

Якісний аналіз пептидного та білкового складу цитозольних фракцій фетальних тканин людини

Д.В. Черкашина*, О.Ю. Семенченко, О.Ю. Петренко

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України
вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна*

Резюме. Проведено препаративний розподіл тотального цитозоля фетальних тканин людини (мезенхімально-мезодермального походження) шляхом хроматографії в полівініловому гелі та горизонтально-го ультратонкого електрофорезу на поліакриламідному гелі. Під час хроматографії отримано 6 фракцій (одну білкову і п'ять пептидних), при електрофоретичному розподілі білків — 13-15 білкових фракцій з молекулярною масою від 9 до 110 кДа.

Ключові слова: фетальні тканини, гель-хроматографія, горизонтальний ультратонкий гель-електрофорез.

Вступ. Сьогодні не викликає сумнівів, що застосування клітинної терапії, зокрема трансплантації стовбурових і прогеніторних клітин, є важливим компонентом у комплексному лікуванні низки тяжких захворювань. При цьому вже зрозуміло, що позитивні ефекти трансплантації реалізуються завдяки присутності широкого спектра біологічно активних речовин, які здатні продукувати ці клітини [1]. Останнім часом особливу увагу вчених привертає потужний терапевтичний потенціал мезенхімальних стовбурових і прогеніторних клітин [2], але на сьогодні не існує систематизованих відомостей щодо комплексу стадіоспецифічних речовин, зокрема білкової та пептидної природи, що ними продукуються.

Раніше нами показано, що введення тваринам перед індукцією гострого токсичного гепатиту або ізоляцією печінки для подальшого гіпотермічного зберігання тотального цитозоля фетальних тканин (ЦФТ) мезенхімально-мезодермального походження сприяє зменшенню ступеня пошкодження печінки та нор-

малізації її прооксидантно-антиоксидантного стану [3, 4]. Але труднощі в з'ясуванні механізмів реалізації ефектів біологічно активних речовин, що входять до складу клітинних і безклітинних препаратів, обумовлені значною кількістю компонентів, що потенційно спроможні брати участь у регуляції метаболічних процесів. При цьому існує можливість їх негативної взаємодії, нейтралізації або антагонізму. Метод отримання ЦФТ дав змогу вилучити наявність гідрофобних молекул і лімітувати спектр його компонентів гідрофільними сполуками, зокрема пептидної та білкової природи, з невеликою молекулярною масою. Найбільш вірогідними кандидатами є ростові фактори й цитокіни, зокрема альфа-фетопротейн, фактори росту гепатоцитів, фібробластів, епідермісу, інсуліноподібні фактори росту та ін. [2, 5, 6]. Крім того, ЦФТ може містити біологічно активні пептиди, які утворюють власну пептидергічну регуляторну систему, зокрема цитомединову й тетинову [7-9].

Таким чином, виникла необхідність оцінити якісний склад ЦФТ. Для цього треба визначити адекватні методи розподілу, які б дали змогу максимально ефективно розділити й відокремити компоненти ЦФТ.

* Corresponding author.

Tel.: +38057-3734135; fax: +38057-3733084

E-mail address: danyusha@ukr.net

Матеріали та методи. Одержання цитозоля фетальних тканин. Як основне джерело цитозольних фракцій використовували тотальний ЦФТ людини, здебільшого мезенхімально-мезодермального походження.

Плоди людини 8-10 тижнів гестації одержано після письмового дозволу донора шляхом запланованого переривання вагітності. Після отримання плоди п'ятиразово відмивали від крові, а також вилучали печінку та тканини мозку. Тканини плоду мезенхімально-меходермального походження піддавали м'якій гомогенізації в гомогенізаторі Поттера з розчином Хенкса у співвідношенні 1:1,5 (w/v). Одержаний гомогенат центрифугували у два етапи: 1 — при 8000 g, 40 хв, T=4 °C (центрифуга «Jouan BR4i», Франція); 2 — отриманий супернатант піддавали високошвидкісному ультрацентрифугуванню при 105000 g, 90 хв, T=4 °C (центрифуга «MSE Superspeed 65», Велика Британія) для виділення постмікросомальної фракції, яка містить виключно водорозчинні компоненти. Стандартизацію проводили за вмістом білка ($1 \pm 0,2$ мг/мл). Усі маніпуляції щодо отримання ЦФТ проводили у стерильних умовах на холоді. ЦФТ зберігали за температури -80 °C.

