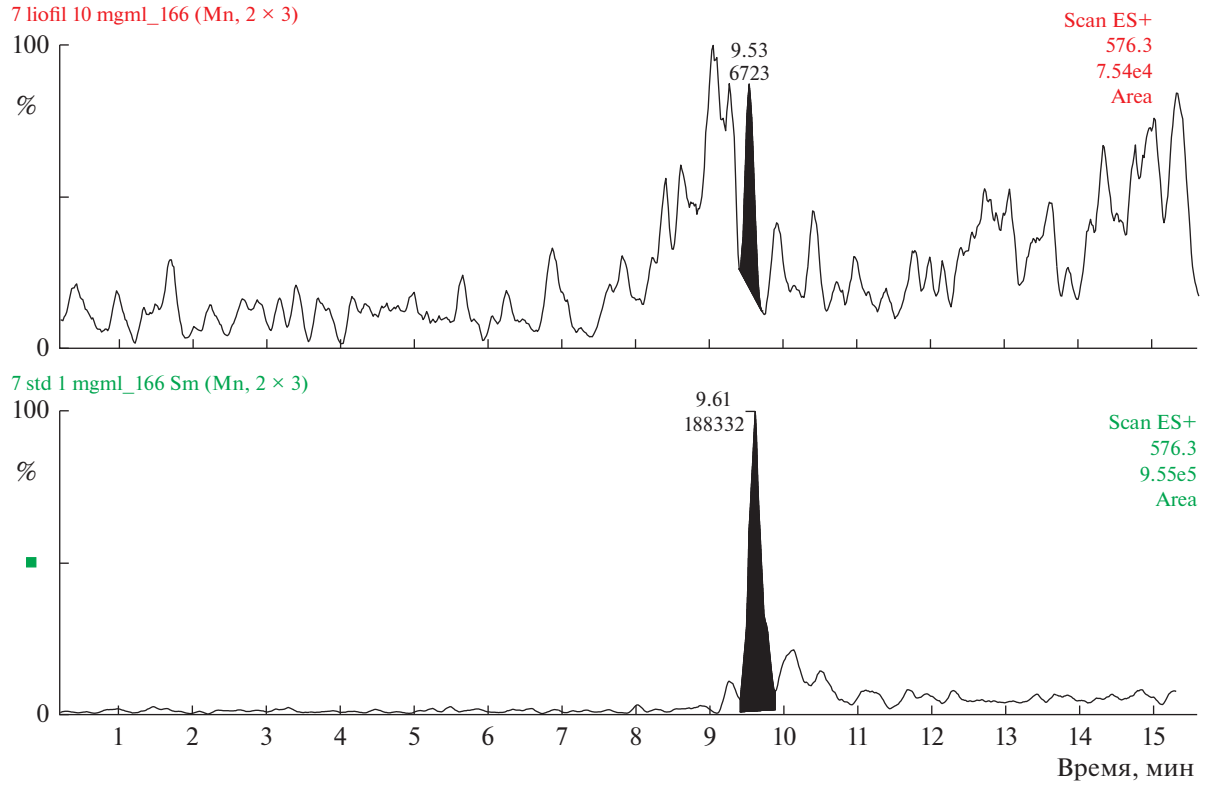

Рис. 6. Определение тетрапептида KEDW в комплексе поджелудочной железы методом УЭЖХ-МС. Внизу – хроматограмма KEDW (стандартный образец), сверху – хроматограмма KEDW в составе комплекса поджелудочной железы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беляева Г.С., Давыдова О.К., Ерофеев А.И. и др. Исследование актопротекторных свойств трипептида пинеалона // Биотехносфера. 2015. Т. 2. № 38. С. 25–31.

Гончарова Н.Д., Иванова Л.Г., Оганян Т.Э. и др. Коррекция тетрапептидом Панкрагеном нарушенной толерантности к глюкозе у старых самок макак резусов // Успехи геронтол. 2015. Т. 28. № 3. С. 579–585.

Заморский И.И., Щудрова Т.С., Линькова Н.С. и др. Пептиды восстанавливают функциональное состояние почек при цисплатиновой острой почечной недостаточности // Бюл. эксперим. биол. мед. 2015. Т. 159. № 6. С. 708–712.

Карантыш Г.В., Абрамчук В.А., Рыжак Г.А., Менджерицкий А.М. Пептидная регуляция поведения и медиаторного баланса у старых крыс в условиях окклюзии сонных артерий // Фундам. исслед. 2013. Т. 6. С. 1406–1410.

Китачёв К.В., Сазонов А.Б., Козлов К.Л. и др. Роль вазоактивного пептида в лечении хронической артериальной недостаточности нижних конечностей // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 2. С. 292–296.

