



УДК 543.544.5.068.7

Жидкостная хроматография тромбоцитарных белков

Горшков Н.И., Малахова И.И., Красиков В.Д.

*Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН,
С.-Петербург*

Журлов О.С., Иванов Ю.Б.

*Государственное учреждение Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,
Оренбург*

Поступила в редакцию 25.12.2009 г.

Аннотация

Тромбоцитарные низкомолекулярные белки (ТНБ)– тромбодензины – относятся к классу антимикробных низкомолекулярных белков, образующихся в результате отклика иммунной системы большинства организмов на определенные физиологические условия. Настоящая публикация посвящена разработке новых методов хроматографического выделения, очистки и анализа ТНБ, полученных из эритроцитарной массы крови человека. Для этих целей предложена ступенчатая хроматографическая процедура выделения и анализа белков, включающая в себя ресуспендирование тромбоцитарной массы в ледяной уксусной кислоте при температуре 258 К с последующим центрифугированием и дальнейшей очисткой методами твердофазной экстракции (ТФЭ) и обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработаны методы анализа тромбодензинов методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Ключевые слова: тромбодензины, жидкостная хроматография, твердофазная экстракция, низкомолекулярные катионные (анионные) белки

Thrombocidal low molecular weight proteins (TLMWP) – trombocidins- belongs to class of micromicidal low molecular weight proteins, produced as a result of response of immune system of majority of live organisms. Current publication is devoted to development of novel chromatographic procedures for separation, purification and analysis of TLMWP, isolated from For this purpose complex stepwise chromatographical procedure for isolation and analysis of proteins was proposed, which includes re-suspending of human packed red cells in acetic acid at 258 K with further centrifugation and purification using solid phase extraction (SPE) procedure and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Analytical procedures (high performance thin layer chromatography (HPTLC) and HPLC) for analysis of trombocidins were developed.

Keywords: trombocidins, liquid chromatography, solid phase extraction, low molecular weight cationic (anionic) proteins

Введение

В течение последних 10-15 лет значительное количество работ было посвящено микробицидальным белкам, образующимся в результате отклика

иммунной системы человека и животных [1-3]. Вызвано это повышением количества новых инфекционных заболеваний, связанных с микроорганизмами, которые проявляют устойчивость ко многим антимикробным препаратам [4,5]. Все это диктует необходимость расширения арсенала лекарственных средств, обладающих микробцидным действием [6].

В качестве бактерицидных препаратов в настоящее время в основном применяются синтетические и полусинтетические антибиотики (фторхинолоны, ами-ногликозиды и др.) к которым у большинства микроорганизмов быстро формируется устойчивость [7]. Кроме того, данные препараты обладают токсическим действием на органы и системы организма человека и животных, способствуют развитию дисбактериозов.

Ранее были использованы антимикробные пептиды, выделенные из нейтрофилов человека, кролика и мыши для лечения и профилактики инфекционных заболеваний [8]. Известно, что кроме нейтрофилов в противоинойфекционной защите макроорганизма определенное значение имеют тромбоциты, поскольку: а) тромбоциты адгезируются на патогенных микроорганизмах; б) обладают противогрибковым, бактерицидным и антипротозойным действием *in vitro*; в) при взаимодействии с микроорганизмами *in vitro* тромбоциты высвобождают низкомолекулярные бактерицидные белки [9].

В последнее время рядом авторов было показано, что в крови человека и животных образуется ряд антибактериальных тромбоцитарных катионных белков (ТКБ), появление которых стимулируется физиологической активностью тромбинов против бактериальных и фунгицидных патогенов, которые внедряются в кровоток [10, 11].

В последствии было показано, что кроме ТКБ образуется и ряд анионных белков (ТАБ), обладающих различным вкладом в антибактериальную защиту организма при слабых и слабощелочных рН, табл.1.[12]

Таблица 1. Характеристики тромбодифензинов человека [12]

№ п/п	Пептид	ММ, Да	Суммарный заряд		Содержание в тромбоцитарной массе, nmol/10 ¹⁰
			pH=7,5	pH=5,5	
1	FP-A	-	-3,00	-2,86	<1,0
2	FP-B	1.551,6 ^a	-3,00	-2,88	<1,0
3	Tβ-4	4.962,2(4.963,5)	-3,00	-2,52	2,0
4	PBP	10.260,6 (10.261,9)	+3,55	+5,96	2,0
5	СТАР-3	9.287,0 (9.287,8)	+0,53	+2,95	23
6	RANTES	7.850,5 (7.847,1)	+4,52	+5,99	0,2
7	PF-4	7.765,0 (7.766,2)	+2,57	+4,84	15