Препаративний розподіл цитозоля фетальних тканин. Хроматографічний розподіл проводили за допомогою методу препаративної гель-фільтрації [10]. Як елюент використовували tris-HCl-буфер (25 mM, pH 7,5), який містив 1 M сечовини та 100 mM NaCl. Гель-хроматографію проводили із застосуванням полівінілового гелю «TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine» (Японія) для розділення пептидів і «Toyopearl HW-60» — для фракціонування білків. Довжина колонки дорівнювала 500 мм, діаметр — 25 мм. Середня швидкість потоку складала приблизно 1,7 мл/хв. Стандартами слугували декстран блакитний (2000 кДа), сироватковий альбумін бика (67 кДа), овальбумін (45 кДа), карбангідраза (23,7 кДа), цитохром с (12,3 кДа). Одержані фракції оцінювались спектрофотометрично, при довжині хвилі 254 і 280 нм.

Для електрофоретичного розподілу білків обрали метод горизонтального електрофорезу у поліакриламідному гелі з градієнтом пор 4-22,5 %, використовуючи натрію додецилсуль-

фат (НДС) як основний детергент [11]. Електрофорез проводили із застосуванням системи «LKB 2117 Multiphor System». Для електрофорезу використано такі маточні розчини:

а) для приготування гелю: акриламід/біс (28,8 г/1,2 г/100 мл дистильованої води); буфер для гелю (1,5 M tris-HCl, pH 8,8, що містить 0,4 г НДС і 10 мг натрію азиду); гліцерин, 60 %; амонію персульфат, 40 %;

б) буфер для зразків, що містить 0,15 M tris-HCl та 1 % НДС;

в) електродний буфер (30,28 г tris-HCl, 144 г гліцерину, 10 г НДС, 10 мг натрію азиду в 1000 мл дистильованої води);

г) розчини для забарвлення: фіксуючий розчин — трихлороцтова кислота, 20 %; забарвлюючий розчин: 0,5 г Кумасі блакитного у 250 мл 90 % метанолу + 50 мл оцтової кислоти в 200 мл дистильованої води; розчин для знебарвлення: 700 мл метанолу, 200 мл оцтової кислоти + 1100 мл дистильованої води.

Зразки використовували без розведення або після розчинення до максимального вмісту білка 300 мг/л. НДС додавали в кінцевій концентрації 1 %. Перед застосуванням зразки інкубували 3 хв у киплячій воді. Гелі з лінійним градієнтом пор готували товщиною 500 мкм. Для простоти використання гелі полімеризували на пластиковій плівці. Після проведення електрофорезу отримані зразки забарвлювали Кумасі блакитним. Як стандарти використовували альдолазу (150 кДа), сироватковий альбумін бика (67 кДа), хімотрипсиноген А (25 кДа), цитохром с (12,3 кДа).

Результати й обговорення. Загальноприйнятим підходом до розподілу пептидів вважається рідинна гель-хроматографія. Було відпрацьовано метод фільтрації ЦФТ на полівініловому гелі із застосуванням буфера, який містив натрію хлорид і сечовину. Внесення солі натрію до рідкої фази повинно було привести до кращого розділення окремих компонентів, а також звести до мінімуму іонні взаємодії між нерухомою фазою та розчиненими речовинами. Сечовину використано для покращення розчинності важкорозчинних протеїнів, а також попередження неіонних взаємодій та утворення білкових агрегатів.

У результаті отримано стандартний спектр хроматографічних піків для пептидів ЦФТ,

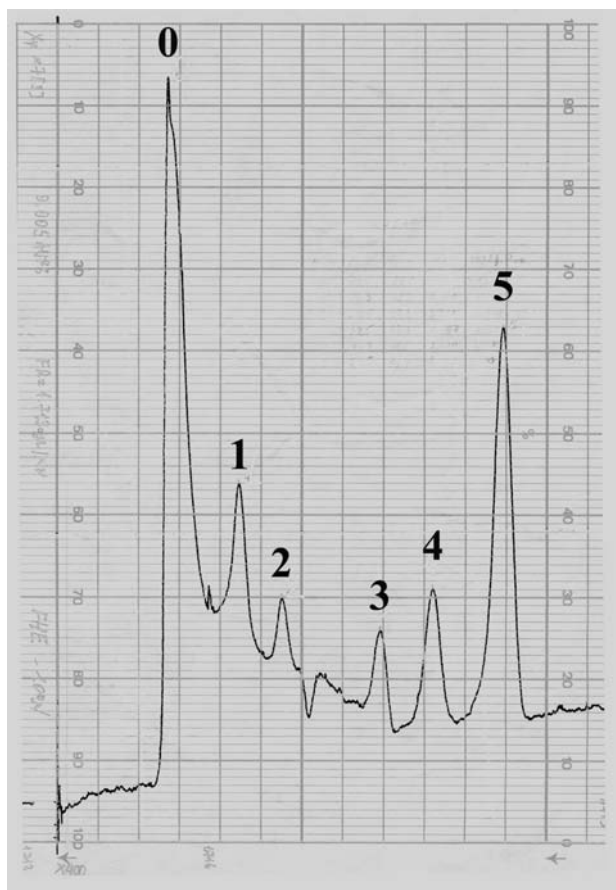


Рис. 1. Типова хроматограма ЦФТ (гель «TSK-Gel Toyopearl HW-40», довжина хвилі 254 нм).

