Анализ лёгкой пептидной фракции Лаеннека методами современной протеомики

Торшин И.Ю.[2], Згода В.Г.[4], Громова О.А.[1], Баранов И.И.[3], Демидов В.И.[1], Назаренко О.А.[1], Сотникова Н.Ю.[1]

[1] – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный
[2] – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва
[3] – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново
[4] – ФГБУ «Научный Центр Акушерства, Гинекологии и Перинатологии им. акад. В.И.Кулакова», г. Москва

Резюме. Препарат Лаеннек основан на стандартизованном гидролизате плаценты человека и отличается высокой эффективностью при регенерации тканей. В настоящем исследовании проведён анализ лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да тремя методами: (1) высокоточной масс-спектрометрией на масс-спектрометре Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия); (2) иммуноферментным анализом на содержание эпитопов белков посредством иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) с использованием моноклональных антител к IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12) и (3) секвенирование выделенных пептидов. Установлена высокая степень стандартизации препарата по пептидам. С использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов Iα2, Vα2, XIXα1, «цинковых пальцев», а также активных пептидных фрагментов ростовых факторов IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. Наличие этих пептидов в составе Лаеннека позволило сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата.

Ключевые слова: гидролизат плаценты, Лаеннек, масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ, секвенирование пептидов, протеомика.

Analysis of the light peptide fraction of Laennec by proteomic methods

Torshin I.Yu.[1], Zgoda V.G.[2], Gromova O.A.[3], Baranov I.I.[4], Demidov V.I.[3], Nazarenko O.A.[3], Sotnikova N.Yu.[3]
[1] – FGBOU IN «Moscow Institute of Physics and Technology», Dolgoprudny
[2] – FGBNU V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow
[3] – FGBOU IN «Ivanovo State Medical Academy» Russian Ministry of Health, Ivanovo
[4] – Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. Acad. V.I. Kulakov, Moscow

Abstract. Laennec preparation is based on standardized human placenta hydrolyzate and is highly effective in the regeneration of tissues. This study presents the results of analysis of the light peptide fraction of Laennec (<3000 Da) by using three methods: (1) mass spectrometry using Q-Exactive (ThermoScientific, Germany), (2) enzyme immunoassay for the discovery of epitopes of proteins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal antibodies to IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF and chemokines (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12) and (3) peptide sequencing. The results indicated high degree of standardization of Laennec concerning the peptide composition. Amino acid sequences of 47 peptides were established using standard software. The composition of Laennec includes the peptide fragments of albumin, collagens Iα2, Vα2, XIXα1, «zinc fingers», regenerative growth factors IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF. The presence of these peptides in Laennec allowed us to formulate a number of previously unknown molecular mechanisms of the Laennec action.

Keywords: placenta hydrolyzate, Laennec, mass spectrometry, immunoassay, peptide sequencing, proteomics.

Автор, ответственный за переписку:
Громова Ольга Алексеевна — д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России, 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

В современной клинической медицине, гидролизаты плаценты человека (ГПЧ) используются, начиная с первой четверти 20-го века (во многом, благодаря работам В.П. Филатова, 1875–1956 гг.). Систематический анализ более 3 500 публикаций по клинической и экспериментальной фармакологии ГПЧ позволил установить репрезентативный набор исследований, описывающих практически все документированные применения гидролизатов плаценты, такие как иммунорегуляция, ранозаживление, нейротрофические эффекты, нормализация пигментации кожи, гепатопротекция [1].

Разносторонние клинические эффекты гидролизатов плаценты являются следствием их сложнейшего молекулярного состава. ГПЧ содержат значительные количества т. н. «биогенных стимуляторов» (пептиды, гормоны, и др.). В составе плаценты человека и высших приматов обнаружено более 4 000 различных белков, включая различные факторы роста, гормоны, цитохромы, факторы фибринолиза, ферменты энер-

гетического метаболизма и т. д. [2], идентифицированы эстрадиол [3], простагландины [4], энкефалины и другие нейропептиды [5, 6], ряд микроэлементов (прежде всего, значительные количества органического цинка) [7].

Лекарственный препарат Лаеннек, получаемый из гидролизата плаценты путём ферментации, ультрафильтрации, и других высокотехнологичных процессов, хорошо зарекомендовал себя в эстетической медицине, гепатологии и лечении атопического дерматита. Ранее, нами был проведён экспериментально-теоретический анализ некоторых элементов пептидного состава препарата Лаеннек с последующим биоинформационным анализом функций обнаруженных пептидов [8]. В составе препарата были найдены пептидные фрагменты инсулиноподобного фактора роста (пептид SRLL), иммуноглобулина G (пептид SSFGI), интерлейкина-1α (пептид MLSLRQSI). Важно отметить установление наличия в составе препарата активного пептида нейромедина N (пептид KIPYI). Данные пептиды отчасти объясняют иммуномодуляторный, гепатопротекторный, нейропротекторный эффекты препарата.

В настоящей работе впервые предпринята попытка систематического исследования лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да с использованием одной из передовых технологий современной протеомики – гибридного масс-спектрометра (МС), соединяющего в себе возможности хроматографического выделения ионов и многомерного МС-анализа. МС-орбитальные «ловушки ионов» в составе таких приборов работают в режиме высокого разрешения и позволяют проводить идентификацию молекул пептидов и белков небольшого размера. Быстрая скорость сканирования и многозадачность позволяют проводить идентификацию и количественный анализ большого числа компонентов с высокой точностью, что чрезвычайно важно при анализе лекарственных препаратов сложного состава.

Материалы и методы

Процесс экспериментального исследования пептидного состава Лаеннека состоял из трёх основных этапов: очистки препарата, хроматографического разделения пептидов и определения масс-спектра лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да с параллельной идентификацией аминокислотных последовательностей пептидов.

Очистка препарата состояла в отделении липидной фракции и обессоливании, ультрафильтрации до 3 000 Да. Для очистки препарата от липидной фракции использовался модифицированный метод Брокер-хоффа-Даусона-Хюбшера [9]. Сначала проводили мягкое щёлочное дезацилирование фосфолипидов. Методику отрабатывали на смеси 1 мл протеолипосом из 1–20 мг фосфатидилхолина и 0,05–0,2 мг бацитрацина или грамицидина А. 1 мл образца очищенного Лаеннека лиофилизовали, доливали гексан, метанол (1:1, v/v) и разводили в 2 раза 0,25М NaOH в метаноле. 45 мин инкубировали при встряхивании при комнатной температуре, включая 15 мин – при $t = 75$ °С. Последовательно приливали метанол, гексан и воду (1:4:4, v/v), перемешивали и центрифугировали 1 мин при 1000 g. Фракцию с гексаном отделяли, водно-метанольную – нейтрализовали HCl до pH 4–6. К нейтрализованной водно-метанольной фракции добавляли гексан, перемешивали, центрифугировали 1 мин при 1 000 g, осторожно отсасывали фракцию с гексаном, не затрагивая осадок на границе раздела фаз. Повторяли процедуру 4 раза. Водно-метанольную фракцию объединяли, лиофилизировали, осадок ресуспендировали сначала в смеси метанол: вода (1:1), супернатант сливали, затем в смеси хлороформ: метанол (1:1), 0,2% ТФУ, супернатанты объединяли, высушивали от хлороформа и обессоливали.

