

УДК 543.544.5

## ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЛИЗАТА (hPL)

**Журлов О.С.**

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург,  
e-mail: jurlov1968@mail.ru*

Проведен сравнительный анализ антимикробной активности лиофилизированных препаратов фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL). С помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано, что антимикробную активность проявляли фракции фильтрата и ультрафильтрата с большим временем удерживания. Рассмотрены практические аспекты применения фракционирования тромбоцитарного лизата (hPL) в регенеративной медицине и клеточной биотехнологии.

**Ключевые слова:** тромбоцитарный лизат (hPL), низкомолекулярные тромбоцитарные пептиды, ВЭЖХ

## FRACTIONATION ANTIMICROBIAL PEPTIDES PLATELET LYSATES (HPL)

**Zhurlov O.S.**

*Institute Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of Russian Academy Sciences, Orenburg,  
e-mail: jurlov1968@mail.ru*

A comparative analysis of the antimicrobial activity of filtrate and ultrafiltrate of the platelet lysate (hPL). Using reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) shows that the antimicrobial activity exhibited filtrate and ultrafiltrate fractions a longer retention time. We consider the practical aspects of the use of fractionation platelet lysate (hPL) in regenerative medicine and cell biotechnology.

**Keywords:** platelet lysate (hPL), low-molecular platelet peptides, HPLC

Фракционирование и очистка биологически активных пептидов тромбоцитарного лизата (hPL) является сложной задачей, в связи с присутствием в тромболизате высокомолекулярных белков «тяжелого» белкового матрикса [2; 7]. Процедура прободготовки для высокоэффективной жидкостной хроматографии, включающая освобождение аналита от высокомолекулярных матриксных белков, с помощью градиентного центрифугирования, осаждения органическими растворителями (этанол, ацетон), адсорбции на сорбентах с алкильными группами (C8-C18) или катионнообменных смолах, приводит к потере индуцибельных низкомолекулярных пептидов, находящихся в низкой концентрации в тромбоцитарном лизате (hPL) [8; 12], изменению их нативной структуры и биологических свойств.

Гельпроникающая хроматография (ГПХ), в режиме низкого давления на сефадексах, наиболее востребованный метод первичной очистки аналита от высокомолекулярных белков, также приводит к значительным потерям низкомолекулярных пептидов, в связи с длительным периодом разделения.

Однако, нельзя не признать, что описанный ранее способ разделения на колонках с сефадексом G-50 и G-75 оказался достаточно эффективен для очистки ТКБ (тромбоцитарного катионного белка) [1].

Безусловно, эти методы, включая и современные масс-спектрометрические методы анализа (MALDI-TOF MS, SELDI-TOF MS), в сочетании с методами ионообменной хроматографии (strong cation exchange chromatography), незаменимы для качественного анализа рацемической смеси тромбоцитарных пептидов, однако они не решают проблему выделения и концентрирования индуцибельных низкомолекулярных пептидов, присутствующих в анализе в низких концентрациях. Кроме того, использование для фракционирования пептидов тромбоцитарного лизата (hPL) хроматографических методов приведет к значительному удорожанию конечного продукта.

Методы фильтрации и ультрафильтрации, обычно, в меньшей степени оказывают влияние на нативную структуру пептидов и их биологическую активность, но, до недавнего времени, они не приводили к эффективному разделению, что было связано с низким качеством фильтров (сорбция белка, большой размер пор).

В регенеративной медицине и клеточной биотехнологии, для решения практических задач необходимы простые методы получения фракций пептидов (ex tempore) с определенными биологическими свойствами. Не менее важной задачей является снижение бактериальной контаминации биологических материалов и клеточных культур, что на

практике реализуется путем введения в питательные среды антибактериальных и антифунгицидных препаратов, оказывающих в тоже время и цитотоксический эффект.

В связи с этим, целью данной работы явился сравнительный анализ бактерицидной активности фракций фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL).

### Материалы и методы исследования

В работе использовали растворители и химические реактивы марок ХЧ, ОСЧ, ЧДА (Криохром, Россия).

