



005013984

ЖИЛИНСКИЙ
Дмитрий Владимирович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ГЕРОПРОТЕКТОРНЫХ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ ТИМУСА И МОЗГА ЖИВОТНЫХ**

14.01.30 - геронтология и гериатрия

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

15 MAR 2012

Санкт-Петербург - 2012

Работа выполнена в лаборатории фармакологии пептидов Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ, член-корр. РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Хавинсон Владимир Хацкелевич;

кандидат химических наук
Соловьев Андрей Юрьевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Чалисова Наталья Иосифовна

доктор биологических наук, профессор
Розенгарт Виктор Иосифович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

Защита состоится «26» марта 2012 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 601.001.01 при Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН по адресу 197110, г. Санкт-Петербург, Динамо, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Автореферат разослан «24» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Л.С. Козина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Демографические данные последних лет указывают на постоянное увеличение количества пожилых и старых людей среди населения разных стран. Эта тенденция беспокоит финансово-экономические институты большинства государств, так как пожилые и старые люди в большинстве представляют собой нетрудоспособное население, для которого характерны многочисленные заболевания и инвалидность. Поэтому основной задачей геронтологии и гериатрии является разработка современных подходов к лечению пожилых и старых людей, создание новых оздоровительных схем их реабилитации и возвращения к активной форме существования.

Решение этих задач напрямую связано с развитием новых направлений фармакогнозии и фармации. Одним из этих направлений является развитие и внедрение нового класса органопрепаратов, представляющих собой низкомолекулярные природные пептиды, регулирующие физиологические функции конкретных органов и тканей. Эти пептиды проявляют отчётливые геропротекторные свойства, которые определяются, в частности, повышением клеточного и гуморального иммунитета и укреплением нейроиммунной координации в стареющем организме [Коркушко О.В. и соавт., 2002].

Ведущими направлениями исследований в области современной геронтологии являются: изучение иммунологических механизмов старения, разработка новых схем получения природных лекарственных препаратов на основе пептидов, экспериментальное изучение геропротекторного действия пептидов, необходимость преларативного получения индивидуальных природных олигопептидов и внедрение методов биорегулирующей терапии в медицинскую практику [Морозов В.Г. и соавт., 1985]. Пептидные биорегуляторы участвуют в регуляции параметров старения и содержатся в различных клетках и тканях организма. Они образуются в ходе ограниченного протеолиза белков, обладают широким спектром биологического действия и координируют процессы развития и функции многоклеточных систем [Климов П.К. и соавт., 1993].

Имеющиеся в литературе данные о строении и биохимических свойствах регуляторных пептидов разрознены, а иногда и противоречивы. Это касается как экспериментальных данных, так и теоретических представлений о механизмах молекулярных взаимодействий пептидных препаратов с клеточными рецепторами и внутриядерным содержимым клетки.

В то же время, для препаратов низкомолекулярных пептидов известны данные об их составе: все они представляют смесь (композицию) из нескольких низкомолекулярных пептидов с примесью аминокислот в отдельных случаях. По-видимому, именно сложность выделения и препаративного получения этих пептидных препаратов не позволяет провести фармакокинетический анализ этих компонентов.

Цель исследования

С помощью современных методов фракционирования многокомпонентных пептидных препаратов получить индивидуальные высокоочищенные пептиды из тимуса и коры головного мозга крупного рогатого скота, установить их аминокислотный состав, молекулярные характеристики и оценить их биологическую, в частности, тканеспецифическую и геропротекторную активности.

Задачи исследования

1. Адаптировать способы выделения и очистки геропротекторных олигопептидов из животных тканей, исключая использование органических растворителей.
2. Разработать способ изократической ионообменной хроматографии для получения индивидуальных геропротекторных олигопептидов в препаративных количествах.
3. Определить молекулярные характеристики (молекулярная масса, изоэлектрическая точка) и аминокислотный состав пептидов, выделенных из тимуса и мозга животных; провести сравнение их аминокислотных составов.
4. Установить тканеспецифические свойства и геропротекторное действие выделенных пептидов в экспериментальной модели органотипических культур молодых и старых крыс.

Научная новизна исследования

Впервые разработан метод выделения индивидуальных пептидов из пептидных препаратов тимуса и мозга крупного рогатого скота без использования органических растворителей, заключающийся в тангенциальной микрофильтрации экстракта ткани на трековых мембранах, твердофазной экстракции пептидов с использованием катионообменного сорбента и ионообменной изократической хроматографии низкого давления.

Проведено сравнение молекулярных характеристик (аминокислотный состав, молекулярная масса, изоэлектрическая точка, биологическая активность) геропротекторных индивидуальных пептидов, выделенных из пептидных препаратов тимуса и мозга предложенным методом. Установлено, что индивидуальный пептид тимуса имеет следующий аминокислотный состав: Glu, Lys, Asp, Gly, Val, Ala, Leu, а индивидуальный пептид мозга - Glu, Lys, Ala, Ile. Молекулярная масса пептидов, выделенных из тимуса - 730,8 Да, а из мозга - 459,5 Да. Изоэлектрические точки пептидов, выделенных из тимуса и мозга 4,04 и 6,6, соответственно.

Доказано, что пептиды, выделенные методом тангенциальной микрофильтрации и твердофазной экстракции обладают тканеспецифическими свойствами: пептиды, выделенные из тимуса, обладают пролиферативной активностью в отношении органотипических культур тимуса и не влияют на индекс площади зоны роста эксплантатов

других тканей. Пептиды, выделенные из коры головного мозга, увеличивают зону роста эксплантатов в органотипической культуре мозга, но не влияют на рост эксплантатов других тканей.

Впервые показаны геропротекторные свойства индивидуальных пептидов тимуса и мозга, выделенных методом тангенциальной микрофльтрации и твердофазной экстракции, и ионообменной хроматографией. Пептиды проявляли пролиферативную активность в отношении эксплантатов тимуса и мозга в органотипических культурах от старых крыс.

Проведено сравнение пептидов, выделенных предложенным методом со стандартными лекарственными пептидными препаратами, обладающими геропротекторным действием: Тималином, Кортексином и Церебролизином. Установлено, что компонентный состав пептидных препаратов, полученных разработанным методом и методом с использованием органических растворителей, идентичен.

Научно-практическая значимость

Разработана схема выделения индивидуальных коротких пептидов из тканей животных с использованием современных инновационных методов фракционирования сложных смесей на основе использования трековых мембран и полимерных сорбентов. Данная схема пригодна для технологического масштабирования, так как исключает использование органических растворителей с соответствующим повышением экологической безопасности производства.