який відтворювався під час повторних експериментів (рис. 1). Як видно із рисунка, типова хроматограма складалася з 6 виразних піків, нульовий пік (0) не враховувався в подальших розрахунках, оскільки містив компоненти з молекулярною масою більше 10 000 Да. Пептидних піків було 5 (1, 2, 3, 4, 5), які, згідно зі стандартами, відповідали молекулярним масам 2990, 2410, 1570, 1150, 900 Да.

Також провели хроматографію із застосуванням гелю «TSK-Gel Toyopearl HW-60» (спектрофотометрування при 280 нм). У ре-

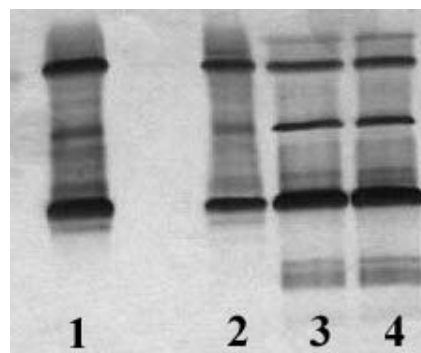


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл білків, що входять до складу ЦФТ (1), білкової фракції, одержаної при хроматографії (2), і стандартних протеїнів (3, 4).

зультаті одержали тільки одну виразну білкову фракцію з молекулярною масою близько 34 000 Да.

З огляду на відсутність ефективності гель-хроматографії щодо розподілу компонентів ЦФТ із молекулярною масою більш ніж 10 000 Да провели горизонтальний ультратонкий електрофорез як тотального цитозоля, так і одержаної білкової фракції. Значною перевагою обраного методу в порівнянні з багатьма іншими є відсутність необхідності концентрування дослідних зразків [11]. Після розподілу отримали картину, яка представлена на рис. 2.

У табл. 1 наведено результати електрофорезу стандартних білків, проведеного для порівняння з дослідними зразками. На підставі одержаних даних було збудовано калібрувальний графік, який використовували для оцінки дослідних зразків.

На підставі збудованого графіку було визначено молекулярну масу протеїнів, що входять до складу ЦФТ (рис. 2, трек 1) та його білкової фракції, одержаної під час хроматографії (рис. 2, трек 2). Показано, що при роз-

Таблиця 1

Результати електрофорезу стандартних білків

Треки 3, 4					
№ смуги	Довжина пробігу (l), мм	(l/L)	Білок	lg молекулярної маси	Молекулярна маса, кДа
1	63	0,79	Цитохром с	4,090	12,3
2	55	0,69	Хімотрипсिनоген А	4,400	25,0
3	45	0,56	Сироватковий альбумін бика	4,826	67,0
4	36	0,45	Альдолаза	5,20	150,0

Примітка: R_f — співвідношення пробігу кожного білка (l) до загальної довжини треку (L, 80 мм).

Результати електрофорезу білкових фракцій у складі ЦФТ

Трек 1				
№ смуги	Довжина шляху (l), мм	R _f (l/L)	Lg молекулярної маси	Молекулярна маса, кДа
1	67	0,84	3,94	8,7
2	66	0,83	3,975	9,4
3	64,5	0,81	4,04	11,0
4	61	0,76	4,19	15,5
5	59	0,74	4,25	17,8
6	57	0,71	4,355	22,6
7	55	0,69	4,41	25,7
8	53	0,66	4,505	32,0
9	50	0,63	4,6	40,0
10	48	0,6	4,695	50,0
11	47	0,59	4,725	53,0
12	45	0,56	4,825	67,0
13	42	0,53	4,92	83,0
Трек 2				
1	66	0,83	3,975	9,4
2	65	0,81	4,035	10,8
3	63,5	0,79	4,09	12,3
4	61	0,76	4,19	15,5
5	59	0,74	4,25	17,8
6	57	0,71	4,355	22,6
7	55	0,69	4,41	25,7
8	53	0,66	4,505	32,0
9	52	0,65	4,535	34,0
10	49,5	0,62	4,635	43,0
11	48	0,6	4,695	50,0
12	47	0,59	4,725	53,0
13	45	0,56	4,825	67,0
14	42	0,53	4,92	83,0
15	39,5	0,49	5,04	110,0

Примітки: трек 1 — розподіл тотального ЦФТ; трек 2 — розподіл білкової фракції, одержаної після хроматографії.