а) Молекулярная масса (ММ) оценена при помощи масс-спектропии;

б) Молекулярная масса (ММ) вычислена из данных аминокислотного секвенса соответствующих пептидов;

Как видно из таблицы, первые три белка являются анионными тромбоцитарными белками, к ним относятся – фибринопептиды А и В (FP- А,Б) и тимозин (Тβ-4). Остальные являются тромбоцитарными катионными белками: тромбоцитарный основной белок (PBP); соединительно-тканевый антивирусный пептид (СТАР-3); катионный пептид (Rantes); тромбоцитарный фактор 4 (PF-4)

В противоположность ТАБ, проявляющим в большинстве случаев незначительные антимикробные свойства при повышенном рН=7,2 (хотя их биохимия и биология сходна с другими тромбодифенсинами), ТКБ показывают сильную *in vitro* антибактериальную активность, достигающую максимума при рН=5,5 [4]. Катионная природа большинства этих белков является основополагающим фактором, определяющим вектор доставки ТКБ и разрушения мембран бактерицидных клеток (патогенов).

Аминокислотный состав в комбинации с их молекулярными массами (ММ) предполагает, что большинство из этих белков состоит из различных молекул, не происходящих из единого общего предшественника. Основываясь на их первичной структуре можно предположить, что антибактериальные пептиды классифицируются на четыре группы. Большинство из обнаруженных до сих пор белков существуют в виде β -спиральных структур, содержащие последовательности из 4-6 фрагментов цистеина, связанных дисульфидными мостками. Другие классы состоят из амфифильных белков, пролин-насыщенных белков и связанных циклических белков [2, 6]. Таким образом, весьма сложная природа самих ТНБ, отягощенная "тяжелым матриксом" высокомолекулярных белков, содержащихся в тромбоцитах, требует сложной процедуры, связанной с выделением и очисткой тромбодифенсинов.

Обычными приемами получения антимикробных пептидов из тромбоцитов являются: а) ресуспендирование тромбоцитарной массы ледяной (70%) уксусной кислотой; б) инкубация при температуре 258°К в течение 4 часов; в) разморозка суспензии; г) центрифугирование при комнатной температуре; д) фильтрация супернатантов через диализные мембраны различной пористости. В дальнейшем проводится очистка ТКБ разными хроматографическими методами (гельфильтрация, ионная и обратнофазная хроматография).

Несмотря на то, что некоторые методы выделения белков описаны в литературе, они характеризуются значительной трудоемкостью и достаточно низким выходом целевых продуктов [10-12].

В настоящей работе поставлена задача упрощения методологии выделения, очистки и анализа катионных тромбоцитарных белков на основе современных приемов ВЭЖХ и твердофазной экстракции.

Эксперимент

Химические реактивы и стандартные вещества. В работе использовали растворители и химические реактивы марок ХЧ и ОСЧ (Нева-Реактив, Криохром, Реахим, Россия).

Выделение тромбоцитарной массы. Использовали стандартную процедуру центрифужного разделения крови здоровых доноров (человеческой или лошадиной) с цитратным коагулянтом на фракции, содержащие плазму крови и эритроцитарную смесь, содержащую также (кроме эритроцитов) лейкоциты и тромбоциты. Далее 50мл такой массы ресуспендировали в 300мл ледяной (70%) уксусной кислоте и инкубировали при температуре 258°К в течение 24 часов. После инкубации суспензию лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов подвергали центрифугированию при 1000g в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученные супернатанты, (содержание лейкоцитов <1%), содержащие суспензию тромбоцитов, хранили при температуре 258°К.

Очистка тромбодифензинов методом ТФЭ. Предварительная очистка тромбоцитарной массы супернатанта методом твердофазной экстракции проводилась при помощи микроколоночных картриджей фирмы Биохиммак и НТЦ «Ленхром» (Россия) с использованием в качестве сорбентов модифицированные DEAE и C₁₆ кремнеземы.

Тонкослойная хроматография. Планарную (тонкослойную) хроматографию проводили методом восходящего потока при помощи "Базового набора для ТСХ" фирмы "Ленхром" (Россия). Количественную ТСХ и компьютерную визуализацию хроматограмм осуществляли с помощью видеоденситометра "ДенСкан" (НТЦ "Ленхром", Россия) в видимой и люминесцентной (при длине волны 365нм) областях спектра. В качестве тонкослойных пластинок были использованы обратнофазные (ОФ) пластинки RP-18 F254 фирмы "Merck" (Германия). Для детектирования хроматограмм применяли метод проявления белковых составляющих при помощи 0.3 % раствора нингидрина в ацетоне с добавкой уксусной кислоты.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Эксперименты проводили на хроматографическом комплексе "Knauer" (Германия) семейства "Smartline" с рефрактометрическим и спектрофотометрическим детекторами на основе диодной матрицы. В работе были использованы обратнофазные колонки фирмы Tessek (Чехия) 150 x 3 мм, упакованные сорбентом Separon C18, фр. 5 мкм.

