

## БИОФИЗИКА И БИОХИМИЯ

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕПТИДА AEDG В ПОЛИПЕПТИДНОМ КОМПЛЕКСЕ ЭПИФИЗА

**В.Х.Хавинсон\*\*\*, А.Т.Копылов\*, Б.В.Васьковский\*,  
Г.А.Рыжак\*, Н.С.Линькова\*,\*\*\***

*\*АНО НИЦ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ; \*\*ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ; \*\*\*ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, РФ*

Полипептидный комплекс эпифиза и сконструированный на основе его аминокислотного анализа пептид AEDG обладают сходными биологическими эффектами. Оба биорегулятора нормализуют синтез мелатонина в пинеальной железе, функциональное состояние головного мозга, сетчатки глаза, сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной систем, обладают антиоксидантным эффектом, стресспротекторным и геропротекторным действием. Методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ в составе полипептидного комплекса эпифиза выявлены свободные аминокислоты (3.26%), дипептиды (23.19%), трипептиды (50.72%), тетрапептиды (22.10%), пентапептиды (0.72%). Методом селективного мониторинга реакций (SRM-метод) среди тетрапептидов, входящих в состав полипептидного комплекса эпифиза, выявлен пептид AEDG. Биологические эффекты, присущие полипептидному комплексу эпифиза, обусловлены эффектом входящего в его состав пептида AEDG.

**Ключевые слова:** полипептидный комплекс эпифиза, пептид AEDG, биологические эффекты

Полипептидный комплекс эпифиза (ПКЭ) представляет собой комплекс пептидов с молекулярной массой менее 10 кДа без примеси мелатонина и других индоллов. ПКЭ участвует в регуляции нейроиммуноэндокринного статуса организма через воздействие на гипоталамо-гипофизарную систему: нормализует синтез пинеального мелатонина, циркадианные ритмы организма, функциональное состояние головного мозга, сетчатки глаза, сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной систем, обладает антиоксидантным эффектом, оказывает стресспротекторное и геропротекторное действие в исследованиях на культурах клеток, животных и при применении в качестве лекарственного препарата у людей разного возраста [1-4,6,8].

При анализе аминокислотного состава ПКЭ было установлено, что с наибольшей частотой в нем встречаются глутаминовая кислота (Glu), аспарагиновая кислота (Asp), аланин (Ala) и глицин

(Gly). Из этих аминокислот был сконструирован и синтезирован тетрапептид Ala-Glu-Asp-Gly (AEDG) [3,9]. Установлено, что пептид AEDG обладает теми же биологическими эффектами, что и ПКЭ, но в меньших концентрациях [1,4-6,9,10]. Введение ПКЭ или пептида AEDG восстанавливает мелатонинообразующую функцию пинеальной железы у людей пожилого возраста и у старых обезьян [1,2], а также приводит к увеличению активности СОД, снижению количества продуктов ПОЛ, диеновых конъюгатов, АФК [2,4,9]. ПКЭ и пептид AEDG восстанавливали репродуктивную функцию старых крыс, повышая концентрацию тестостерона в крови у самцов и восстанавливая периодичность эстральных циклов у самок [6,8]. Сходные биологические эффекты этих пептидных биорегуляторов позволили предположить, что в составе ПКЭ содержится пептид AEDG. При этом ранее анализ пептидного состава ПКЭ не проводился.

Целью данной работы являлся поиск пептида AEDG в составе ПКЭ методами масс-спектрометрии и ВЭЖХ.