Предложенная схема выделения пептидов может быть использована для внедрения в производство геропротекторных препаратов на основе экстрактов из животного сырья.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана схема выделения высокоочищенных пептидных фракций из животного сырья, основанная на методах тангенциальной микрофльтрации и твердофазной экстракции, что позволило полностью исключить использование органических растворителей.
2. Компонентный состав пептидных препаратов, полученных разработанным методом и методом с использованием органических растворителей, идентичен.
3. Пептиды, выделенные из тимуса и коры головного мозга крупного рогатого скота, обладают тканеспецифическими свойствами, способствуя увеличению зоны роста эксплантатов соответствующих тканей, и не влияют на рост эксплантатов других тканей в органотипической культуре тканей.
4. Пептиды, выделенные из тимуса и мозга крупного рогатого скота разработанным методом, обладают геропротекторным действием, способствуя увеличению зоны роста эксплантатов соответствующих

тканей, полученных от старых крыс, в органотипической культуре тканей

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 статей, 4 из которых – в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ, 7 – в виде тезисов докладов. Все результаты и положения диссертационного исследования полностью отражены в публикациях. Работа выполнена при поддержке программы ФСР МФП НТС «Участник молодежного научно-инновационного конкурса 2010» («У.М.Н.И.К.») № 8945р/14029.

Апробация

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на 6-м международном симпозиуме “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems” (Санкт-Петербург, 2008), научном семинаре “Хроматография, ионный обмен, альтернативные методы” (Санкт-Петербург, 2009), 5-ой международной конференции молодых ученых “Modern problems of polymer science” (Санкт-Петербург, 2009), 4-ом Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), 6-ой международной конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2010), 7-м международном симпозиуме “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”(Санкт-Петербург, 2011), 7-ой международной конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2011), 5-ой юбилейной международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения -2012» (Белгород, 2012).

Связь с планом НИР

Диссертация является составной частью научно-исследовательской работы Института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН в области создания и исследования пептидных препаратов, обладающих геропротекторными свойствами, а также разработки современных способов выделения индивидуальных тканеспецифических пептидов из природного сырья.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и обсуждение результатов), выводов и списка литературы. Объем работы составляет 125 страницы. Список литературы содержит 123 источников, в том числе 77 отечественных и 46 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 33 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Основными объектами исследования являются геропротекторные пептидные препараты, полученные из тимуса и коры головного мозга КРС при использовании современных методов фракционирования белков и пептидов и индивидуальные геропротекторные пептиды, выделенные из пептидных препаратов тимуса и мозга методами ионообменной хроматографии. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие лекарственные пептидные препараты: Тималин, Церебролизин [Машковский М.Д., 2005] и Кортексин [Морозов В.Г. и др., 1998], а также аминокислоты и дипептид Вилон (Lys-Glu). В качестве исходного сырья использовали замороженные ткани тимуса и коры головного мозга КРС, полученные от ООО «Самсон Мед». В работе использованы следующие методы:

Микрофльтрация. Удаление высокомолекулярных фракций ДНК и высокомолекулярных белков из тканевых экстрактов проводили на микрофльтрационных плоских мембранных модулях марки ПФМ ("Плазмофильтр", Санкт-Петербург) с лавсановыми трековыми мембранами с размером пор 0,4 мкм в качестве фильтрующего материала. Фракционирование проводили при высоких скоростях прокачивания экстракта через модуль. В качестве препарата сравнения использовали нативную ДНК молок лосося производства «СКТБ (Новосибирск)». Молекулярные массы (ММ) фракций ДНК оценивали вискозиметрически.

Твердофазная экстракция (ТФЭ). ТФЭ из фильтратов тканевых экстрактов проводили на сульфокатионите КУ-2Х8 в массообменниках колоночного типа с верхним и нижним дренажом. Растворы после микрофльтрации прокачивали через колонку 5x11 см с сорбентом при подаче раствора снизу вверх со скоростью 100 мл·ч⁻¹·см⁻², так что сорбент находился в состоянии взвешенного слоя. Десорбцию пептидных компонентов проводили 0,5М водным раствором аммиака со скоростью 5 мл·ч⁻¹·см⁻² при температуре 25°C. После завершения десорбции элюат концентрировали в роторно-пленочном испарителе при температуре 42°C. Полученные осадки растворяли в дистиллированной воде и лиофильно высушивали. Разделение смеси аминокислот и пептидов проводили с использованием ионообменной хроматографии на сульфокатионитах КУ-2Х8 (Россия) и Dowex 50WX8 (Dow Chemical, USA) в Na-форме на колонках 1,1x49 см и 1,1x36 см при температуре 32°C. Калибровку колонок осуществляли стандартными растворами аминокислот с различным значением изоэлектрических точек. В качестве элюентов применяли цитратные буферные растворы с различным значением pH.

Определение концентрации аминокислот и пептидов. Определение концентрации аминокислот и пептидов проводили по модифицированному методу Мура и Штейна, который основан на реакции нингидрина с α-аминогруппой аминокислоты или пептида [Moore S. et al., 1948].

Гель-хроматография. Для оценки молекулярно-массового распределения компонентов в пептидных препаратах гельхроматографическим методом в работе использовали сефадекс G-50, «superfine» (Pharmacia, Швеция). Высота слоя сефадекса составляла 34 см, диаметр колонки 1,6 см. Элюцию проводили 0,05М раствором NaCl с добавлением 0,02%-ого раствора NaN_3 со скоростью 6 мл·ч⁻¹·см⁻² при температуре 25°C, собирая на выходе из колонки фракции объемом по 3 мл. В каждой фракции измеряли оптическую плотность раствора при длинах волн 260 и 280 нм и интенсивность окраски раствора нингидрином при длине волны 570 нм.

Тонкослойная хроматография. Компонентный состав пептидных препаратов определяли с помощью метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbfil (Ленхром, Россия) в системе изопропанол-этилацетат-аммиак-вода (30:10:3.5:10, v/v) [Сакодынский К. И. и др., 1993]. Гидролиз выделенных индивидуальных пептидов проводили при температуре 110 °С в 6 н растворе HCl без доступа кислорода в течение 24 часов. Избыток соляной кислоты удаляли вакуум-выпариванием. Для качественного определения аминокислот в полученном гидролизате использовали таблицу R_f индивидуальных аминокислот.

В качестве препаратов сравнения использовали комплексные пептидные препараты и синтетические пептиды: Церебролизин (Ebewe Pharma, Австрия), Тималин и Кортексин (Герофарм, Россия), синтетический дипептид Вилон (Lys-Glu) (Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАН, Санкт-Петербург).

Определение биологической активности пептидов. Тканеспецифичность и геропротекторную активность пептидов определяли в экспериментальной модели органотипической культуры [Чалисова Н.И. и др., 2006]. Для изучения тканеспецифических свойств использовали эксплантаты следующих половозрелых 3-х месячных крыс линии "Вистар": тимус, головной мозг, сердце, хрящи, простата, семенники, яичники, печень, поджелудочная железа, щитовидная железа, сосуды, почек. Для изучения геропротекторного действия индивидуальных пептидов использовали, эксплантаты тимуса и головного мозга молодых 3-х месячных и старых 24 месячных крыс. Индекс площади выражали в процентах относительно контроля. Достоверность различий в индексах площади оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Вероятность ошибки цифровых данных закладывалась в пределах 5%, что отвечает стандартам, принятым для медико-биологических исследований. При тестировании активности каждого препарата использовали 20-25 эксплантатов ткани. Всего в эксперименте использовали 1500 эксплантатов тканей крыс.