Обессоливание лёгкой пептидной фракции проводили на мини-колонке при помощи центрифугирования [10]. В мини-колонку 0,75×4,5 см («Raining Instrument», США) наливали 2 мл сефадекса G-10 («Pharmacia», Швеция), декантированного в смеси метанол: вода (85:15, v/v), каплями добавляли 160 мкл того же раствора и уравновешивали на центрифуге 1 мин при 1 000 g. Процедуру повторяли до тех пор, пока на выходе не остаётся 150 мкл раствора. 150 мкл образца каплями наносили на гель и центрифугировали, как описано выше. Гель после однократного использования заменяли. После процедуры обессоливания потери белка составляли не более 35%.

Хроматографическое разделение пептидов. Пептиды в составе выделенной лёгкой пептидной фракции разделялись с использованием параллельной системы хроматографического разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano system (производство Dionex). Исследуемые образцы пептидной фракции вводили в хроматографическую «колонку-ловушку» Acclaim PepMap (2см, внутренний диаметр 75 мкм, C_{18}, 3 μm, 100 А, производство Thermo Scientific) со скоростью 2 мкл/мин в сочетании с 0,1% раствором муравьиной кислоты в воде. Через 5 мин колонка-ловушка автоматически подсоединялась к колонке для аналитической хроматографии (колонка Zorbax 300SB- C18, 15 см × внутренний диаметр 75 мкм, 3,5 мкм, производство Agilent). Элюирование пептидов проводили с применением смеси растворителей «А» (0,1% (об) раствор муравьиной кислоты в дистилированной воде для ВЭЖХ) и «В» (0,1% (об) раствор муравьиной кислоты в 80% (об) растворе ацетонитрила в воде). Хроматографическое разделение пептидов проводили с применением линейного градиента растворителя В (от 5 до 40%) при скорости 300 нл/мин в течение 120 мин с последующей стадией промывки (промывка 10 мин 99% растворителем В) и стадией уравновешивания (промывка 10 мин 5% растворителем В).

Масс-спектрометрия с параллельной идентификацией пептидов. Масс-спектрометрический (МС) анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия). Были использованы наноаэрозольный источник ионов «Flex» с напряжением ионизации 1 800 V и температурой капилляра 200 °C. Данные масс-спектра собирались в соответствии с количеством имеющегося в МС камере количеством пептида-прекурсора; собирались данные о частицах пептидов, возникающих при фрагментации исходных пептидов в МС камере. Предварительное сканирование осуществлялось при разрешении 70 000, диапазон сканирования – 400–1200 m/z, целевые значения AGC – 1×10^6, максимальное время впрыскивания – 50 мс. Фрагментацию пептидных частиц в МС-камере проводили для 20 наиболее часто встречающихся ионов при нормированной энергии столкновения – 30, динамическом исключении – 10 с. Сканирование MS/MS образующихся ионов проводилось с разрешением 17,500, целевые значения составили 10^5, максимальное время впрыска – 100 мс, окно изоляции – 2,0. Последовательности пептидов определялись программным обеспечением Mascot (http://www.matrixscience.com) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей SwissProt.

Иммуноферментный анализ пептидной фракции Лаеннека. Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген–антитело. В основе ИФА лежит принцип взаимодействия иммуносорбента – антигена возбудителя инфекции – с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген–антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку.

Был проведён ряд тестов на установление содержания в составе Лаеннека таких ростовых факторов, как IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12 и др.). Определение содержания данных белков (или соответствующих эпитопов этих белков) проводилось посредством иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Моноклональные антитела к определённому белку (например, к IGF-1) были введены в 96-луночным планшетом для проведения ИФА (Immulon 2 HB, ThermoScientific) и инкубировались при 4 °C в течение 12 ч. Затем добавлялась пептидная фракция Лаеннека и инкубировалась при комнатной температуре в течение 1 ч. Неадсорбированное содержимое образцов удаляли из лунок трёхкратной промывкой буфером. Затем добавлялись стрептавидин-сопряжённая щёлочная фосфатаза и р-нитрофенил фосфат и оптическая плотность окраски получаемого раствора считывалась ридером Multiskan-GO Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования был изучен состав двух образцов пептидной фракции Лаеннека при различных условиях эксперимента. Всего было проведено 6 протеомных экспериментов. Результаты каждого из этих экспериментов наиболее удобно представить в виде двумерных (2D) масс-спектрограмм (рис. 1). Каждая

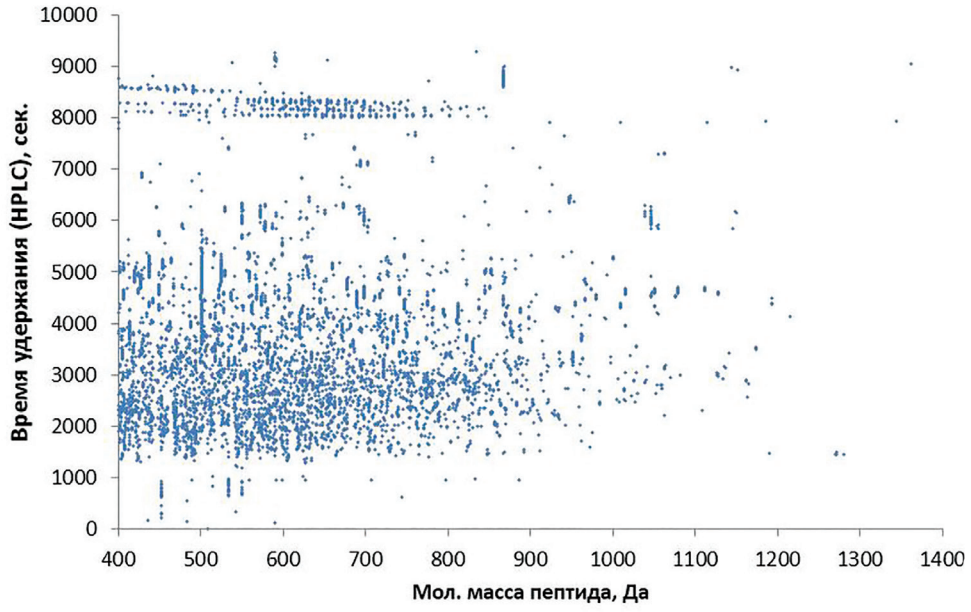


Рис. 1. Пример двумерной (2D) масс-спектрограммы пептидной фракции препарата Лаеннек.
Примечание: Каждая точка на 2D спектрограмме представляет, по крайней мере, 1 пептид, обнаруженный в составе Лаеннека