**Адрес для корреспонденции:** khavinson@gerontology.ru. Хавинсон В.Х.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе исследовали ПКЭ, который был представлен в виде раствора, содержащего в качестве вспомогательных веществ воду для инъекций и аминокислоту глицин. Концентрация ПКЭ составила 2.5 мг/мл. Пептиды и свободные аминокислоты в составе ПКЭ выявляли методом масс-спектрометрии во фронтальном зависимом тандемном режиме сканирования и направленном тандемном режиме с предварительной изоляцией ионов-предшественников (прекурсорных ионов) на времяпролетном квадрупольном масс-спектрометре высокого разрешения "Agilent G6550A Q-TOF LC/MS" ("Agilent"). Разделение компонентов, содержащихся в составе ПКЭ, выполняли в системе ВЭЖХ в различных условиях градиента элюции для направленного разделения нейтральных, полярных или гидрофобных компонентов системы на модульной UPLC-системе в микропоточковом режиме "Agilent Infinity Series 1290" ("Agilent") с помощью диодно-матричного детектора с переменной длиной волны (UV-детектор) и объемом ячейки 10 мкл. Выделение коротких пептидов, входящих в состав ПКЭ, осуществляли с использованием хромато-масс-спектрометрии методом селективного мониторинга реакций (SRM-метод) на хроматографической колонке с обращенной стационарной фазой Eclipse Plus C-18 RRHD и размером 2.1×100 мм, с размером частиц 1.8 мкм ("Agilent"). Хроматографическая колонка имела следующие характеристики: рабочий диапазон pH 3-8, максимальное давление на колонку 600 бар, общее время анализа образца составило 60 мин. Распределение выделенных и идентифицированных пептидов регистрировали по коэффициенту относительной гидрофобности [13]. Масс-спектры ПКЭ снимали в диапазоне отношения массы к заряду ( $m/z$ ) 420-1200 [7, 11, 12, 15]. Для получения масс-спектров производили отбор не более 5 ионов-предшественников за один полный цикл сканирования во фронтальном режиме с интенсивностью не менее 300 единиц, с относительной интенсивностью ионов-предшественников к базовому пику в спектре не менее 0.05%. Селекция ионов-предшественников по зарядному состоянию осуществлялась в следующем приоритетном порядке:  $2+ > 3+ > 1+ > (3+/N+)$ , где N — любой заряд, кроме тех, которые указаны.

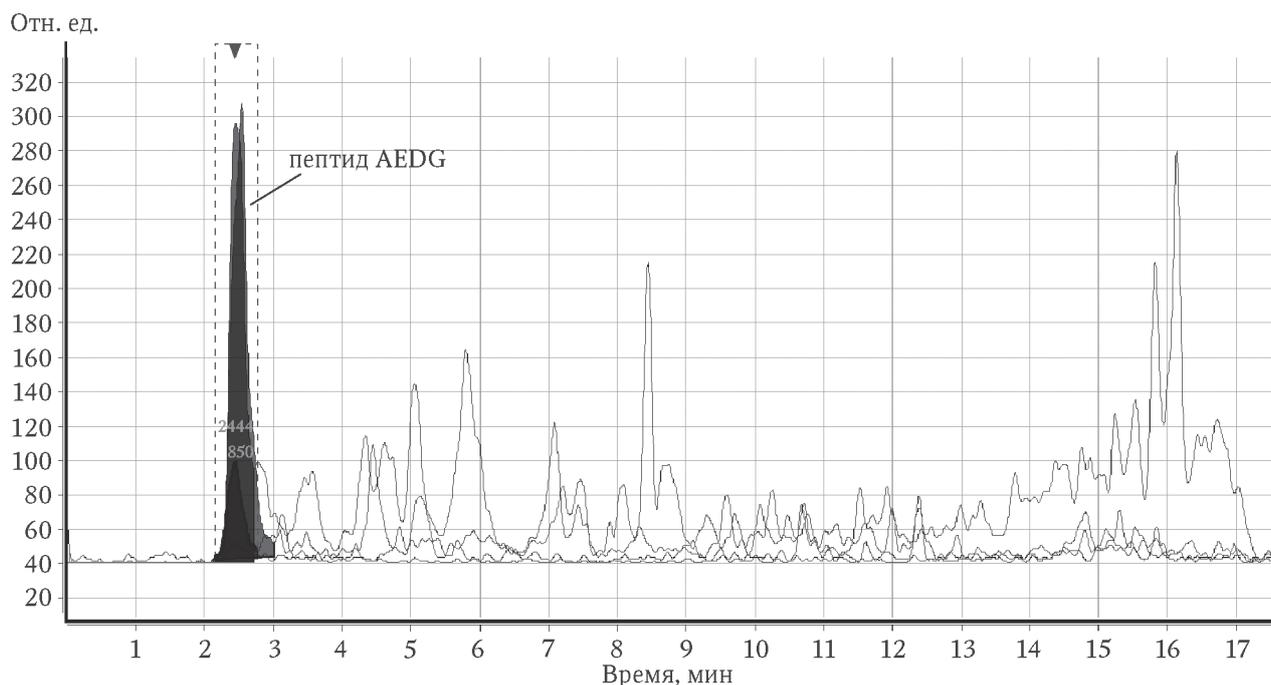
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В составе ПКЭ был идентифицирован 341 органический компонент. В составе компонентов выявлены свободные аминокислоты и короткие пептиды. Распределение аминокислот и коротких пептидов