Результаты и обсуждение

Необходимость упрощения методик получения антисептических белков из тромбоцитарной массы человека и животных вытекает из сложности процедуры выделения и их предварительной очистки. Обычно тромбоцитарные пептиды получают ресуспендированием тромбоцитарной массы ледяной (70%) уксусной кислотой с последующей инкубацией при температуре 258° С в течение 24 часов с дальнейшим размораживанием суспензии и центрифугированием при комнатной температуре. Как правило, полученные супернатанты последовательно фильтруют через диализные мембраны Spektra Por: Biotech Regerated Cellulose Dialysis Membrana MWCO 500 (задерживающие продукты с молекулярной массой свыше 15000 Да) и Regerated CelluloseEster WCO 500 (пропускающие продукты и соли с молекулярной массой менее 500 Да). Концентрат ультрафильтра наносят на колонку с сорбентом Sephadex-G50 и проводят элюцию с линейным градиентом ацетонитрила (от 0% до 60%) и добавлением 0,1% раствора фосфорной кислоты. Полученные методом гелепроникающей хроматографии (ГПХ) фракции объединяют и определяют общее содержание белка [3, 10-12].

Поставленная в работе задача заключалась в исключении процедуры диализной очистки (вследствие трудоемкости данного метода) и в попытке избежать использования метода ГПХ (в режиме низкого давления на сорбентах типа Sephadex). Последний метод также имеет ограничения в режиме эксклюзионной хроматографии белков, хотя известно, что ГПХ достаточно эффективна для отделения «тяжелого» белкового матрикса. Однако, (по причине продолжительной процедуры хроматографирования супернатанта) применение этого метода приводит к существенному уменьшению выхода целевых продуктов. Известно, что удается довольно хорошо разделить тромбодифензины после ГПХ очистки при использовании обратнофазной хроматографии с градиентом ацетонитрила при применении колонок с сорбентом Vydac C₄ (США) [12]. Тем не менее, наша попытка

прямого анализа и разделения этих низкомолекулярных белков, минуя предварительные стадии диализа и эксклюзионной хроматографии, показали, что это приводит к резкому увеличению давления в гидравлической системе хроматографа и быстрой потере эффективности хроматографических колонок. Данный эффект хорошо объясняется при рассмотрении данных, полученных с использованием ТСХ на обратнофазном кремнеземном сорбенте Merck RP-18 (Рис. 1). Видно, что на старте ТСХ-пластинки ($R_f = 0$) находится значительное количество примесей, содержащихся в тромбоцитарной массе, имеющих очень большой индекс удерживания в таких системах [11]. Таким образом, традиционно используемая в хроматографии белков обратнофазная (ОФ) ВЭЖХ на гидрофобных сорбентах (С18) не может быть рекомендована для препаративного выделения ТНБ, так как в данном случае приводит к снижению эффективности колонки ввиду необратимой сорбции высокомолекулярных фракций на поверхности сорбента.

В связи с этими ограничениями нами был предложен метод предочистки супернатанта методом твердофазной экстракции (ТФЭ) в режиме градиентного и фронтального элюирования. При выборе картриджей для ТФЭ учитывалась сложная анионо-катионная структура ТНБ (табл.1). В качестве сорбентов для ТФЭ белков были выбраны обратнофазные (С16) и слабо катионные (DEAE) сорбенты на основе кремнезема. В качестве элюирующей смеси была выбрана система растворителей ацетонитрил-0.1% водный раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ), традиционно используемая для анализа и разделения белков и пептидов. В режиме ступенчатого градиентного элюирования использовались следующие системы: вода (смыть ацетат-иона); 0.1 % водный раствор ТФУ- ацетонитрил (75:25); 0.1 % водный раствор ТФУ - ацетонитрил (50:50); 0.1 % водный раствор ТФУ - ацетонитрил (75:25); ацетонитрил.

При таком режиме градиентного элюирования было показано, что максимальная эффективность извлечения смеси ТНБ достигается при использовании системы 0.1 % водный раствор ТФУ - ацетонитрил (75:25), традиционно используемой при анализе белков и пептидов.