Статистическая обработка результатов исследования. Математическое обеспечение исследования осуществлялось в соответствии со стандартными методиками, принятыми для обработки результатов медико-биологических исследований [Гланц С., 1999; Григорьев С.Г. и др.,

2002] с использованием параметрического метода t-критерия Стьюдента. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных производили с использованием программы «OriginLab 8.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение пептидов из тимуса

Все известные способы выделения регуляторных пептидов из тимуса начинаются с процесса экстракции пептидов из цельной животной ткани. В то же время до сих пор не определено, какие структуры (органеллы) клетки или ядра представляют собой депо регуляторных пептидов. С целью получения пероральной лекарственной формы регуляторных пептидов в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был разработан способ получения комплексов ДНК и пептидов (нуклеопротеиновых комплексов, НПК) из тканей животных. Способ основан на щелочной экстракции пептидов и растворимой фракции ДНК при разрушении клеточных и ядерных мембран. процесс включает в себя отделение нерастворимых балластных веществ и осаждение выделенных нуклеопротеиновых комплексов [Морозов В.Г. и др., 1997]. В частности, из тимуса был получен НПК, содержащий пептиды и обладающий геропротекторной активностью [Рыжак Г.А. и др., 2002].

В представляемой работе использована схема препаративного выделения и очистки высокоочищенных коротких пептидов из тимуса, которая начинается с этапа выделения НПК тимуса из размороженной ткани тимуса. Общая схема получения и исследования индивидуальных пептидов из тимуса представлена на рисунке 1.

На первом этапе из свежеразмороженного фарша тимуса проводили экстракцию НПК содовым раствором при нагревании и рН 10,7. После механической фильтрации суспензии через капрон и бязь и получали экстракт, содержащий макромолекулярные белки, растворимые фракции ДНК и короткие регуляторные пептиды. Затем провели нейтрализацию экстракта до рН 6,85.

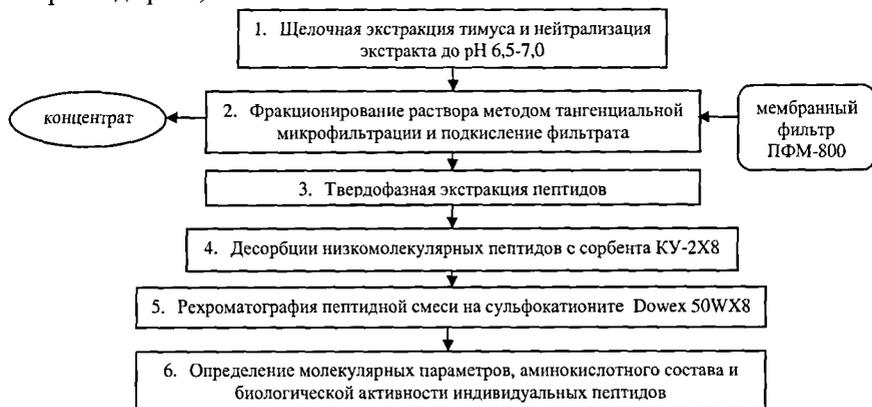


Рис. 1. Схема выделения индивидуальных пептидов из тимуса крупного рогатого скота.

Полученный экстракт после нейтрализации исследовали методом гель-хроматографии для оценки молекулярно-массового распределения компонентов.

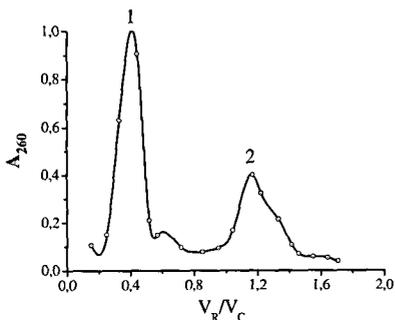


Рис. 2. Гель-хроматограмма экстракта тимуса в 1% растворе соды: (1) – высокомолекулярная фракция, содержащая ДНК и высокомолекулярные белки; (2) – низкомолекулярная фракция, содержащая олигонуклеотиды и пептиды тимуса. По оси абсцисс ($V_R \cdot V_C^{-1}$) – отношение объема элюента, вышедшего из колонки к моменту появления пика вещества (V_R), к объему сорбента (V_C).

На рисунке 2 представлена полученная гель-хроматограмма, которая свидетельствует о присутствии в экстракте как высокомолекулярной группы компонентов с молекулярной массой больше 50 кДа, так и низкомолекулярной группы компонентов с молекулярной массой менее 3 кДа, содержащей пептиды, дающие положительную реакцию на нингидрин.

Дальнейшее фракционирование полученного раствора осуществляли на микрофльтрационной установке (этап 2). Для этого нейтрализованный экстракт прокачивали через мембранный модуль в режиме рециркуляции (этап 2). Микрофльтрацию проводили со скоростью прокачивания 12 л·ч⁻¹. Молекулярные массы компонентов концентрата и фильтрата оценивали с помощью гель-хроматографии.

На рисунке 3 представлены гель-хроматограммы полученных концентрата (а) и фильтрата (б). Гель-хроматограмма (а) показывает, что в концентрате содержатся высокомолекулярные ДНК с молекулярной массой значительно выше 50 кДа, а низкомолекулярные компоненты отсутствуют. В то же время, в фильтрате (б) высокомолекулярные компоненты отсутствуют, а обнаруживаются только олигонуклеотиды и низкомолекулярные пептиды со средней молекулярной массой $3 \pm 0,5$ кДа. Таким образом, при микрофльтрации было достигнуто удаление высокомолекулярных компонентов из раствора, содержащего низкомолекулярные пептиды.

Фильтрат, полученный методом тангенциальной микрофльтрации экстракта, использовали для выделения пептидной фракции методом твердофазной экстракции пептидов на сильнокислотном катионите КУ-2Х8 в водородной форме, на которой олигонуклеотиды не сорбируются (этап 3).

Коэффициент распределения пептидов между раствором и сорбентом определили по изотерме сорбции пептидов на КУ-2Х8; он равнялся 27,2. Это позволяет использовать сорбент не только для отделения олигонуклеотидов, но и для концентрирования пептидов в экстракте, в фазе сорбента.

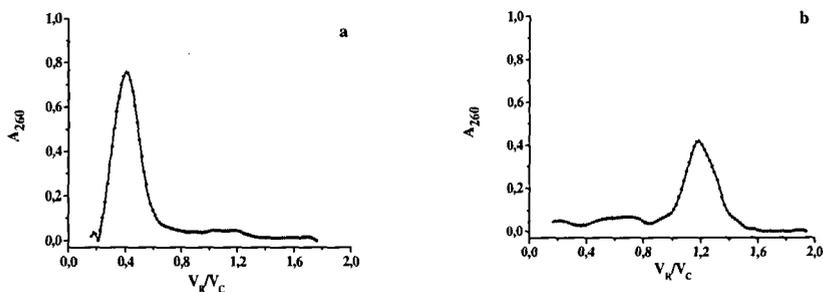


Рис. 3. Гель-хроматограммы растворов, полученных после тангенциальной микрофльтрации экстракта: (а)- концентрат; (б) – фильтрат экстракта из тимуса.