в составе ПКЭ: свободные аминокислоты — 3.26%, дипептиды — 23.19%, трипептиды — 50.72%, тетрапептиды — 22.10%, пентапептиды — 0.72%. Среди выявленных коротких пептидов и свободных аминокислот было зарегистрировано 87% молекул с L-изомерами аминокислотных остатков и 17% — с модифицированными аминокислотными остатками (амидирование, окисление, лактамизация). При этом обнаруженные модификации относятся к индуцированным и посттрансляционным модификациям.

Методом фронтальной хромато-масс-спектрометрии не были получены убедительные данные, свидетельствующие о присутствии пептида AEDG в составе ПКЭ. Причиной этого может быть содержание пептида AEDG в составе ПКЭ в концентрации ниже пороговой чувствительности квадрупольной времяпролетной хромато-масс-спектрометрической системы. В связи с этим для идентификации пептида AEDG в составе ПКЭ использовали высокочувствительную хромато-масс-спектрометрическую систему с тройным квадрупольным масс-анализатором и конверсионным диодным детектором с электронным множителем и программное обеспечение "Skyline". Были рассчитаны и отображены первичные транзиции, специфичные для пептида AEDG, и оптимизированы условия регистрации сигнала: ускоряющий потенциал на выходе из ячейки соударения, энергия активации однозарядных ионов, время накопления ионов за дискретный цикл сканирования и параметры ионного источника. Также было минимизировано число интерферирующих ионов с использованием расчетных данных, полученных после анализа первичных результатов в srm2prot и SRMCollider. Удалось зарегистрировать и идентифицировать сигнал для коротких пептидов (не менее 75%, но не более 90% по фрагментным ионам и не менее 95% по прекурсорным ионам). Среди них был получен SRM-сигнал (сигнал селективного мониторинга реакций) с высокой гомоспецифичностью и схождением фрагментных ионов от пептида AEDG (рисунок).

Полученные данные свидетельствуют о том, что 22.1% состава ПКЭ представлено тетрапептидами, среди которых обнаружен пептид AEDG. Пептид AEDG содержится в ПКЭ в низкой концентрации, так как именно такие концентрации необходимы для реализации его физиологической активности. Это подтверждают данные по изучению активности пептида AEDG, проявляющейся в низких (наномолярных) концентрациях. Так, в исследовании влияния пептида AEDG на синтез фермента арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы (AANAT) и транскрипционного протеина pCREB, регулирующих синтез мелатонина в пинеалоцитах, пептид AEDG применяли в концентрации 100 нг/мл. При



Хроматограмма SRM-сигнала фокусированного ионного тока изолированных фрагментных ионов пептида AEDG в составе ПКЭ.

этом контрольное биологически активное вещество норадреналин, стимулирующее синтез AANAT и pCREB в пинеалоцитах, использовали в значительно большей концентрации — 1 мкг/мл [5,14].