поділі ЦФТ виявляється 13 фракцій, із яких сьома і дванадцята відповідають стандартним (хімотрипсिनогену А та альбуміну), а при розділенні білкової фракції — 15, з яких стандартним відповідають третя, сьома і тринадцята (цитохром с) (табл. 2).

Таким чином, проведені за допомогою обраних методів препаративного розподілу дослідження дали змогу частково оцінити якісний

склад ЦФТ щодо присутності в ньому широкого спектра речовин білкової та пептидної природи. Для ідентифікації одержаних речовин і встановлення їх потенційної біологічної активності на експериментальних моделях *in vivo* необхідне подальше вивчення із залученням специфічних високоефективних методів.

Надійшла в редакцію 30.10.2007

Qualitative analysis of peptid and protein composition of human fetal tissue cytosolic fractions

D.V. Cherkashina, O.Yu. Semchenko, O.Yu. Petrenko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine
23 Pereyaslavska Str., Kharkiv, 61015, Ukraine

Summary. Actual problem of present-day stem and progenitor cell biology and regenerative medicine is a search of biologically active substances in tissues enriched by stem/progenitor cells. Area of our interest is the fetal tissues mainly of mesenchymal and mesodermal origin that demonstrated a wide spectrum of biological activity. In this study low molecular weight peptides and proteins of human fetal tissue cytosol (FTC) obtained by two-steps high-speed ultracentrifugation of tissue homogenate was analyzed by gel-chromatography and gel-electrophoresis.

Gel-chromatography was performed using polyvinyl gels TSK-Gel Toyopearl HW-40, HW-60 Fine (Toyo Soda,

Japan) and tris-HCl buffer (25 mM, pH 7.5) contained 1M urea and 100 mM NaCl as an eluent. Obtained fractions were estimated spectrophotometrically, wave-length 254 and 280 nm. Horizontal ultrathin gel-electrophoresis was performed using polyacrylamide gel with pore gradient 4-22.5 %. Sodium dodecyl sulfate was used as a main detergent.

During gel-chromatography 6 pronounced peaks were obtained. One of them was a protein fraction, the rest 5 — peptide ones with molecular weights 2990, 2410, 1570, 1150, 900 Da approximately. Protein fraction was about 34000 Da.

After gel-electrophoresis of total FTC 13 protein fractions were discovered. Two of them fit with standards — chymotrypsinogen A and albumin. For protein fraction obtained during chromatographic separation 15 lines were shown, 3 of them fit with standards, additional one was cytochrome c. Protein molecular weight range was between 9000 and 110000 Da.

Keywords: fetal tissues, gel-chromatography, horizontal ultrathin gel-electrophoresis.

Перелік літератури

1. Репин В.С. Медицинская клеточная биология / под ред. В.С. Репина, Г.Т. Сухих. — М.: РАМН: БЭБиМ, 1998. — 200 с.
2. Tugel F., Hu Z., Weiss K., Isaac J., Lange C., Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 2005. — Vol. 289. — F31-F42.
3. Cherkashina D.V., Semchenko O.A., Grischuk V.P., Fuller B.J., Petrenko A.Y. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model // *Cell Preservation Technology.* — 2005. — Vol. 3, No. 3. — P. 203-212.
4. Черкашина Д.В., Петренко А.Ю. Гепатопротекторное действие цитозоля эмбриональных тканей и его термостабильной фракции при тетрахлорметан-индуцированном гепатите у крыс // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* — 2006. — № 2. — С. 117-119.
5. Абелев Г.И. α -Фетопротеин (биология) // *Вест. РАМН.* — 2001. — № 9. — С. 77-83.
6. Isfort R.J., Cody D.B., Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A. Growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis in Syrian hamster embryo cells during in vitro transformation // *Carcinogenesis.* — 1994. — Vol. 15, No. 6. — P. 1203-1209.
7. Karelin A.A., Blishchenko E.Yu., Ivanov V.T. A novel system of peptidergic regulation // *FEBS Letters.* — 1998. — Vol. 428. — P. 7-12.
8. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цито-медины и их роль в регуляции физиологических функций // *Усп. совр. биол.* — 1995. — Т. 115, № 3. — С. 353-367.
9. Беседнова Н.Н. Регуляция иммунных процессов пептидами природного происхождения // *Антибиотики и химиотерапия.* — 1999. — № 1. — С. 31-35.
10. Препаративная жидкостная хроматография: Пер. с англ. / Бидлингмейер Б., Фрайд Б., Хегнауер Г. и др. / под ред. Бидлингмейера Б. — М.: Мир, 1990. — 360 с.
11. Gorg A., Postel W., Weser J., Schiwara H.W., Boesken W.H. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for analysis of urinary proteins // *Science Tools.* — 1985. — Vol. 32, № 1. — P. 5-9.