Для десорбции пептидов использовали режим вытеснительной ионообменной хроматографии низкого давления (этап 4) [Селеменев В.Ф. и др., 2003]. Десорбцию пептидов осуществляли 0,5М раствором аммиака. На выходе из колонки измеряли рН, оптическую плотность при длинах волн 260 и 280 нм. Выходные кривые значений рН и оптической плотности раствора при длине волны 260 нм представлены на рисунке 4.

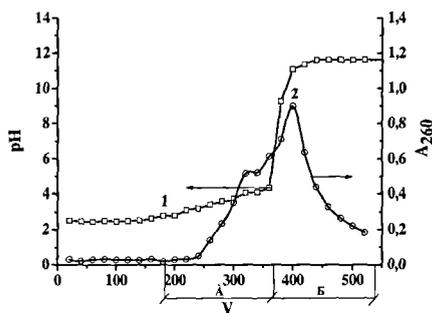


Рис. 4. Выходная кривая десорбции пептидов с катионита КУ-2Х8 (А); (1) - значение рН на выходе из экстрактора, (2) – оптическая плотность раствора при длине волны 260 нм, V – суммарный объем раствора-вытеснителя (мл).

На рисунке 4 представлен график десорбции низкомолекулярных пептидов тимуса при ступенчатом изменении рН на выходе из колонки, что позволило разделить их пептиды тимуса на кислую (А) и щелочную (Б) фракции. Сконцентрированный пик пептидов десорбировался в области значений рН 10,1-10,4. Фракции с объемом выхода от 200 до 400 мл десорбируются при значениях рН 3 – 6,5 и обозначены как пептидный препарат А, а фракции с объемом выхода от 400 до 600 мл десорбирующихся при значениях рН 10,1-10,4 – пептидный препарат Б. Оценка биологической активности этих фракций представлена в соответствующем разделе.

Сравнительная характеристика пептидных препаратов, полученных из тимуса разными методами

Для сравнения пептидного препарата, полученного из щелочного экстракта тимуса разработанным нами методом, и Тималина, полученного методом уксуснокислой экстракции с последующим осаждением пептидных фракций ацетоном, использовали методы гельхроматографии и тонкослойной хроматографии. Сравнение гельхроматограмм пептидного препарата тимуса (а) и Тималина (б) на рисунке 5 указывает на близость по величине молекулярных масс пептидов, входящих в их состав. Однако в препарате Тималина существует пик при 260 нм, соответствующий азотсодержащим компонентам (нуклеотидам), тогда как в пептидах, полученных из щелочного экстракта тимуса, этот пик едва различим.

Высокое значение оптической плотности при длине волны 570 нм в гельхроматограмме Тималина определяется присутствием в препарате глицина в качестве стабилизатора.

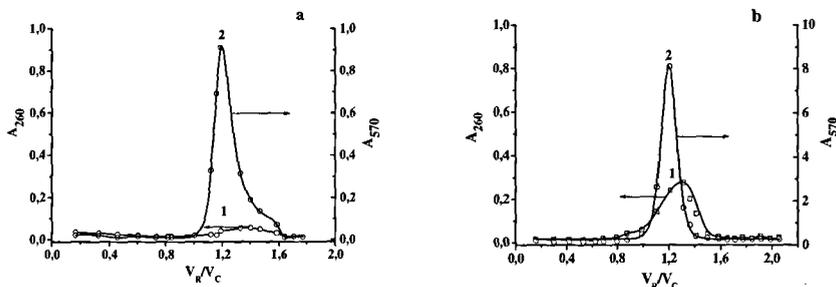


Рис. 5. Гель-хроматограммы пептидного препарата тимуса (а) и Тималина (б). Оптическая плотность растворов при длине волны 570 нм при окраске нингидрином соответствует концентрации пептидов при калибровке метода по лейцину.

Компонентный состав полученного пептидного препарата сравнивали с составом Тималина методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. В качестве стандартов сравнения использовали α -аминокислоты (протеиногенные), участвующие в биосинтезе белка и синтетический дипептид Вилон (Lys-Glu). Пробы аминокислот и дипептида Вилон объёмом 0,5 мкл и концентрацией $5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ наносили на пластину с помощью микрошприца.

На рисунке 6 представлена тонкослойная хроматограмма этих препаратов. Сравнение 5-ой и 6-ой дорожек показывает, что в препарате Тималина проявляется наиболее близкое к старту пятно, которое отсутствует в пептидах из щелочного экстракта тимуса и, возможно, соответствует дипептиду Вилон.

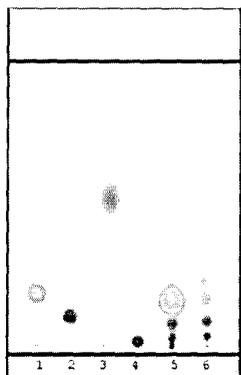


Рис. 6. Тонкослойная хроматограмма аминокислот и пептидов: 1-Gly; 2- Glu; 3- Leu; 4- дипептид Вилон (Lys – Glu); 5 – препарат Тималин; 6 – пептидный препарат тимуса. Подвижная фаза: изопропанол-этилацетат-25%-ый водный аммиак-вода (30:10:3,5:10, v/v); фронт элюента - 6 см, время разделения 50 мин.

Известно, что коммерческий лекарственный препарат Тималин, содержит в каждой ампуле, кроме пептидов, 20 мг глицина в качестве стабилизатора. Избыточное пятно на дорожке Тималина соответствует глицину. Таким образом, компонентный состав пептидов тимуса, полученного разработанным нами методом и геропротекторного препарата Тималин, полученного методом уксуснокислой экстракции и осаждения ацетоном методом с использованием органических растворителей, идентичен.

Препаративная рехроматография пептидов тимуса

Фракционирование пептидов тимуса, полученным при твердофазной экстракции, проводили с помощью ионообменной хроматографии на сульфокатионите КУ-2Х8 в Na-форме при элюции цитратным буфером при pH = 4,25. На рисунке 7 представлена выходная кривая фракционирования пептидного препарата тимуса.

Как видно из рисунка, фракция № 1 (дорожка 1) содержит только один пептид, тогда как другие фракции после ионообменной хроматографии (дорожки 2, 3 и 4) содержат по три и два компонента.