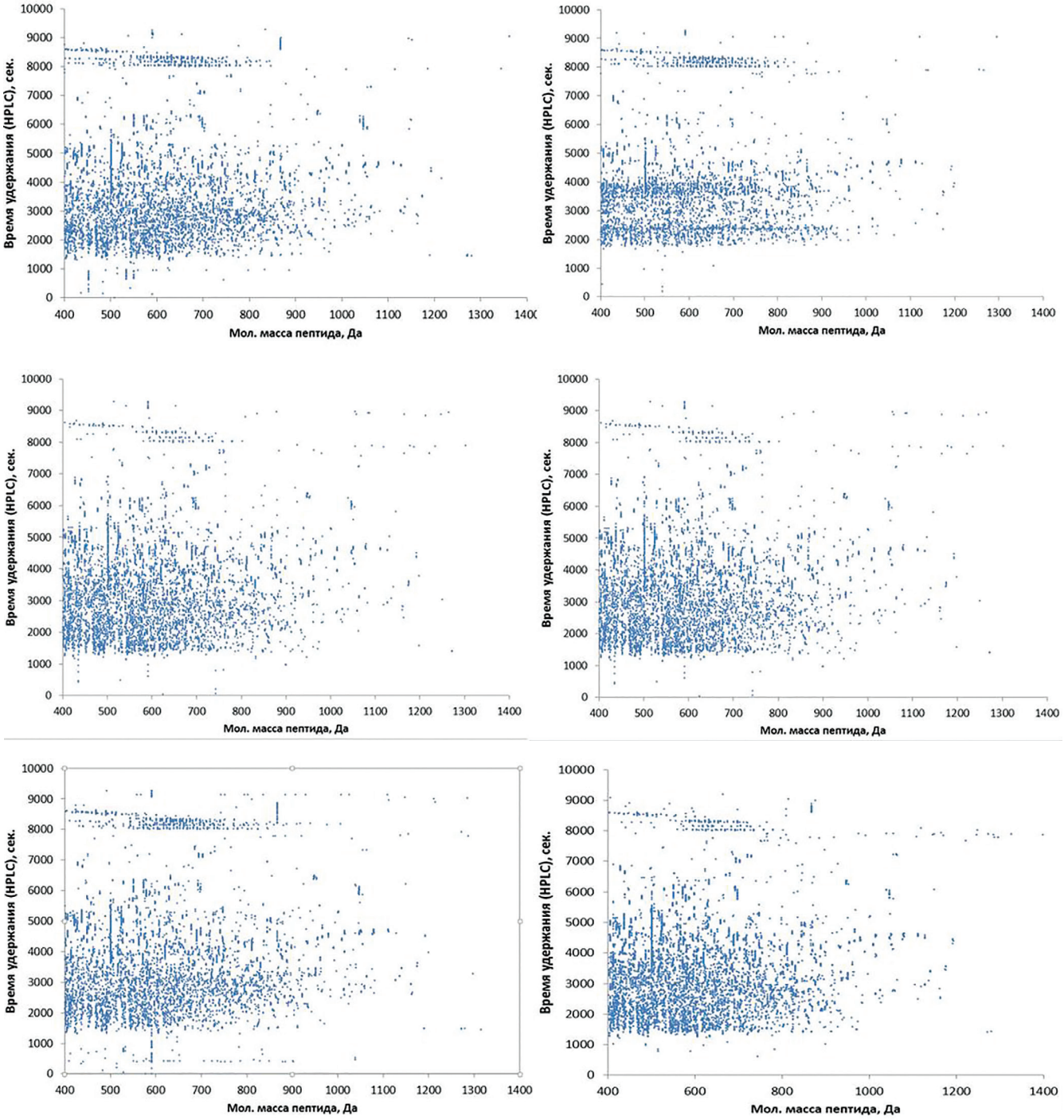


Рис. 2. 2D масс-спектрограммы всех проведённых экспериментов (различные образцы, различные условия съёмки масс-спектров)

точка 2D спектрограммы соответствует пептиду; по оси «X» представлено значение молекулярной массы этого пептида, а по оси «Y» – значение хроматографического «времени удержания» пептида (которое характеризует скорость прохождения пептида через хроматографическую колонку).

На рис. 2 приведены результаты всех проведённых протеомных экспериментов. Важным результатом является очевидная схожесть распределений пептидов по молекулярной массе и времени удержания пептида. Это указывает на хорошую стандартизацию препарата Лаеннек по пептидному составу и на приемлемое технологическое качество проведённых протеомных анализов.

Объединённая 2D масс-спектрограмма пептидной фракции Лаеннека (рис. 3), которая включила результаты всех проведённых протеомных экспериментов, указывает на ключевые особенности пептидного состава Лаеннека.

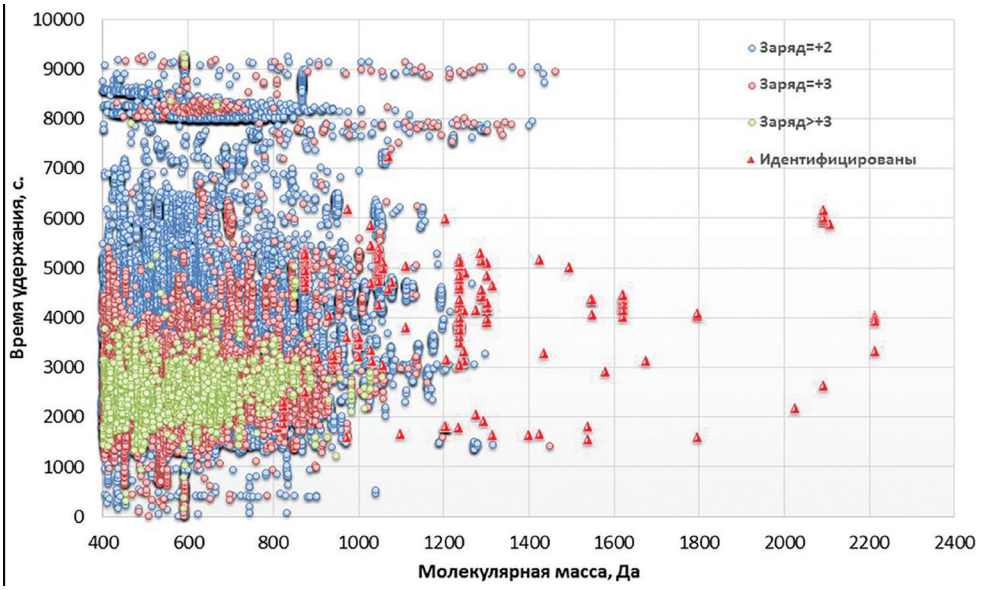


Рис. 3. Объединённая 2D масс-спектрограмма пептидной фракции Лаеннека (все эксперименты).
Примечание: Точки, соответствующие выделенным пептидам, окрашены в соответствии с зарядами пептидов. Пептиды, для которых удалось идентифицировать аминокислотную последовательность, отмечены треугольниками

На полученной диаграмме плотности (рис. 4) точки с более высокими значениями плотности соответствуют пептидам с более высокой частотой встречаемости.

Кластерный анализ пиков плотности на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека (рис. 5).

Интересно сопоставить результаты МС-исследования состава Лаеннека с результатами ранее проведённого иммуноферментного анализа (ИФА) препарата. Нами было проведено количественное определение содержания в Лаеннеке различных белков методом иммуноферментного анализа. ИФА с антителами к пептидам, перечисленным в табл. 1 указал на значительное содержание в Лаеннеке инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), лептина, трансформирующего фактора роста β1, фактора роста гепатоцитов.