Лиофилизированный препарат тромбоцитарных лизатов (hPL) получали из тромбоконцентрата ( $0.55 \times 10^{11}$  тромбоцитов). Тромбоконцентрат подвергали 3-х кратному замораживанию при 163.15 °К, оттаиванию (278.15 °К) и подвергали центрифугированию при 1800 g в течение 30 мин. Надосадок отбирали и фильтровали через мембранные фильтры Durapore 0.22 мкм. Фильтрат подвергали ультрафильтрации через полиэфирсульфоновые (PES) мембраны, Spin-X UF 6 ml (Corning), с низкой сорбцией белка, пропускающие пептиды менее 10 кДа, на центрифуге 5415 Д («Eppendorf», Германия), в режиме работы 16100 g×60 минут, 278.15 °К. Фильтрат и ультрафильтрат лиофилизировали. Количество белка оценивали методом Бредфорд (фильтрат – 2 мг/мл и ультрафильтрат – 0.5 мг/мл).

С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na и ТСХ определяли качественный состав образцов. Образец А содержал тромбоцитарные белки до ультрафильтрации (7.61-10.47, 20-25, 60-70 кДа); образец D – ультрафильтрат [7].

Выделение фракций проводили на жидкостном хроматографе высокого давления «Smartline» (Knauer, Германия) с дифференциальным рефрактометрическим и сканирующим фотометрическим детекторами. В работе использовали хроматографические колонки фирмы Waters, упакованные сорбентом  $\mu$ -Bondapak (С18.5 мкм, 3.9×300 мм). Фракции образцов А и D с антибактериальной активностью объединяли и лиофилизировали.

Определение бактерицидной активности проводили на культурах *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Staphylococcus aureus* P209 ATCC 6538P и на клинической культуре *Staphylococcus epidermidis* 7a, обладающей гемолитической активностью,  $\alpha$ -гемолиз ( $d = 8$  мм). Суточные агаровые культуры бактерий смывали 0.15 М раствором NaCl и готовили микробные взвеси, которые стандартизовали по оптической плотности ( $OD_{540nm} = 0.1$ ). Антибактериальную активность фильтрата (образец А) и ультрафильтрата (образец D) тромбоцитарных лизатов (hPL) изучали *in vitro* методом серийных разведений. Предварительно лиофилизированные препараты разводили 0.15 М раствором NaCl, содержащим 0.01 % АсОН. К 5 мкл образца добавляли 45 мкл бактериальной взвеси. Планшеты инкубировали на шейкере при + 37 °С, в течение 30 мин. После инкубации по 10 мкл высевали на кровяной агар. На следующие сутки подсчитывали количество КОЕ. Все эксперименты были выполнены трижды.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с использованием методов вариационной статистики [6].

### Результаты исследования и их обсуждение

Для исследования использовали лиофилизированные препараты фильтрата (образец А) и ультрафильтрата (образец D) тромбоцитарного лизата (hPL). Лиофилизированные препараты фильтрата и ультрафильтрата были получены из одной партии тромбоцитов и на этапах выделения и очистки фильтрата и ультрафильтрата сообразовались их объемные соотношения.

Для проведения обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) препараты разводили (1:100) 0.01 % раствором АсОН, насаивали по 5 мкл на колонку С18 (3.9×300 мм). Элюцию, проводили линейным градиентом (ацетонитрил + 0.1 % ТФУ/Н<sub>2</sub>O + 0.1 % ТФУ), в течение 10 мин, отклик детектора фиксировали на двух длинах волн 220 нм и 280 нм.

В режиме градиентного элюирования, максимальная эффективность разделения фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL) достигалась при соотношении 70:30 (ацетонитрил + 0.1 % ТФУ/Н<sub>2</sub>O + 0.1 % ТФУ), со скоростью элюции 1 мл/мин.

При фракционировании фильтрата (Образец А) было отобрано 3 фракции с временем удерживания: 3.40 мин, 3.83 мин и 7.10 мин (табл. 1).