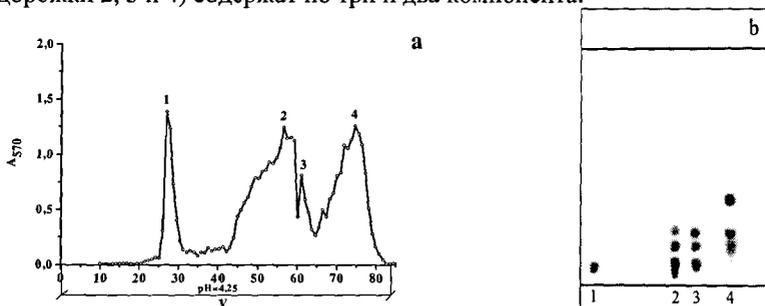


Рис. 7. Фракционирование пептидного препарата тимуса на КУ-2Х8 (а). Элюирование проводили 0,2М буферным раствором цитрата натрия, pH=4,25 со скоростью 1 л мл⁻¹·см⁻² при температуре 32°С. V – суммарный объем элюирующего раствора, (мл). Тонкослойная ВЭТСХ - хроматография пептидной композиции тимуса после десорбции с катионита КУ-2Х8 (b): 1- фр. №1; 2 – фр. №2; 3 – фр. №3; 4 – фр. №4.

Первый пептидный пик после выхода с колонки КУ-2Х8 рехроматографировали на колонке с сульфокатионитом Dowex 50WX8. Результат, представленный на рисунке 8, подтверждает гомогенность полученного пептида.

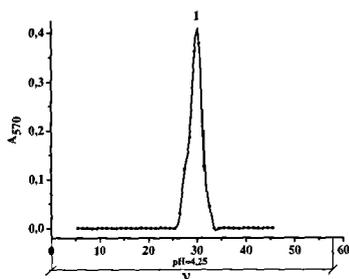


Рис. 8. Рехроматография фракции №1 пептидного препарата тимуса на сульфокатионите Dowex 50WX8 при температуре 32⁰С на колонке 1,1x36 см. Элюирование проводили со скоростью 11 мл·ч⁻¹·см² буферным раствором цитрата натрия с ионной силой по иону Na - 0,2М, рН=4,25. V – суммарный объем элюата (мл).

Индивидуальный пептид, полученный после рехроматографии на Dowex 50WX8, подвергали гидролизу при температуре 110⁰С в 6 н растворе HCl без доступа кислорода в течение 24 часов. Затем избыток HCl удаляли вакуум - выпариванием. Гидролизат пептида растворяли и исследовали его аминокислотный состав с помощью ВЭТСХ. На рисунке 9 представлена тонкослойная хроматограмма аминокислот, гомогенного пептида и его гидролизата.

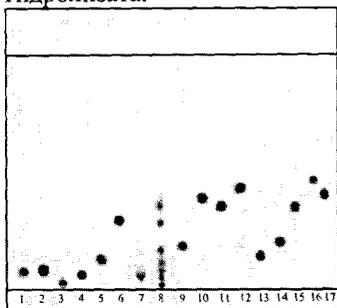


Рис. 9. Тонкослойная хроматограмма аминокислот, индивидуального пептида тимуса и его гидролизата: 1 – Asp; 2 – Glu; 3 – Lys; 4 – Arg; 5 – Gly; 6 – Val; 7 -фр.№1- индивидуальный пептид тимуса; 8- гидролизованный препарат индивидуального пептида; 9 –Ala; 10 – Leu; 11 – Met; 12 –Trp; 13 –Ser; 14 –Thr; 15-Tyr; 16- Phe; 17- Ile.

В полученном гидролизате присутствуют семь пятен, соответствующие 7 аминокислотам, входящим в состав пептида, и могут быть охарактеризованы по величине их R_f как Asp (дорожка 1); Glu (дорожка 2); Lys, (дорожка 3); Gly,(дорожка 5); Val (дорожка 6); Ala (дорожка 9); Leu (дорожка 10).

Выделение и очистка пептидов из мозга крупного рогатого скота

Выделение пептидов из коры головного мозга крупного рогатого скота было проведено по ранее разработанному методу, этапы которого представлены на рис. 1. Этапы экстракции, тангенциальной микрофилтрации и твёрдофазной экстракции были проведены в тех же режимах, которые были использованы при выделении пептидов из тимуса. После твёрдофазной экстракции целевые пептиды мозга были

десорбированы 0,5М водным раствором аммиака. На рис. 10 представлена выходная кривая десорбции пептидов мозга.

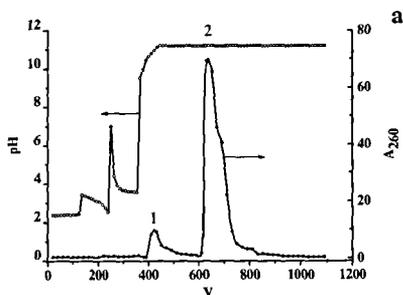


Рис. 10. Выходная кривая десорбции пептидов мозга с катионита КУ-2Х8. Оптическая плотность элюата при 260 нм (1) и значения рН на выходе из колонки (2) при 260 нм. V – суммарный объем элюата, (мл).

После завершения десорбции все фракции с высоким содержанием α -аминого азота объединяли и высушивали. Средний выход препарата (в пересчете на замороженную ткань) составил 1,5%.

Основные свойства пептидов мозга крупного рогатого скота

Методом гель хроматографии в полученном высокоочищенном пептидном препарате мозга определили молекулярно-массовое (ММ) распределение компонентов. На рисунке 11 представлен полученный график гель-хроматографии при измерении оптической плотности при 260 нм (нуклеотиды) и определяли содержание α -аминого азота по интенсивности окраски проб нингидрином при длине волны 570 нм.

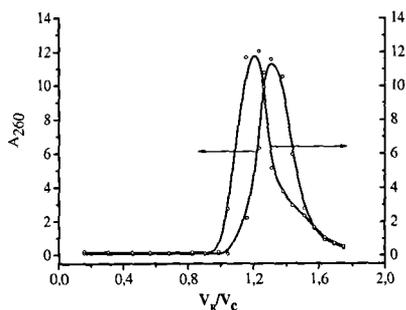


Рис. 11. Гель-хроматография пептидного препарата мозга крупного рогатого скота. По оси абсцисс (V_R/V_C^{-1}) - отношение объема элюата, вышедшего из колонки к моменту появления пика вещества (V_R), к объему сорбента (V_C)

Гель-хроматограмма, представленная на рисунке 11, свидетельствует о том, что в препарате отсутствуют компоненты с молекулярными массами более 2,5 кДа. Пик оптической плотности при длине волны 260 нм свидетельствует о присутствии в препарате, кроме пептидов, низкомолекулярных нуклеотидов. Молекулярные размеры этих компонентов относятся к диапазону молекулярных масс 150 - 2500 Да.

Для стандартизации компонентного состава пептидного препарата мозга по сравнению индивидуальными аминокислотами и с коммерческими препаратами Церебролизином и Кортексином [Gonzalez M.E.et. all., 1998]

использовали метод тонкослойной хроматографии. На рисунке 12 представлена полученная хроматограмма.