Сопоставление результатов кластерного анализа масс-спектрометрических данных по пептидному составу Лаеннека с результатами иммуноферментного анализа препарата позволяет сделать весьма интерес-

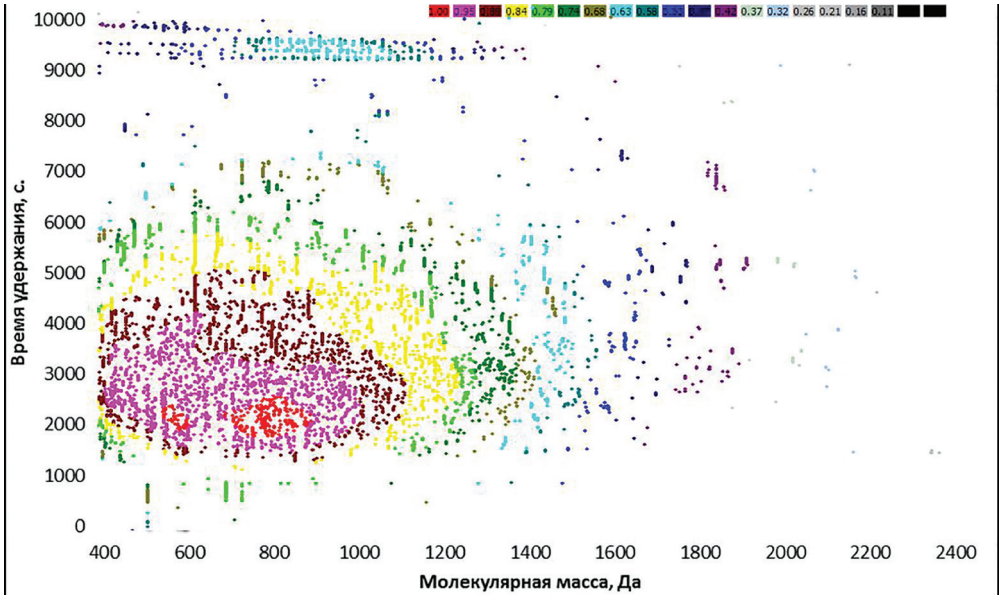


Рис. 4. Анализ плотности расположения точек на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека.
Примечание: Точки с более высокими значениями плотности (красные, пурпурные, тёмнокрасные) соответствуют более высокой встречаемости пептидов

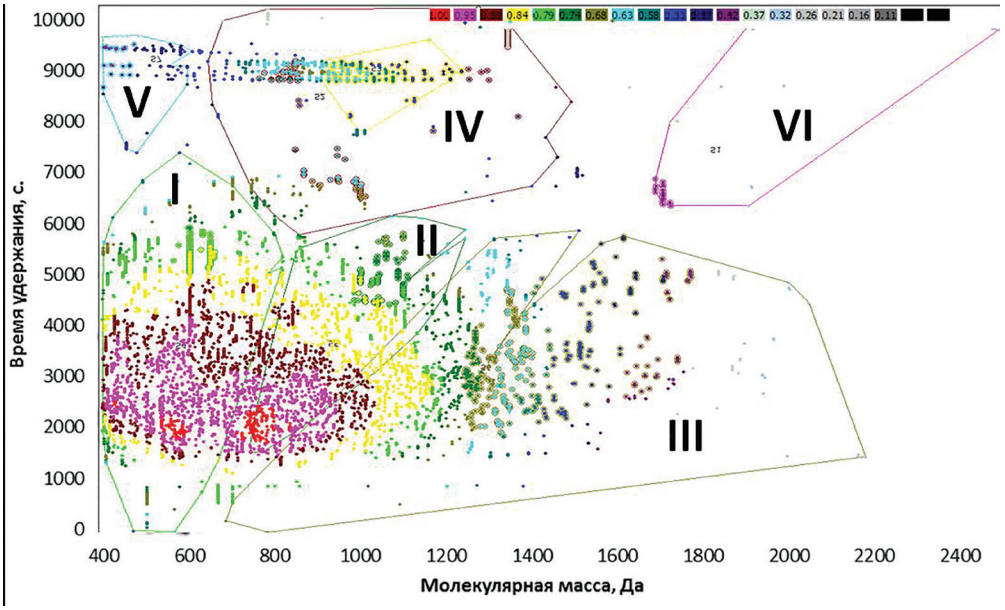


Рис. 5. Кластерный анализ пиков плотности на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека.
Примечание: Кластеры (т. е. пики плотности, обведены линиями) соответствуют наиболее типичным значениям молекулярных масс пептидов, встречающихся в составе пептидной фракции

Таблица 1

Количественное определение различных пептидов, обнаруженных в составе препарата Лаеннек (иммуноферментный анализ). Содержание пептидов указано в пг/мл (за исключением ИФНγ, количество которого указано в МЕ/мл)

Пептид	Название	Содержание
ИФР-1	Инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1)	4 100
Лептин	Белковый гормон лептин	1 200
TGF-1	Трансформирующий фактор роста β1	500
HGF	Фактор роста гепатоцитов (ФРГ)	130
M-CSF	Фактор роста колоний макрофагов	87
VEGF	Фактор роста васкулярного эндотелия	28
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста	13,5
IL-8	Интерлейкин-8	8,8
IL-1a	Интерлейкин-1α	7,3
IL-1b	Интерлейкин-1β	6,8
G-CSF	Колониестимулирующий фактор гранулоцитов	6,6
TNFa	Фактор некроза опухоли α (ФНО-α)	5
IL-12	Интерлейкин-12	4,6
EGF	Эпидермальный фактор роста	2,6
IL-10	Интерлейкин-10	1,2
IL-3	Интерлейкин-3	1
IL-5	Интерлейкин-5	1
IL-4	Интерлейкин-4	0,8
IL-6	Интерлейкин-6	0,2
IL-2	Интерлейкин-2	0,1
IFN-g	Интерферон-γ	0,01

ные выводы. Так, количественное определение содержания в Лаеннеке различных ростовых факторов или их фрагментов методом иммуноферментного анализа ELISA указало на значительное содержание в Лаеннеке инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1, ~4100 пг/мл), лептина (~1200 пг/мл), трансформирующего фактора роста β1 (ТФРβ1, ~500 пг/мл), фактора роста гепатоцитов (ФРГ, ~130 мг/мл) и следовых количеств ряда других ростовых факторов.