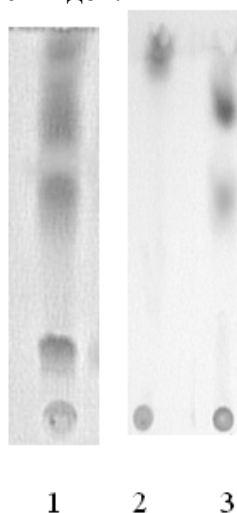


Рис. 1. Хроматограмма разделения ТНБ на пластинах RP-18F254(Merck). 1 – исходные ТНБ; 2 - после ТФЭ на патроне С16; 3 – после ТФЭ на патроне DEAE; Элюент: 0,1% водный раствор ТФУ-ацетонитрил(30:70). Детектирование: нингидрин

Предварительные эксперименты показали, что наилучшие результаты по удалению "тяжелого белкового матрикса" из эритроцитарной массы и их концентрирования методом ТФЭ достигаются при использовании картриджей с умеренно гидрофобным сорбентом. Результаты по выделению целевых ТНБ на

нормально-фазовых силикагелевых сорбентах и сорбентах С4 показали, что наблюдалась необратимая сорбция как тяжелого матрикса, так и целевых тромбоцитарных белков, что приводит к существенному снижению выхода продукта. В то же время, применение слабых анионных и ОФ картриджей показывает на частичную сорбцию тяжелого матрикса и увеличение концентрации целевых белков в элюате, что продемонстрировано методами ОФ ВЭЖХ и ОФ ВЭТСХ, (рис. 1, 2)

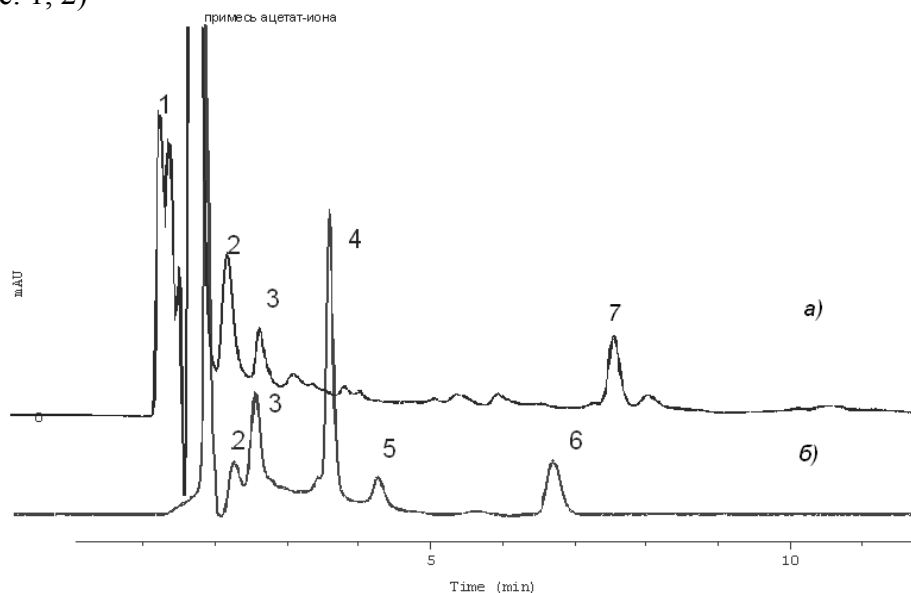


Рис. 2. ВЭЖХ ТНБ после предварительной очистки методом ТФЭ на патронах DEAE (а) и С16 (б). Колонка (15 x 3) мм RP-C18, $d_p=5\mu\text{м}$, элюент -0.1% водный раствор ТФУ - ацетонитрил 25/75; режим элюирования - изокрактический, детектирование спектрофотометрическое (220 нм)

Приведенные хроматограммы, полученные методом ВЭЖХ демонстрируют не только удаление тяжелого белкового матрикса, но и существенное различие в составе выделенных белков при использовании различных типов сорбентов для предварительной очистки ТНБ (Рис.2). Так, в случае использования слабого ионообменного сорбента происходит преимущественное концентрирование катионных белков, что видно из ВЭЖХ и ТСХ данных (рис. 2, 3). Полученные данные показывают, что применение слабых катион обменных сорбентов и ОФ патронов позволило получить хороший выход ТНБ без потери эффективности хроматографических колонок (рис. 2). Следует отметить, что применение фазы ОФ картриджей позволяет удалить значительно большее количество примесных фракций, выходящих практически с мертвым объемом колонки (рис. 2, фр. 1). При этом наблюдается сохранение ТАБ (фракций 2 и 3) в обоих случаях, появление катионных белков (фракции 4, 5) и выделение альбуминовой фракции 7, отличающейся по времени удерживания от фракции лизоцима 6, что вполне соответствует литературным данным [12]. Данные, полученные методом ОФ ВЭЖХ, находятся в соответствии с данными ОФ ТСХ (рис. 1 (3)). Однако, в ТСХ экспериментах обращает на себя внимание наличие интенсивной стартовой зоны, что может быть связано с концентрационными перегрузками пластины.