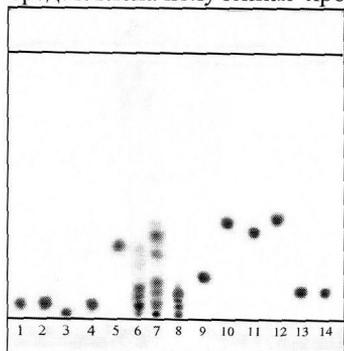


Рис. 12. Тонкослойная хроматография пептидного препарата мозга по сравнению с коммерческими препаратами Церебролизином и Кортексином. 1 – Asp; 2 – Glu; 3 – Lys; 4 – Arg; 5 – Val; 6 – пептидный препарат мозга; 7 – препарат Церебролизин; 8 – препарат Кортексин 9-Ala; 10 – Leu; 11 – Met; 12 – Trp; 13 – Ser; 14 – Gly.

Церебролизин имеет наибольшее количество низкомолекулярных компонентов, включая, по-видимому, свободные аминокислоты. Следует отметить, что Кортексин, полученный методом уксуснокислой экстракции и осаждения ацетоном и пептидный препарат мозга, выделенный по предлагаемому нами методу, имеют одинаковый компонентный состав.

Ионообменная хроматография пептидного препарата мозга крупного рогатого скота

Для более тонкого разделения компонентов пептидного препарата мозга использовали ионообменную хроматографию с использованием сорбента DOWEX 50WX8. Хроматографию проводили цитратными буферными растворами при ступенчатом изменении pH от 4,25 до 12,0 при постоянной температуре 32°C с помощью хроматографической системы низкого давления BioRad BioLogic LP

Результаты фракционирования пептидного препарата мозга приведены на рисунке 13.

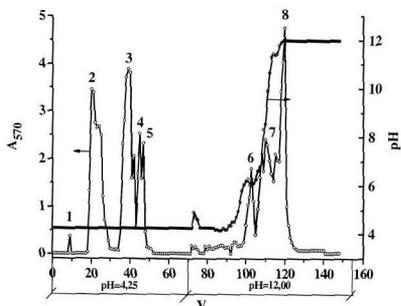


Рис.13. Фракционирование пептидного препарата мозга крупного рогатого скота при температуре 32°C на колонке 1,1x36 см. Элюирование проводили со скоростью 10 мл·ч⁻¹·см⁻² буферным раствором цитрата натрия с ионной силой по натрию 0,2М при pH=4,25 и pH= 12,00. V – суммарный объем элюирующего цитратного буфера, (мл).

Как видно из рисунка 13, сначала элюируются пептиды кислой природы, затем пептиды с гидрофобными и щелочными свойствами. Полученные фракции после ионообменной хроматографии объединяли в зависимости от значений pH на выходе из колонки.

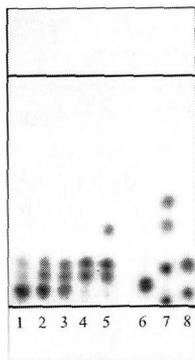


Рис. 14. Тонкослойная хроматография фракций пептидного препарата мозга после ионообменной хроматографии: 1 – фр. №1, 2 – фр. №2, 3 – фр. №3, 4 – фр. №4, 5 – фр. №5, 6 – фр. №6; 7- фр. №7; 8- фр. №8.

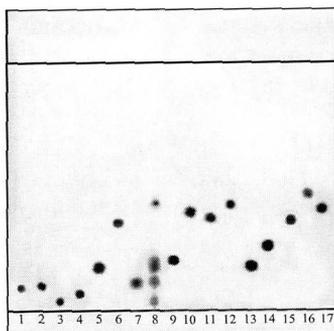


Рис. 15. Тонкослойная хроматограмма аминокислот и гидролизата индивидуального пептида мозга крупного рогатого скота после ионообменной хроматографии на катионите Dowex 50WX8: 1 – Asp; 2 – Glu; 3 – Lys; 4 – Arg; 5 – Gly; 6-Val; 7 – фр. №6 индивидуальный пептид мозга, 8 – гидролизованный индивидуальный пептид; 9 – Ala; 10 – Leu; 11 – Met; 12 – Trp; 13 – Ser; 14 – Thr; 15- Tyr; 16- Phe; 17- Ile.

Полученные пики (пронумерованы на рисунке 13) исследовали с помощью метода тонкослойной хроматографии. На рисунке 14 представлена тонкослойная хроматография исследованных фракций.

Как видно из рисунка 14, большинство полученных пептидных фракций мозга содержат по два или три пептида, то есть, многокомпонентны. Только фракция № 6 имеет в своём составе один пептидный компонент. Эта фракция была высушена, и сухой препарат гомогенного пептида был использован для кислотного гидролиза. На рисунке 15 представлена полученная тонкослойная хроматография индивидуального пептида мозга до и после гидролиза. В качестве стандартов сравнения использовали маркерные аминокислоты.

Тонкослойная хроматограмма гидролизата показывает, что в состав индивидуального пептида мозга входят 4 аминокислотных остатка. Аминокислотный состав пептида установили, сравнивая позицию пятен в хроматограмме гидролизата со значениями коэффициентов подвижности R_f маркерных аминокислот.

Результат исследования показал, что в состав гомогенного пептида мозга входят аминокислоты: Glu (дорожка 2); Lys (дорожка 3); Ala (дорожка 9); Ile (дорожка 12). Таким образом молекулярная масса, выделенного пептида Тимуса составила 730,8 Да, а для пептида мозга 460 Да. Значение изоэлектрической точки равной $pI=4,08$ для пептида тимуса, а для пептида мозга $pI=6,6$.

Тканеспецифическая активность индивидуальных пептидов и пептидных препаратов тимуса и мозга крупного рогатого скота

Тканеспецифическую активность индивидуальных пептидов тимуса и мозга, выделенных методом ионообменной хроматографией, по сравнению с пептидными препаратами мозга и тимуса, полученных методами тангенциальной микрофильтрации и твердофазной экстракции, оценивали по стимуляции роста эксплантатов тимуса и мозга. В экспериментах определяли эффективную концентрацию индивидуального пептида и пептидного препарата, выделенного из тимуса и мозга, при которой достигается наибольший эффект в отношении стимуляции роста эксплантатов тимуса и мозга.

Индивидуальные пептиды и пептидные препараты мозга и тимуса в концентрациях от 0,05 до 100 нг·мл⁻¹ вводили в питательную среду чашек Петри, в которых развивались эксплантаты мозга и тимуса молодых крыс.

Результаты исследования показали, что в эксплантатах мозга и тимуса, индивидуальные пептиды и пептидные препараты обладают эффективной стимулирующей активностью при концентрации 20 нг·мл⁻¹, при которой увеличение индекса площади (ИП) было статистически достоверным. В таблице 1 представлены результаты определения активности индивидуального пептида и пептидных препаратов, выделенных из тимуса при различных концентрациях.