С использованием стандартного программного обеспечения (программный пакет и сервер MASCOT) были установлены аминокислотные последователь-

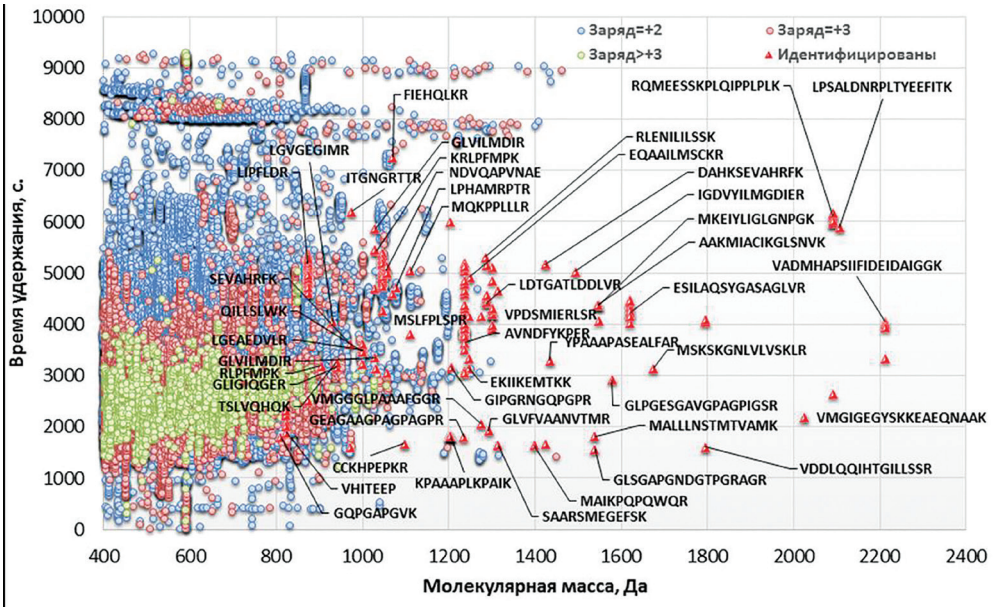


Рис. 6. Аминокислотные последовательности пептидов, идентифицированных на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека

ности новых 47 пептидов в лёгкой фракции препарата (рис. 6). Данные пептиды расположены, преимущественно, в пределах III-го и VI-го кластеров.

Представленные на рисунке 6 данные позволяют сделать однозначный вывод: стандартное программное обеспечение, используемое для анализа многомерных данных пептидной масс-спектрометрии, не отличается высокой степенью применимости к анализу произвольной смеси пептидов. В самом деле, из более чем 10000 точек на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека (рис. 6), повсеместно используемый программный пакет позволил провести идентификацию аминокислотных последовательностей всего для 47 пептидов (т. е. менее чем 0,5% от всех зарегистрированных в ходе экспериментов пептидов).

Тем не менее, данные, собранные в ходе настоящего масс-спектрометрического исследования (в частности, данные по расщеплению пептидов при различных условиях ионизации), в принципе, могут позволить установить хотя бы приблизительные аминокислотные последовательности всех пептидов, находящихся в составе Лаеннека. Очевидно, что разработка такого метода анализа МС-данных лежит вне задач настоящей статьи.

Тем не менее, с использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Следует отметить, что из 47 пептидов, для которых стандартный пакет «MASCOT» позволил идентифицировать аминокислотные последовательности, только 12 пептидов, перечисленные в табл. 2, могут быть отнесены к белкам протеома человека с достаточно высокой степенью достоверности. Последовательности остальных 35 пептидов могут являться как артефактами, связанными со сложной технологией приготовления препарата (которая, возможно, включает трипсинолиз, ферментирование с последующей ультрафильтрацией, частичным фракционированием, нагревом и др.), так и с недостатками обсуждаемого программного обеспечения для анализа данных МС.

В целом, установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов Iα2, Vα2, XIXα1, «цинковых пальцев» и др. (см. табл. 2). Наличие этих пептидов в составе пептидной фракции Лаеннека позволило сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата. Ниже представлены результаты анализа биологической активности этих пептидов.

Пептидный фрагмент DAHKSEVAHRFK альбумина. Данный пептид является N-концевым пептидом альбумина и имеет конформацию альфа-спирали (рис. 7). Однако как весь пептид, так и его фрагмент «DAHK», обладают рядом интересных биологических свойств, не относящихся непосредственно к вхождению этого пептида в молекулу альбумина.

Пептид «DAHKSEVAHRFK» и такие его фрагменты, как «DAHK» (т. е. Asp-Ala-His-Lys), проявляют выраженные антиоксидантные свойства [11]. Было установлено, что фрагмент «DAHK» в составе пептида формирует устойчивый сайт связывания ионов меди. В сочетании с ионом меди пептид «DAHKSEVAHRFK» формирует пептидный аналог супероксид дисмутазы (СОД) – известного антиоксидантного фермента.

Антиоксидантный эффект пептидных фрагментов «DAHKSEVAHRFK» зависит от наличия иона меди в составе структуры пептида. Без иона меди антиоксидантные свойства пептидных фрагментов, измеряемые как ингибирование формирования прооксидантных радикалов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (т. н. «TBARS»), были крайне низ-

Таблица 2

Идентификация пептидных фрагментов белков протеома человека, обнаруженных в составе Лаеннека

Белок протеома человека	Обнаруженный пептид	Пептид в составе белка
Альбумин	DAHKSEVAHRFK	DAHKSEVAHRFK
Коллаген Iα2	GEAGAAGPAGPAGPR	GEAGAAGPAGPAGPR
Коллаген Vα2	GLPGESGAVGPAGPIGSR	GVPGDPGAVGPLGPRGER
Коллаген XIXα1	GLSGAPGNDGTPGR	GTPGTPGNDGVPGR
Rwd домен белка RNF25	ITGNGRTT	IKGNGRT
Pwwp домен	ITGNGRTT	ITEDGRT
Субъединица 26S протеосомы (макропаин)	VADMHAPSIIFIDEIDAIGGK	VAEEHAPSIVFIDEIDAIGTK
Белок лейцинового повтора 63	RLENILILSSK	RLENILILSSK
Белок оптимизации трансляции митохондрий 1	KMIACIKGL	KMITCIRGL
Изоцитрат дегидрогеназа 1	ACIKGLSNV	ACIKGLPNV
Карбоксипептидаза A5	GQPGAPGVK	GQPPAPGVK
Активатор плазминогена	GQPGAPGVK	GQPGEPGV
Хорионический гонадотропин	GQPGAPGVK	QPGAP
«Цинковый палец» KRAB	RQMEESSKPLQIPPLPLK	RLLEENALPVLQVPSLPLK
«Цинковый палец» № 549	TSLVQHQK	TSLIQHQK