Лиофилизаты 1-ой и 2-ой фракции антибактериальной активностью не обладали. Лиофилизат фракции с наибольшим временем удерживания (7.10 мин), обладал антибактериальной активностью. При фракционировании лиофилизированного препарата ультрафильтрата, получили 5 фракций, с максимальным временем удерживания 3.22, 3.73, 3.93, 4.42, 6.93, 7.22 мин.

Лиофилизаты первых трёх фракций не обладали антибактериальной активностью, фракции 4 и 5 с наибольшим временем удерживания обладали антибактериальной активностью, эти фракции были объединены и лиофилизированы.

Антибактериальную активность лиофилизированного препарата 3-й фракции фильтрата и объединенных 4 и 5 фракций ультрафильтрата тромбоцитарных лизатов (hPL) изучали *in vitro* методом серийных разведений (табл. 2).

Антимикробные пептиды, входящие в состав препарата фильтрата тромбоцитарного лизата (hPL) подавляли рост *Micrococcus luteus* ( $MIC_{50} = 4$  мг/мл) и *Staphylococcus aureus* P209 ( $MIC_{50} < 2$  мг/мл), но клинический изолят *Staphylococcus epidermidis* 7a отличалась устойчивостью к препарату в диапазоне используемых концентраций.

Таблица 1

ВЭЖХ лиофилизированных препаратов тромболизата (hPL)

Образец	Образец А (фильтрат)			Образец D (ультрафильтрат)				
	1 фр.	2 фр.	3 фр.	1 фр.	2 фр.	3 фр.	4 фр.	5 фр.
Max. RT	3.40	3.83	7.10	3.73	3.93	4.42	6.93	7.22
Start RT	3.35	3.60	5.93	3.50	3.87	4.15	6.05	7.07
End RT	3.58	4.22	7.88	3.87	4.15	4.88	7.07	7.90
Area	6.50	17.76	38.91	19.06	14.69	20.55	12.20	11.69
Heigh	55.56	71.42	40.51	79.71	100.49	78.32	23.07	23.34
Width	0.12	0.22	0.92	0.20	0.13	0.18	0.43	0.42

Примечание. Max. RT(min) – время удерживания максимума пика; Start RT(min) – время начала интегрирования пика; End RT(min) – время удерживания окончания интегрирования пика; Area(mAU\*min) – площадь пика; Heigh(mAU) – высота пика; Width(min) – ширина пика; фр. – фракции (соответствуют отдельным пикам на хроматограмме, при 220 нм).

Таблица 2

Антибактериальная активность фракций тромбоцитарного лизата (hPL)

тест-штамм	Концентрация препарата, мг/мл (лиофилизат)				
	0	2	4	6	10
Micrococcus luteus NCTC 2665	295.7 ± 6.6 <sup>1</sup>	348.0 ± 12.5	204.3 ± 3.5*	28.0 ± 2.1*	8.3 ± 1.8*
	405.0 ± 16.1 <sup>2</sup>	394.0 ± 14.6	202.7 ± 4.3*	156.3 ± 13.0*	48.7 ± 2.0*
Staphylococcus aureus P209 ATCC 6538P	1688.7 ± 84.5	138.0 ± 9.5*	33.0 ± 2.6*	21.0 ± 2.3*	6.0 ± 1.2*
	1197.0 ± 24.0	120.7 ± 9.4*	81.7 ± 7.5*	104.7 ± 4.1*	37.3 ± 6.2*
Staphylococcus epidermidis 7a	516.7 ± 12.0	534.7 ± 6.7	546.0 ± 5.6	410.0 ± 43.6	424.3 ± 10.3*
	853.7 ± 35.6	671.3 ± 39.8*	506.0 ± 4.2*	489.3 ± 5.5*	390.0 ± 21.1*

Примечание. \*p < 0.05 в сравнение с контролем; <sup>1</sup> – КОЕ бактерий при инкубации с фракцией фильтрата (Образец А); <sup>2</sup> – КОЕ бактерий при инкубации с объединёнными фракциями ультрафильтрата (Образец D).