Таблица 1

Влияние концентраций индивидуального пептида и пептидного препарата тимуса на рост эксплантатов тимуса молодых крыс

Изменения индекса площади (ИП) эксплантатов, %	Концентрация пептидов, нг·мл ⁻¹		
	0,05	20	100
индивидуальный пептид тимуса	+4,72*	+26*	+1,87*
пептидный препарат тимуса	+13,04*	+17,30*	+1,64*

*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем

При инкубации с эксплантатами ткани тимуса пептиды в концентрации 20 нг·мл⁻¹ оказывали стимулирующее действие по сравнению с контролем. Инкубация с пептидным препаратом тимуса в концентрации 20 нг·мл⁻¹ приводило к росту индекса зоны эксплантатов на 17,3%, а с индивидуальным пептидом тимуса в концентрации 20 нг·мл⁻¹ на 26 %, соответственно.

Таким образом, очевидно, что с повышением концентрации пептидов уменьшается их стимулирующая эффективность по отношению к эксплантатам тимуса взрослых крыс.

Биологическую активность индивидуального пептида, выделенного методом ионообменной хроматографией и пептидного препарата мозга,

оценивали по стимуляции роста эксплантата в органотипической культуре ткани мозга молодых крыс линии «Вистар».

В таблице 2 представлены результаты измерения зоны роста эксплантатов. В качестве стандартов сравнения использовали коммерческие геропротекторные препараты, выделенные из мозга разными методами: методом ферментативного гидролиза мозга Церебролизин (Ebewe Pharma, Австрия) и методом уксуснокислой экстракции с последующим осаждением ацетоном Кортексин (ООО «Герофарм», Россия).

Таблица 2

Сравнительное изучение активности индивидуального пептида и пептидных препаратов мозга на рост периферической зоны эксплантатов мозга молодых крыс

№№ пп.	Ткань	Изменение ИП (% по отношению к контролю)			
		индивидуальный пептид мозга	пептидный препарат мозга	препарат Церебролизин	препарат Кортексин
1	мозг	+29*	+16*	+20*	+23*

*- $p < 0,05$ по сравнению с контролем

При инкубации с эксплантатами ткани мозга пептиды в концентрации 20 нг·мл⁻¹ оказывали стимулирующее действие по сравнению с контролем. Инкубация с пептидным препаратом мозга в концентрации 20 нг·мл⁻¹ приводило к росту индекса зоны эксплантатов на 16%, а с индивидуальным пептидом мозга в концентрации 20 нг·мл⁻¹ на 29%.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что индивидуальный пептид, выделенный методом ионообменной хроматографией из пептидного препарата мозга, обладают наиболее

Таблица 3

Тканеспецифическое действие пептидов тимуса и мозга в органотипической культуре различных тканей крыс

№№ пп.	Культура ткани	пептиды	
		тимуса	мозга
1.	Хрящи	-	-
2.	Тимус	+	-
3.	Головной мозг	-	+
4.	Эпифиз	-	-
5.	Сердце	-	-
6.	Поджелудочная железа	-	-
7.	Щитовидная железа	-	-
8.	Простата	-	-
9.	Семенники	-	-
10.	Почки	-	-
11.	Мочевой пузырь	-	-
12.	Сосуды	-	-
13.	Яичники	-	-
14.	Печень	-	-
15.	Селезенка	-	-

выраженным тканеспецифическим и стимулирующим действием на ткани мозга молодых крыс по сравнению с коммерческими препаратами мозга (Церебролизин, Кортексин).

В следующих сериях опытов исследовали тканеспецифическую активность пептидов, выделенных из тимуса и мозга в культурах различных тканей крыс. В таблице 3 представлены основные результаты определения тканеспецифической активности пептидов тимуса и мозга по отношению к другим тканям крыс.

Полученные результаты свидетельствуют о тканеспецифическом действии пептидов из тимуса и мозга молодых животных, при стимуляции пролиферации клеток тех тканей животных, из которых они были выделены.

Геропротекторная активность индивидуальных пептидов, выделенных из пептидных препаратов тимуса и мозга

Геропротекторную активность индивидуальных пептидов, выделенных из пептидных препаратов тимуса и мозга методом ионообменной хроматографии, исследовали в культуре эксплантатов тимуса и мозга и молодых и старых крыс. Исследуемые индивидуальные пептиды, выделенные из пептидных препаратов тимуса и мозга, использовали в их эффективной концентрации- 20 нг·мл⁻¹. В таблице 5 представлены результаты исследования геропротекторной активности индивидуальных пептидов тимуса и мозга.

Таблица 5

Геропротекторное действие индивидуальных пептидов, выделенных из пептидных препаратов тимуса и мозга в органотипической культуре тканей молодых и старых крыс

Ткань	Индивидуальный пептид	Изменение ИП (% по отношению к контролю)	
		Молодые крысы	Старые крысы
Тимус	тимуса	26±1,4*	21±1,0*
Мозг	мозга	29±2,1*	24±2,3*

* p<0,05 по сравнению с контролем

При инкубации эксплантатов тканей тимуса и мозга молодых и старых крыс индивидуальные пептиды, выделенные из пептидных препаратов тимуса и мозга в концентрации 20 нг·мл⁻¹ оказывали стимулирующее действие по сравнению с контролем. Культивирование с индивидуальным пептидом тимуса увеличивало индекс зоны эксплантатов тимуса молодых крыс на 26%, а старых крыс на 21%. Культивирование с индивидуальным пептидом из мозга увеличивало индекс зоны эксплантатов мозга молодых крыс на 29%, а у старых крыс на 24%.

Проведенные в данной работе исследования активности индивидуальных пептидов, выделенных из пептидных препаратов тимуса и мозга, показали, что уже в малых дозах они в сравнимой степени стимулируют процессы восстановления в тканях тимуса и мозга у молодых и старых крыс. Это свидетельствует об их геропротекторной активности.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ выделения высокоочищенных пептидных препаратов из животного сырья без использования органических растворителей, включающий следующие стадии: тангенциальную микрофильтрацию экстракта ткани на трековых мембранах, твердофазную экстракцию пептидов с использованием катионообменного сорбента.
2. Выделение индивидуального пептида из тимуса проводили методом препаративной ионообменной хроматографии низкого давления на катионите КУ-2Х8. Градиент рН для фракционирования пептидов тимуса занимал диапазон от 4,25 до 12,0 при ионной силе 0,2 моль·л⁻¹. Высокоочищенные пептидные композиции, выделенные из тимуса экстракцией органическими растворителями (Тималин) и методом тангенциальной микрофильтрации и твердофазной экстракции (пептидный препарат тимуса), содержат одно и то же количество пептидов. При этом в Тималине содержится большее количество олигонуклеотидов, чем в препарате, полученном из тимуса.
3. Выделение индивидуального пептида из мозга проводили методом препаративной ионообменной хроматографии низкого давления на катионите DOWEX 50WX8. Градиент рН для выделения гомогенного пептида мозга располагался в диапазоне от 4,25 до 12,0 при ионной силе 0,2 моль·л⁻¹. Высокоочищенные пептидные композиции, выделенные из мозга экстракцией органическими растворителями (Кортексин) и методом тангенциальной микрофильтрации и твердофазной экстракции (пептиды мозга), содержат одно и то же количество пептидов.
4. В состав индивидуального пептида, выделенного из тимуса, входят 7 аминокислот: Glu, Lys, Asp, Gly, Val, Ala, Leu, а в состав пептида мозга – 4 аминокислоты Glu, Lys, Ala, Ile. Молекулярная масса пептида, выделенного из тимуса, составляет 730,8 Да, а пептида, выделенного из мозга - 459,5 Да. Изоэлектрическая точка для пептида, выделенного из тимуса составляет 4,04, из коры головного мозга – 6,6.
5. Пептиды, выделенные предлагаемым методом, проявляют тканеспецифическое действие в органотипических культурах: индекс зоны роста эксплантатов тимуса и головного мозга крыс увеличивался на 26% и 29%, соответственно. Пептиды не оказывали стимулирующего действия на эксплантаты других тканей крыс.
6. Пептиды тимуса и коры головного мозга крупного рогатого скота, оказывали геропротекторное действие в органотипических культурах