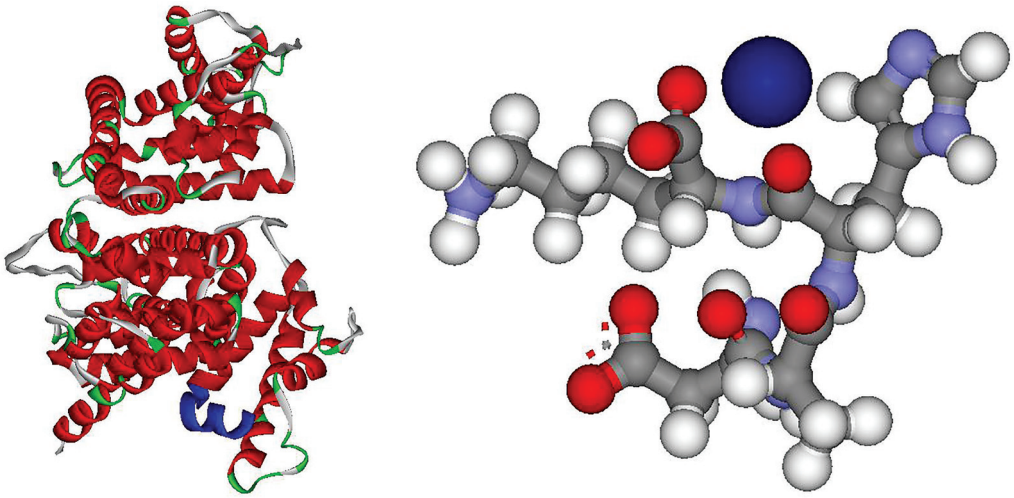


Рис. 7. Расположение пептида «DAHKSEVAHRFK», обнаруженного в составе Лаеннека, в пространственной структуре альбумина (выделен синим цветом, pdb-файл 2TF0: A). Справа, показан предположительный сайт связывания иона меди пептидным фрагментом «DAHK»

ками (единицы процентов). Добавление к пептидам ионов меди существенно повышало антиоксидантные свойства пептидов. Например, комплекс DAHK: Cu (соотношение 2:1) ингибировал формирование TBARS на 95,4%, а комплекс DAHKSEVAHRFK: Cu (соотношение 2:1) – на 95,8%. В комплексе с медью, исследуемые пептиды также снижали перекисное окисление липидов (рис. 8).

В сочетании с ионом меди, пептидный фрагмент пептид «DAHK» и сам пептид «DAHKSEVAHRFK» формируют пептидные аналоги СОД. СОД-подобная активность этих пептидных комплексов исследовалась с использованием восстановления вещества NBT (краситель «нитро-голубой тетразолиум») и показала существенную СОД-активность в наномолярном диапазоне концентраций пептида (рис. 9). Напомним, что ферменты СОД, наряду с глутатион пероксидазами и каталазой, являются важнейшими ферментами антиоксидантной защиты организма.

Пептид «GEAGAAGPAGPAGPR» коллагена Iα2. В составе Лаеннека было обнаружено несколько пептидов коллагенов различных типов: Iα2, Vα2 и XIXα1. Аннотировать функции этих пептидов стало возможным на основе информации о белок-белковых взаимодействиях, представленной в базе данных всех известных пространственных структур белок-белковых комплексов (PDB, Protein Data Bank).

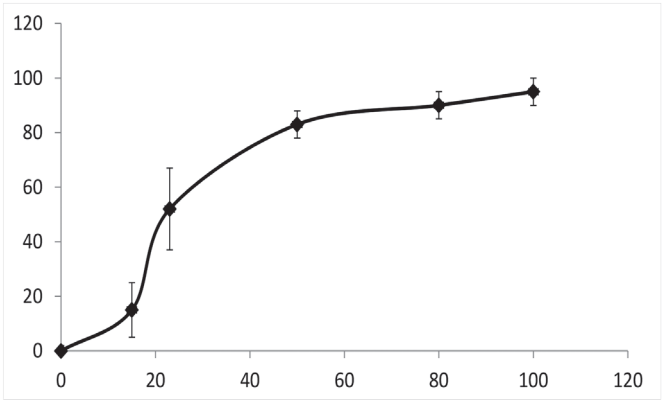


Рис. 8. Ингибирование перекисного окисления ЛПНП комплексом пептидного фрагмента DAHK с ионом меди.
Примечание: Титрование проводилось в присутствии 0,5 мг/мл ЛПНП, 50 ммоль/л CuCl2, 0,5 ммоль/л аскорбата и 1 ммоль/л перекиси водорода. Образцы выдерживались 3 ч при 37 °C

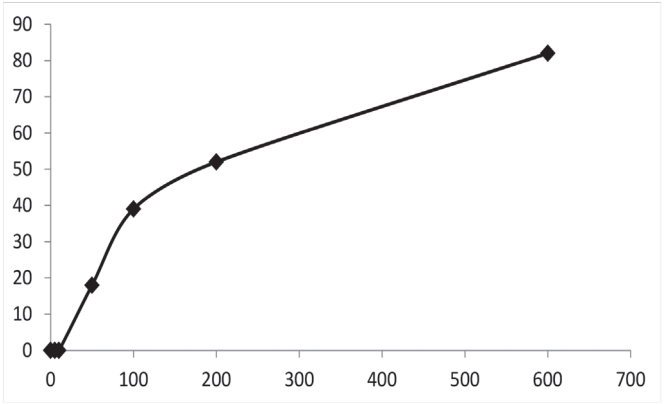


Рис. 9. Исследование СОД-подобной активности комплекса DAHK: Cu (в соотношении 1:1).
Примечание: Исследование проводилось с использованием 1,2 ммоль/л раствора красителя NBT («нитро-голубой тетразолиум»)

Предварительный анализ показал, что эти пептиды коллагена могут участвовать в образовании более 20 белок-белковых комплексов в протеоме человека (например, с белком Sparc, адгезином, факторами коагуляции крови, интегринами и др.). Очевидно, что систематическое рассмотрение всех этих взаимодействий пептидных фрагментов коллагена находится вне рамок настоящей статьи.

Важно отметить, что аминокислотный мотив, известный как «GVMGFO» и соответствующий фрагменту GAAGPA в пептиде «GEAGAAGPAGPAGPR», является основным сайтом связывания рецепторов дискоидиновых доменами [12]. Рецепторы дискоидиновых доменов, DDR1 и DDR2 – повсеместно распространённые тирозинкиназные рецепторы, активируемые за счёт связывания с коллагеном. Анализ пространственной структуры комплекса коллагеновых пептидов с дискоидиновым рецептором DDR2 показал, что пептид GEAGAAGPAGPAGP непосредственно участвует в связывании с рецептором DDR2 (рис. 10) [13].

Связывание коллагена рецепторами DDR приводит к устойчивой активации этих рецепторов, которые регулируют адгезию, рост, миграцию и деление клеток, а также реконструкцию внеклеточного матрикса соединительной ткани [14]. Делеции DDR1 в эксперименте приводят к аномалиям развития и функции почек [15], нарушениям заживления ран [16], снижению интенсивности роста хондроцитов [17]. Сходный фенотип наблюдается у пациентов с врождёнными