Заключение

Таким образом, в работе продемонстрирована возможность выделения тромбодезенсинов методом твердофазной экстракции, что существенно упрощает процедуру их выделения, минуя стадии диализной очистки и хроматографии низкого давления на сильно набухающих сорбентах. В дальнейшем планируется идентификация выделенных белковых продуктов методом MALDI/ESI масс-спектрометрии.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований №08-04-99105(Р-ОФИ)

Список литературы

1. Zaat S. A., Hiemstra P. S., Dankert J. Initial characterization of antibacterial proteins from trombin-simulated platelets involved in clearance of *Streptococcus sanguis* from cardiac vegetation in experimental endocarditis// in A. Totolian (ed.) Pathogenic streptococci, present and future. 1994. P 473-475
2. Hancock R.E.W., Scott M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses // PNAS. – 2000. – Vol.97. – P.8856-8861.
3. Yeaman M. R., Ibrahim A. S., Edwards J. E., Bayer Jr., A. S., Ghannoum M. A. Trombi-induced rabbit platelet microbicidal proteins is fungicidal in vitro//Antimicrob. Agents Chemother. 1993. Vol. 37. P. 546-553
4. Shailaja V.V., Himabindu V., Anuradha K. Et al. In vitro activity of gatifloxacin against gram negative clinical isolates in a tertiary care hospital // Indian J. Med. Microbiol. – Vol.22. – P.222-225.
5. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. – Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – С.174-186.
6. Mosca D.A., Hurst M.A., So W. et al. IB-367, a protegrin peptide with in vitro and in vivo activities against the microflora associated with oral mucositis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol.44. – P.1803-1808.
7. Фадеев С.Б. Видовой состав и персистентные характеристики возбудителей хирургической инфекции мягких тканей. – Автореф. дисс. канд. мед. наук.- Оренбург, 1998.
8. US Patent 5338724, A 61 K 037/02, 1994.; US Patent 6211148, A 61 K 038/16, 2001.; US Patent 6008195, C 07 K 007/08, 1999.
9. Yeaman M. R. The role of platelets in antimicrobial host defence // Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol.25. – P.951-968.
10. Krijveld J. S., Zaat A. J., Meeldijk J., van Veelen G., Fang, G., Poolman B., Brandt E.. Trombicidines, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines//J. Biol Chem. 2000. Vol. 275. P. 20374-20381
11. Yeaman M. R., Tang Y.-Q., Shen A. J. Bayer A. S., Selsted M. E. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins// Infect. Immunol.1997. Vol. 65. P. 1023-1031
12. Tang Y.-Q., Yeaman M. R., Selsted M. E. Antimicrobial peptides from human platelets//Infection and Immunity. 2002. Vol. 70 P. 65-6533

Горшков Николай Иванович – к.х.н., с.н.с.,
Учреждение Российской академии наук
Институт высокомолекулярных соединений
РАН, С.-Петербург

Малахова Ирина Ивановна – к.х.н., н.с.,
Учреждение Российской академии наук
Институт высокомолекулярных соединений
РАН, С.-Петербург

Журлов Олег Сергеевич – к.б.н., с.н.с.,
Государственное учреждение Институт
клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО
РАН, Оренбург

Иванов Юрий Борисович – д.б.н., в.н.с.,
Государственное учреждение Институт
клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО
РАН, Оренбург

Красиков Валерий Дмитриевич – д.х.н.,
в.н.с., Учреждение Российской академии наук
Институт высокомолекулярных соединений
РАН, С.-Петербург

Gorshkov Nikolay I. – PhD, senior researcher,
Institute of Macromolecular Compounds Russian
Academy of Sciences, St.-Petersburg

Malakhova Irina I. – PhD, researcher, Institute
of Macromolecular Compounds Russian Academy
of Sciences, St.-Petersburg

Zhurlov Oleg S. – PhD, senior researcher,
Institute of Cellular and Intercellular Symbiosis
Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Orenburg

Ivanov Yuriy B. – DrSci, leading researcher,
Institute of Cellular and Intercellular Symbiosis
Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Orenburg

Krasikov Valeriy D. – DrSci, leading
researcher, Institute of Macromolecular
Compounds Russian Academy of Sciences, St.-
Petersburg, e-mail: lenchrom@hq.macro.ru