тимуса и головного мозга молодых и старых крыс. Индексы площади зоны роста эксплантатов тимуса и мозга молодых животных увеличивались на 26% и 29%, а эксплантатов тимуса и головного мозга старых животных – на 21% и 24 %, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный способ выделения высокоочищенных индивидуальных пептидов из животного сырья без использования органических растворителей подходит для технологического масштабирования в производстве пептидных препаратов.
2. Выявленное тканеспецифическое и геропротекторное действие пептидов, выделенных из тимуса и коры головного мозга, при действии на эксплантаты тимуса и мозга, является основой для дальнейшего изучения пептидных препаратов в качестве лекарственных средств, предназначенных для профилактики и лечения патологических состояний, в том числе при болезнях, ассоциированных с возрастом.
3. Полученные результаты могут быть рекомендованы к использованию в качестве учебных материалов при подготовке врачей-гериатров при составлении методических инструкций и указаний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК

Министерства образования и науки Российской Федерации

1. Выделение регуляторных пептидов из тимусаминна – нуклеопротеинового комплекса тимуса/А.Ю. Соловьев, Д.В. Жилинский, И.А. Чернова, Б.Я. Басин, Л.К. Шатаева, В.Х. Хавинсон // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т.11, №6. – С.760-768.
2. Фракционирование жесткоцепных полимеров при микрофльтрации/ А.Ю. Соловьев, Д.В. Жилинский, И.А. Чернова, Б.Я. Басин, Л.К. Шатаева // Мембраны. – 2009. – №4(44). – С. 22-26.
3. Хроматографическое разделение и очистка низкомолекулярных пептидных комплексов из икры морских ежей/П.Ю. Морозова, Д.В.Жилинский, А.Ю. Морозова, А.А. Колобов, А.Ю. Соловьев// Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т.11, №6. – С.785-791.
4. Эпигенетические аспекты пептидной регуляции старения/ В.Х. Хавинсон, А.Ю. Соловьев, Д.В. Жилинский, Л.К. Шатаева, Б.Ф. Ванюшин // Успехи геронтологии. – 2012. – Т.25, №1. – С. 11-16.

Статьи в сборниках

5. *Жилинский Д.В.* Разработка технологии выделения и очистки биологически активных пептидов из нуклеопротеинового комплекса тимусамина. “У.М.Н.И.К.” в Санкт-Петербурге. Разработки победителей конкурса программы Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере “У.М.Н.И.К.”. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010.– С. 110-113.

Тезисы докладов

6. *Жилинский Д.В.* Влияние кислотно-основных характеристик регуляторных пептидов на их фракционирование при ионообменной хроматографии на сульфокатионите/Д.В. Жилинский, П.Ю. Морозова, А.Ю.Соловьев // Тез. докл. 6-ой Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах», Санкт-Петербург, 2010. – С. 117.
7. *Жилинский Д.В.* Геропротекторные пептиды, выделенные из тимуса и мозга крупного рогатого скота//Д.В. Жилинский, А.Ю. Соловьев//Матер. 5-ой юбилейной международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения -2012». – 6-10 февраля 2012 г., БелГУ, Белгород. – Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. – 2012. – Т. 3, № 1-2. – С. 20-21.
8. *Жилинский Д.В.* Использование сульфостирольного катионита при выделении биологически активных пептидов из мозга крупного рогатого скота/Д.В. Жилинский, А. Ю. Соловьев// Тез. докл. 7-ой Санкт-Петербургской конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах», Санкт-Петербург. – 2011. – С. 92.
9. *Соловьев А.Ю.* Эндогенные пептиды нуклеопротеинового комплекса из тимуса телят/А.Ю. Соловьев, Д.В. Жилинский, В.Х. Хавинсон//Тез. докл. 4-го Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань. – 2009. – С.138.
10. Separation of polydisperse solution by cross-flow microfiltration/A.Yu. Solovyev, I. A. Chernova, D.V. Zhilinski, L. K. Shataeva // In book of abstracts 6th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”, St Petersburg, 2008, P.174.
11. *Zhilinski D.V.* Purification of regulatory peptides from nucleoprotein complex/ D.V. Zhilinski, P.Yu. Morozova, A.Yu. Solovyev // In book of abstracts 5th Saint-Petersburg Young Scientists Conference “Modern problems of polymer science” , St Petersburg. – 2009. – P. 84.
12. *Zhilinski D.V., Solovyev A.Yu.* Purification and characterization of regulatory peptides from native nucleoprotein complexes/ D.V. Zhilinski, A.Yu. Solovyev// In book of abstracts 7th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems”, St Petersburg , 2011, P.132.

Семинар

13. *Жилинский Д.В.* Фракционирование жесткоцепных полимеров при микрофльтрации на трековых мембранах / *Д.В. Жилинский* // Научный семинар “Хроматография, ионный обмен, альтернативные методы”, Санкт-Петербург, 2009.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ИП – индекс площади

ТФЭ – твердофазная экстракция

УФ – ультрафиолетовый

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РПИ – роторно-пленочный испаритель

ФТ – факторы транскрипции

ОП – оптическая плотность

ЖИЛИНСКИЙ Дмитрий Владимирович МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ГЕРОПРОТЕКТОРНЫХ ПЕПТИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТИМУСА И МОЗГА
ЖИВОТНЫХ // Автореф. дис. канд. биол. наук: 14.01.30. –СПб., 2012. – 24 с.

Подписано в печать «21» февраля 2012 г. Формат 60x84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ 53.

Отпечатано с готового оригинал-макета.

ЗАО «Принт-Экспресс»

197101, С.-Петербург, ул. Большая Монетная, 5 лит. А.