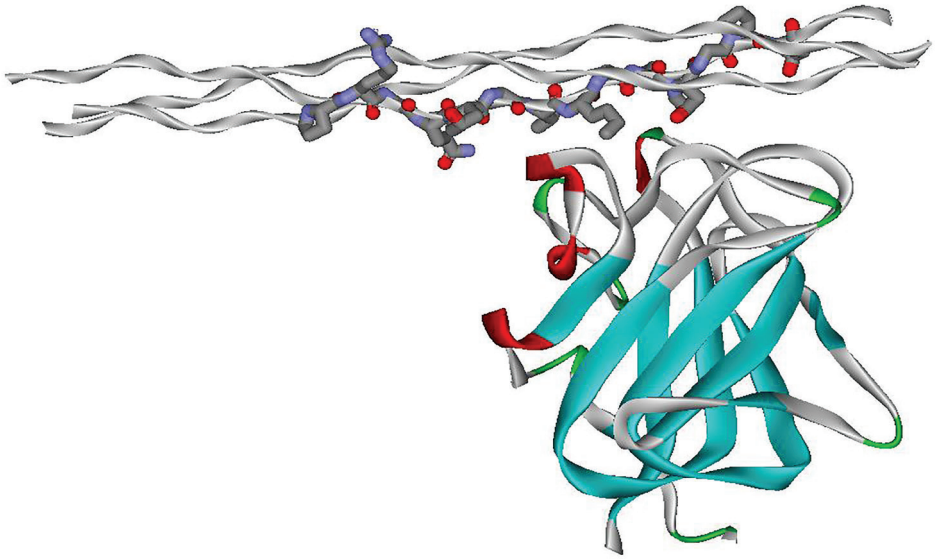


Рис. 10. Пептид GEAGAAGPAGPAGP (показан решётчатой моделью) соответствует фрагменту коллагена 14–27 в комплексе коллагена с дискоидиновым рецептором DDR2 (pdb-файл 2WUH: B)

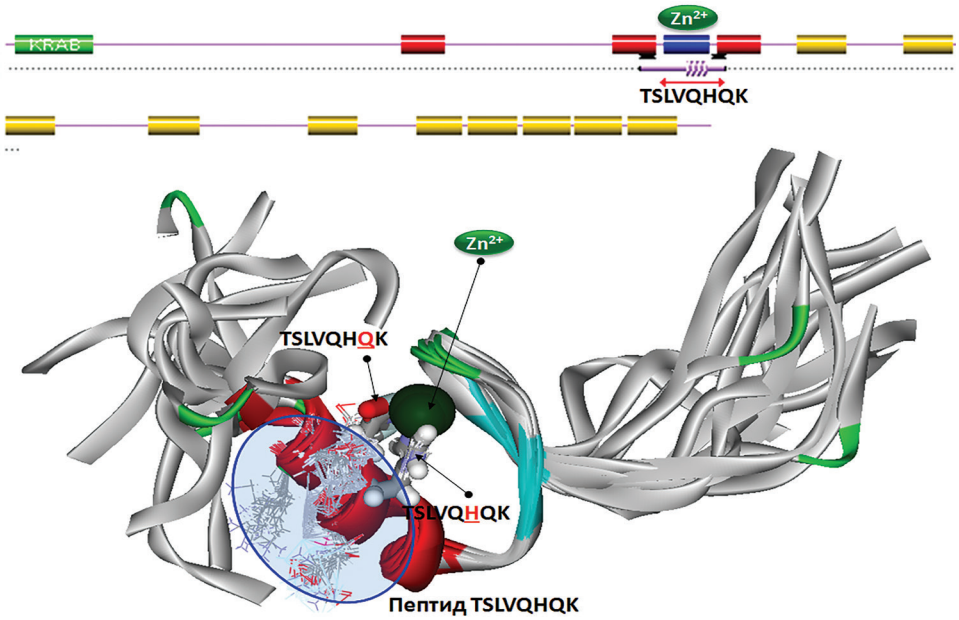


Рис. 11. Пептид TSLVQHQK, найденный в составе Лаеннека, образует сайт связывания иона цинка в составе «цинкового пальца» № 549 протеома человека. Модель на основе PDB файла 2EMB

генетическими дефектами гена DDR2 [18]. Нарушения функции рецепторов DDR в организме человека также ассоциированы с остеоартритом, фиброзом и повышенной восприимчивостью к канцерогенезу [14]. Таким образом, активация DDR рецепторов пептидом «GEAGAAGPAGPAGP» коллагена Iα2, обнаруженным в составе Лаеннека, стимулирует качественную реконструкцию кожи, хряща и может оказывать противоопухолевый эффект.

Пептид «ITGNGRTT». Данный пептид, найденный в составе Лаеннека, отличается высокой степенью сходства с пептидом IKGNGRT Rwd домена белка RNF25 (Ring Finger Protein 25, аминокислоты 31–37 в pdb 2DAY: A). Этот белок взаимодействует с фактором транскрипции NF-κB, который регулирует процессы воспаления, а также связывает убиквитин лигазы, необходимые для контролируемой деградации внутриклеточных белков на протеасоме [19]. Также этот пептид схож с пептидом ITEDGRT в структуре Pwwp-домен содержащего протеина 2b (аминокислоты 8–14 в pdb 4LD6: A), который также регулирует деградацию белков на протеасоме [20]. Другой пептид, обнаруженный в составе Лаеннека, «VADMHAPSIIFIDEIDAIGGK», схож с фрагментом 270–290 субъединицы 26S- протеасомы (pdb 4CR2: I) [21]. Снижение избыточного воспалительного ответа является неотъемлемым компонентом регенерации кожи.

Пептид «GQPGAPGVK», обнаруженный в составе Лаеннека, схож с пептидом «GQPGEPGV», входящим в состав белка-активатора плазминогена (PDB файл 1BQY: A, аминокислоты 202–209) [22].

Пептид «TSLVQHQK» является фрагментом белка типа «цинковый палец». Присутствие данного пептида отчасти объясняет высокую стабильность содержания цинка в Ланнеке. В микроэлементном составе препарата Лаеннек обращают на себя внимание повышенное содержание цинка, брома и относительно высокое содержание кобальта и селена природного происхождения [7]. В частности, Лаеннек содержит *высокое количество эссенциального микроэлемента цинка: 788±114 мкг/кг.*

При этом содержание цинка в исследованных образцах было довольно стабильно: различия образцов по содержанию цинка не превышали 15%. Наиболее вероятным объяснением высокого содержания цинка, сравнительно низкой вариабельности его содержания является специфическое связывание цинка определёнными пептидами. Такими пептидами могут являться, например, пептид коллагена Iα2 «GEAGAAGPAGPAGPR» — известно, что фрагмент этого пептида, «AGPAGPR» является пептидом-хелатором цинка [23]. Кроме того, анализ пространственной структура белка типа «цинковый палец» показал, что пептид «TSLVQHQK» непосредственно участвует в связывании иона цинка в контексте структуре белка (рис. 11) и может, таким образом, являться *цинк*-связывающим пептидом.

Заключение

Разнонаправленные регенераторные способности препарата Лаеннек обусловлены сложнейшим пептидным составом препарата. Даже при наличии хорошей обеспеченности тканей, нуждающихся в регенерации, макро- и микронутриентами, репарация тканей может быть существенно оптимизирована

целевым применением особых пептидных факторов, стимулирующих регенерацию тканей.