Китачёв К.В., Сазонов А.Б., Козлов К.Л. и др. Эффективность пептидного биорегулятора сосудов в комплексной терапии васкулогенной эректильной дисфункции у лиц старших возрастных групп // Успехи геронтол. 2014. Т. 27. № 1. С. 156–159.

Козлов К.Л., Болотов И.И., Линькова Н.С. и др. Молекулярные аспекты действия вазопротекторного пептида KED при атеросклерозе и рестенозе // Успехи геронтол. 2016. Т. 29. № 4. С. 646–650.

Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б. и др. Перспективы применения Панкрагена для коррекции метаболических нарушений у людей пожилого возраста // Бюл. эксперим. биол. мед. 2011. Т. 151. № 4. С. 436–438.

Красковская Н.А., Куканова Е.О., Линькова Н.С. и др. Трипептиды восстанавливают количество шипиков нейронов в модели болезни Альцгеймера *in vitro* // Клет. технол. в биол. и мед. 2017. Т. 2. С. 101–104.

Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю., Трофимова С.В. и др. Влияние трипептида Пинеалона на реабилитацию когнитивных функций в процессе старения на примере макак-резусов (*Macaca mulatta*) // Вестн. Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропол. 2019. Т. 1. С. 62–73.

Менджерицкий А.М., Карантыш Г.В., Абрамчук В.А., Рыжак Г.А. Влияние короткого пептида на нейродегенеративные процессы у крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 3. С. 229–234.

Поворознюк В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В. и др. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении // Успехи геронтол. 2007. Т. 20. № 2. С. 134–137.

Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 4. С. 667–671.

Хавинсон В.Х., Григорьев Е.И., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Патент РФ № 2295970, 2006.

Хавинсон В.Х., Григорьев Е.И., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Патент РФ № 2299741. 2007а.

Хавинсон В.Х., Григорьев Е.И., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Патент РФ № 2304444. 2007б.

Хавинсон В.Х., Дурнова А.О., Полякова В.О. и др. Влияние Панкрагена на дифференцировку клеток поджелудочной железы при их старении // Бюл. эксперим. биол. мед. 2012. Т. 154. № 10. Р. 498–501.

Хавинсон В.Х., Копылов А.Т., Васьковский Б.В. и др. Идентификация пептида AEDG в полипептидном комплексе эпифиза // Бюл. эксперим. биол. мед. 2017. Т. 164. № 7. С. 52–55.

Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы – новый класс геропротекторов. Сообщение 2. Результаты клинических исследований // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 1. С. 20–37.

Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Елашкина Е.В. и др. Молекулярные аспекты антиатеросклеротического действия коротких пептидов // Клет. технол. в биол. и мед. 2014а. Т. 3. С. 185–189.

Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О. и др. Пептиды регулируют экспрессию сигнальных молекул в клеточных культурах почек при старении *in vitro* // Бюл. эксперим. биол. мед. 2014б. Т. 157. № 2. С. 227–230.

Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. и др. Трипептиды замедляют процесс старения в культурах клеток почек // Успехи геронтол. 2014в. Т. 27. № 4. С. 651–656.

Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. и др. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтол. 2014г. Т. 27. № 1. С. 108–114.

Fedoreyeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and *in vitro* specific interaction of the peptides with deoxyribooligonucleotides and DNA // Biochemistry. 2011. V. 76. № 11. P. 1210–1219.

Khavinson V.Kh., Ryzhak G.A., Grigoriev E.I. Patent US № 7625870. 2009.

Khavinson V.Kh., Tendler S.M., Vanyushin B.F. et al. Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium // Lung. 2014. V. 192. P. 781–791.

Identification of Short Peptides as Part of Polypeptide Complexes Isolated from Animal Organs

I. K. Zhurkovich[a], N. G. Kovrov[a], G. A. Ryzhak[b], E. S. Mironova[b, *], and V. Kh. Khavinson[b, c]

[a] *Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency, St. Petersburg, Russia*

[b] *St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia*

[c] *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: katerina.mironova@gerontology.ru*

Polypeptide complexes extracted from vessels, cartilages, bronchial mucosa, brain and pancreas have a similar biological effect to short peptides KED, AED, EDG, AEDL, EDR, KEDW, which were synthesized based on the analysis of the amino acid composition of the respective complexes. Using the HPLC-MS method tripeptide KED (0.02%) was detected in the composition of the polypeptide complex of vessels, and tripeptide AED (0.02%) in the composition of the cartilage complex. Tripeptide EDG (0.028%) and the tetrapeptide AEDL (0.06%) were identified as part of the bronchial mucosa complex. The polypeptide complex of the brain contains tripeptide EDR (0.024%) and the pancreatic complex – tetrapeptide KEDW (0.035%). The biological effects of the polypeptide complexes can be accredited to the effect of the short peptides that they contain.

Keywords: polypeptide complexes, identification, peptides, biological activity