Препарат, содержащий низкомолекулярные тромбоцитарные пептиды менее 10 кДа, полученный с помощью ультрафильтрации, обладал антимикробной активностью и подавлял рост *Micrococcus luteus* (МИК<sub>50</sub> = 4 мг/мл), *Staphylococcus aureus* P209 (МИК<sub>50</sub> < 2 мг/мл) и *Staphylococcus epidermidis* 7a (МИК<sub>50</sub> = 10 мг/мл).

С помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), удалось разделить лиофилизированные препараты фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL) на отдельные фракции, содержащие антимикробные пептиды.

Таким образом, было показано, что лишь фракции с большим временем удерживания проявляют антимикробную активность. Сравнительный анализ антимикробной активности препаратов фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL) показал, что, по всей видимости, антимикробная активность тромбоцитарного лизата обусловлена низкомолекулярными пептидами (менее 10 кДа). Об этом свидетельствует отсутствие достоверных от-

личий по МИК<sub>50</sub> для *Micrococcus luteus* NCTC 2665 и *Staphylococcus aureus* P209 ATCC 6538P, при инкубации бактериальных культур с препаратами фильтрата и ультрафильтрата тромбоцитарного лизата (hPL).

Кроме того, описанный нами ранее, феномен снижения способности стафилококков формировать биопленки при инкубации с низкомолекулярными тромбоцитарными пептидами [3; 4], и их ингибирующее влияние на кинетику роста биопленкообразующих *Escherichia coli* [5], свидетельствуют о многофункциональности низкомолекулярных пептидов тромбоцитарного лизата (hPL).

Разработка методики стандартизации фракций тромбоцитарных пептидов (по мол. массе) и перспектива использования комбинаций фракций тромбоцитарного лизата (hPL) открывает новые перспективы для приготовления растворов тромбоцитарных пептидов «ex tempore» с определенными биологическими свойствами.

Использование отдельных фракций тромбоцитарного лизата (hPL), в качестве

замены бычьему сывороточному альбумину (BSA) и эмбриональной телячьей сыворотке (FBS) для культивирования клеток в биотехнологии и регенеративной медицине, может способствовать снижению негативных последствий, связанных с аллоиммунизацией при трансплантации стволовых клеток. Некоторые лаборатории уже используют тромбоцитарный лизат (hPL) в качестве замены эмбриональной телячьей сыворотке [9, 10, 11].

#### Список литературы

1. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. – 199 с.
2. Горшков Н.И., Малахова И.И., Красиков В.Д., Журлов О.С., Иванов Ю.Б. Жидкостная хроматография тромбоцитарных белков // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т.10, № 5. – С. 661–668.
3. Журлов О.С. Влияние антимикробных пептидов тромбоцитарного лизата (hPL) на физико-химические свойства и кинетику роста биопленкообразующих коагулазоотрицательных стафилококков // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 9. – С. 107–109.
4. Журлов О.С., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Егорова О.С. Влияние антимикробных пептидов тромбоцитов человека на биопленкообразование *Staphylococcus aureus* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 4. – С. 66–70.
5. Журлов О.С., Сайкина Е.Ю., Журлова В.О. Анализ влияния пептидов тромбоцитарного лизата (hPL) на кинетику роста *Escherichia coli* // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2015. – № 1-1. – С. 80–84.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
7. Малахова И.И., Егорова О.С., Горшков Н.И., Журлов О.С., Иванов Ю.Б., Карцова А.А., Красиков В.Д. Исследование тромбоцитарных белков по составу и молекулярной массе транспортными методами // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, № 6. – С. 973–980.
8. Blair P. and Flaumenhaft R. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates // *Blood Rev.* – 2009. – Vol. 23. – P. 177–189.
9. Bieback K., Hecker A., Kocaomer A. et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27.- P. 2331–2341.
10. Muller I., Kordowich S., Holzwarth C. et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human // *BM. Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8. – P.437–444.
11. Schallmoser K., Bartmann C., Rohde E. et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells // *Transfusion.* – 2007. – Vol. 47. – P. 1436–1446.
12. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets // *Infection and Immunity.* – 2002. – Vol. 70. – P. 65–6533.