Масс-спектрометрическое исследование позволило установить в составе Лаеннека наличие таких пептидных факторов как

1) фрагмент альбумина DAHKSEVAHRFK (который в комплексе с ионами Cu^{2+} является аналогом антиоксидантного фермента СОД);

2) пептидный фрагмент коллагена Iα2 GEAGAAGPAGPAGPR (активирует рецепторы дискоидиновых доменов, которые обеспечивают реконструкцию соединительной ткани кожи и суставов, а также поддерживает противоопухолевый иммунитет);

3) пептид «ITGNGRTT» в составе Лаеннека, который регулирует процессы воспаления, а также связывает убиквитин лигазы, необходимые для контролируемой деградации внутриклеточных белков на протеасоме;

4) пептид «VADMHAPSIIFIDEIDAIGGK», который снижает избыточный воспалительный ответ и является неотъемлемым компонентом регенерации кожи;

5) пептид «GQPGAPGVK», схож с пептидом «GQPGEPGV», входящим в состав белка-активатора плазминогена;

6) пептидный фрагмент TSLVQHQK белка типа «цинковый палец», который, по всей видимости, обеспечивает высокую стабильность содержания цинка в Ланнеке.

Сравнение результатов масс-спектрометрического анализа пептидной фракции Лаеннека с данными иммуноферментного анализа показало, что в составе Лаеннека присутствуют пептидные фрагменты таких ростовых факторов, как инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1), белковый гормон лептин, трансформирующий фактор роста β1, фактор роста гепатоцитов (ФРГ) и др.

Для более точной информации в исследовании проведён тройной контроль состава препарата — анализ пептидной фракции препарата Лаеннек тремя методами: (1) высокоточной масс-спектрометрией на Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия); (2) иммуноферментный анализ на содержание эпитопов белков с использованием моноклональных антител к IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12) (ИФА, ELISA) и (3) секвенирование выделенных пептидов. Установлена высокая степень стандартизации препарата по пептидам. С использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов Iα2, Vα2, XIXα1, «цинковых пальцев», а также активных центров IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12 и др. Наличие этих пептидов и фрагментов факторов роста в составе пептидной фракции Лаеннека позволило сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата.

Наиболее ярко клинический эффект действия пептидов в составе лёгкой фракции Лаеннека до 3 000 Да наблюдается именно в повреждённых тканях: заживлении резанных ран кожи, термических и химических ожогов, при воспалительных повреждениях соединительной ткани суставов, при повреждениях печени (стеатогепатоз, хронический гепатит, гемосидероз, т.е. избыточное отложение гемосидерина в тканях организма)и др. В таких случаях, пептиды Лаеннека способствуют регенерации ткани не только за счёт протективного воздействия на выживание клеток в очаге повреждения, но и за счёт восстановления сложной иерархии взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом, а также обеспечения антиоксидантной защиты.

Литература

1. *Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., Каримова И.М., Гилельс А.В., Кустова Е.В.* Мировой опыт применение препаратов из плаценты человека, Пластическая хирургия и косметология. 2011; 2: 63–67.

2. *Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R. et al.* The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003". Nucleic Acids Research. 2003; 31 (1): 365–370.

3. *Beyssac I., Martini M.C., Cotte J.* Oestrogen identification and dosage in filatov human placenta extracts by high performance liquid chromatography. Int J Cosmet Sci. 1986; 8 (4): 175–188.

4. *Julliard J.H., Shibasaki T., Ling N., Guillemin R.* High-molecular-weight immunoreactive beta-endorphin in extracts of human placenta is a fragment of immunoglobulin G. Science. 1980; 208 (4440): 183–185.

5. *Sastry B.V., Tayeb O.S., Barnwell S.L.* Peptides from human placenta: methionine enkephalin and substance P. Placenta Suppl. 1981; 3: 327–337.

6. *Sakura H., Aoki S., Ozawa T.* The neuropeptide, head activator, in human placenta and serum from pregnant women. Acta Endocrinol (Copenh). 1991; 125 (5): 454–458.

7. *Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Назаренко О.А., Смарыгин А.В.* Анализ микроэлементного состава препарата Лаеннек, как основа его фармакологического действия. Эстетическая медицина и пластическая хирургия. 2011; 1: 43–47.

8. *Громова О.А., Торшин И.Ю., Гилельс А.В., Диброва Е.А., Гришина Т.Р., Волков А.Ю., Лиманова О.А., Томилова И.К., Демидов В.И.* Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. Врач. 2014; 4: 67–72.

9. *Кейтс М.* Техника липидологии, М.: Мир. 1975; 322.

10. *Дарбре А.* Практическая химия белка, М.: Мир. 1989; 621.

11. *Bar-Or D., Rael L.T., Lau E.P., Rao N.K., Thomas G.W., Winkler J.V., Yukl R.L., Kingston R.G., Curtis C.G.* An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 284 (3): 856–862.

12. *Konitsiotis A.D., Raynal N., Bihan D., Hohenester E., Farndale R.W., Leitinger B.* Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. J Biol Chem. 2008; 283 (11): 6861–8 doi.

13. *Carafoli F., Bihan D., Stathopoulos S., Konitsiotis A.D., Kvansakul M., Farndale R.W., Leitinger B., Hohenester E.* Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2. Structure. 2009; 17 (12): 1573–81 doi.

14. *Vogel W.F, Abdulhussein R, Ford C.E.* Sensingextracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. Cell Signal. 2006; 18 (8): 1108–16 Epub 2006 F.

15. *Gross O., Beirowski B., Harvey S.J., McFadden C., Chen D., Tam S., Thorner P.S., Smyth N., Addicks K., Bloch W., Ninomiya Y., Sado Y., Weber M., Vogel W.F.* DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM

thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. Kidney Int. 2004; 66 (1): 102–111.

16. *Hou G., Vogel W., Bendeck M.P.* The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. J Clin Invest. 2001; 107 (6): 727–735.

17. *Kano K., Marin de Evsikova C., Young J., Wnek C., Maddatu T.P., Nishina P.M., Naggert J.K.* A novel dwarfism with gonadal dysfunction due to loss-of-function allele of the collagen receptor gene, Ddr2, in the mouse. Mol Endocrinol. 2008; 22 (8): 1866–80.

18. *Bargal R., Cormier-Daire V., Ben-Neriah Z., Le Merrer M., Sosna J., Melki J., Zangen D.H., Smithson S.F., Borochowitz Z., Belostotsky R., Raas-Rothschild A.* Mutations in DDR2 gene cause SMED with short limbs and abnormal calcifications. Am J Hum Genet. 2009; 84 (1): 80–4 doi.

19. *Asamitsu K., Tetsuka T., Kanazawa S., Okamoto T.* RING finger protein AO7 supports NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of the p65 subunit. J Biol Chem. 2003; 278 (29): 26879–87 Epub 2003.

20. *Rolland T., Tasan M., Charloteaux B., Pevzner S.J., Zhong Q., Sahni N., Yi S., Lemmens I., Fontanillo C., Mosca R., Kamburov A. et al.* A proteome-scale map of the human interactome network. Cell. 2014; 159 (5): 1212–26 doi.

21. *Unverdorben P., Beck F., Sledz P., Schweitzer A., Pfeifer G., Plitzko J.M., Baumeister W., Forster F.* Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111 (15): 5544–9 doi.

22. *Parry M.A., Jacob U., Huber R., Wisner A., Bon C., Bode W.* The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. Structure. 1998; 6 (9): 1195–1206.

23. Патент КНР № CN104372054A: «The cod skin collagen source chelating peptide and its preparation method».