Таким образом, в составе ПКЭ с помощью высокотехнологичных физико-химических методов анализа выявлен пептид AEDG, обладающий биологическими эффектами ПКЭ и являющийся его активным началом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б. Пинеальная железа: пути коррекции при старении. СПб., 2006.
2. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б., Антонюк-Щеглова И.А. Пептидный геропротектор из эпифиза замедляет ускоренное старение пожилых людей: результаты 15-летнего наблюдения // Бюл. exper. биол. 2011. Т. 151, № 3. С. 343-347.
3. Патент РФ № 2161501. Способ получения пептидов, обладающих тканеспецифической активностью, и фармацевтические композиции на их основе / В.Х.Хавинсон // Бюл. № 1. Опубликовано 10.01.2001.
4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С. Морфофункциональные и молекулярные основы старения эпифиза // Физиол. чел. 2012. Т. 38, № 1. С. 119-127.
5. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М., Кветная Т.В., Полякова В.О., Корф Х. Молекулярно-клеточные механизмы пептидной регуляции синтеза мелатонина в культуре пинеалоцитов // Бюл. exper. биол. 2012. Т. 153, № 2. С. 223-226.
6. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
7. Chernobrovkin A.L., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Moysa A.A., Pyatnitskiy M.A., Kuznetsova K.G., Ilina I.Y., Karpova M.A., Karpov D.S., Veselovsky A.V., Ivanov M.V., Gorshkov M.V., Archakov A.I., Moshkovskii S.A. Methionine to isothreonine conversion as a source of false discovery identifications of genetically encoded variants in proteogenomics // J. Proteomics. 2015. Vol. 120. P. 169-178.
8. Khavinson V.Kh. Peptides and ageing // Neuroendocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
9. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, 2005.
10. Khavinson V.Kh., Morozov V.G. Peptides of pineal gland and thymus prolong human life // Neuroendocrinol. Lett. 2003. Vol. 24, N 3-4. P. 233-240.
11. Kopylov A.T., Myasoedov N.F., Dadayan A.K., Zgoda V.G., Medvedev A.E., Zolotarev Y.A. Use of deuterium labeling by high-temperature solid-state hydrogen-exchange reaction for mass spectrometric analysis of bradykinin biotransformation // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2016. Vol. 30, N 11. P. 1283-1294.
12. Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Combined use of irreversible binding and MRM technology for low- and ultralow copy-number protein detection and quantitation // Proteomics. 2013. Vol. 13, N 5. P. 727-742.
13. Krokhin O.V., Spicer V. Peptide retention standards and hydrophobicity indexes in reversed-phase high-perfor-

- mance liquid chromatography of peptides // *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81, N 22. P. 9522-9530.
14. *Paltsev M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., Anderson G., Kvetnaia T.V., Linkova N.S., Paltseva E.M., Rubino R., De Cosmo S., De Cata A., Mazzoccoli G.* Morphofunctional and signaling molecules overlap of the pineal gland and thymus: role and significance in aging // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, N 11. P. 11 972-11 983.
15. *Percy A.J., Tamura-Wells J., Albar J.P., Aloria K., Amirkhani A., Araujo G., Arizmendi J.M., Blanco F.J., Canals F., Cho J.Y., Colomé-Calls N., Corrales F.J., Domont G., Espadas G., Fernandez-Puente P., Gil C., Haynes P.A., Hernández M.L., Kim J.Y., Kopylov A., Marcilla M., McKay M.J., Mirzaei M., Molloy M.P., Ohlund L.B., Paik Y.K., Paradela A., Raftery M., Sabidó E., Sleno L., Wilffert D., Wolters J.C., Yoo J.S., Zgoda V., Parker C.E., Borchers C.H.* Inter-laboratory evaluation of instrument platforms and experimental workflows for quantitative accuracy and reproducibility assessment // *EuPA Open Proteomics.* 2015. Vol. 8. P. 6-15.

Получено 17.01.17

---