

Современные подходы к выделению и очистке активных биологических субстанций из органов северного оленя

Л.И. Карavaева¹, Н.В. Котова¹, Н.В. Глазова¹,
Н.Д. Бунятян², В.А. Евтеев², А.Б. Прокофьев²

¹Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет,
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14;

²ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Карavaева Лолита Игоревна – аспирант кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета. Тел.: +7 (918) 533-74-35. E-mail: lolita.karavaeva@spsru.ru. ORCID: 0000-0001-8960-4617

Котова Наталия Владимировна – доцент кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета, кандидат химических наук. Тел.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: Natalia.kotova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0001-5483-6717

Глазова Наталья Владимировна – доцент кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета, кандидат химических наук. Тел.: +7 (981) 181-72-46. E-mail: Natalia.glazova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0003-3242-3051

Бунятян Наталья Дмитриевна – главный аналитик Центра клинической фармакологии ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: Bunyatyan@exrmed.ru. ORCID: 0000-0003-0936-5551

Евтеев Владимир Александрович – старший аналитик Центра клинической фармакологии ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России. Тел.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: Evteev@exrmed.ru. ORCID: 0000-0002-6150-5796

Прокофьев Алексей Борисович – директор Центра клинической фармакологии ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России. Тел.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: Prokofiev@exrmed.ru. ORCID: 0000-0001-7024-5546

РЕЗЮМЕ

Введение. По оценкам ведущих экспертов считается, что лекарства будущего – это вещества природного происхождения. С глубокой древности для приготовления ряда лекарств использовалось сырье животного происхождения и прежде всего северных оленей (СО). Сырье СО содержит более 80 жизненно важных для организма веществ: аминокислоты, гормоны, пептиды, различные минеральные вещества. Биологически активные вещества (БАВ), содержащиеся в органах и тканях СО, участвуют в восстановлении энергетического баланса, повышают иммунитет, замедляют процессы старения в организме, нормализуют обмен веществ. Исследования возможности производства активных биотехнологических субстанций (АБТС) из эндокринно-ферментного сырья СО являются весьма актуальными.

Таким образом, была проведена экстракция из органов СО (околоушная, предстательная, поджелудочная железы, сычуг, семенники, гипофиз и стекловидное тело). Методами гель-фильтрации и гель-электрофореза в полиакриламидном геле изучен белково-пептидный компонентный состав полученных экстрактов; методом ВЭЖХ определен аминокислотный состав.

Цель: разработка методов выделения АБТС из органов СО.

Материал и методы. В работе использовали околоушную, предстательную, поджелудочную железы, сычуг, семенники, гипофиз и стекловидное тело СО. Определение ферментативной активности гиалуронидазы проводилось по ФС 42-2606-93. Определение компонентного состава осуществляли методами гель-хроматографии и гель-электрофореза. Определение аминокислотного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Результаты. Подобраны оптимальные условия проведения процесса экстракции БАВ из различных органов СО. Перспективными органами СО для получения АБТС являются поджелудочная железа и семенники.

Заключение. Подобраны оптимальные условия проведения процесса экстракции БАВ из различных органов СО и определен компонентный состав полученных экстрактов. Показана возможность получения АБТС из органов СО из которых наиболее перспективными являются поджелудочная железа – для разработки технологии пищеварительных ферментов и семенники – для получения незаменимых аминокислот.

Ключевые слова: северный олень, эндокринно-ферментное сырье, экстракция, гель-хроматография, гель-электрофорез, ВЭЖХ.

Для цитирования: Карavaева Л.И., Котова Н.В., Глазова Н.В., Бунятян Н.Д., Евтеев В.А., Прокофьев А.Б. Современные подходы к выделению и очистке активных биологических субстанций из органов северного оленя. Фармация, 2022; 71 (5): 33–37. <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-05-05>

MODERN APPROACHES TO THE ISOLATION AND PURIFICATION OF ACTIVE BIOLOGICAL SUBSTANCES (ABTS) FROM REINDEER ORGANS.

L.I. Karavaeva¹, N.V. Kotova¹, N.V. Glazova¹, N.D. Bunyatyan², V.A. Evteev², A.B. Prokofiev²

¹St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University, Professor Popov str., 14, Saint Petersburg, 197376, Russian Federation;

²Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow, 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Karavaeva Lolita Igorevna – Post-graduate student of the Department of Biotechnology, St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University. Tel.: +7 (918) 533-74-35. E-mail: lolita.karavaeva@spcpu.ru. ORCID: 0000-0001-8960-4617

Kotova Natalia Vladimirovna – Associate Professor, Department of Biotechnology, St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University, Candidate of Chemical Sciences. Tel.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: Natalia.kotova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0001-5483-6717

Glazova Natalya Vladimirovna – Associate Professor of the Department of Biotechnology of the St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University, Candidate of Chemical Sciences. Tel.: +7 (981) 181-72-46. E-mail: Natalia.glazova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0003-3242-3051

Bunyatyan Natalia Dmitrievna – Chief Analyst of the Center for Clinical Pharmacology of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: Bunyatyan@expmed.ru. ORCID: 0000-0003-0936-5551

Evteev Vladimir Aleksandrovich – Senior Analyst of the Center for Clinical Pharmacology of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation. Tel.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: Evteev@expmed.ru. ORCID: 0000-0002-6150-5796

Prokofiev Alexey Borisovich – Director of the Center for Clinical Pharmacology of the Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation. Tel.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: Prokofiev@expmed.ru. ORCID: 0000-0001-7024-5546

SUMMARY

Introduction. According to leading experts, it is believed that the medicines of the future are substances of natural origin. Since ancient times, raw materials of animal origin, primarily reindeer. Reindeer raw materials contain more than 80 vital substances in the body: amino acids, hormones, peptides, various minerals. Biologically active substances contained in the organs and tissues of reindeer participate in the restoration of energy balance, increase immunity, slow down the aging process in the body, and normalize metabolism. The study of the possibility of producing ABTS from reindeer endocrine-enzyme raw materials is very relevant.

Thus, extraction was carried out from the organs of the reindeer (parotid, prostate, pancreas, rennet, testicles, pituitary gland and vitreous body). The protein-peptide component composition of the obtained extracts was studied by the methods of gel filtration and gel electrophoresis in PAAG; HPLC determined the amino acid composition.

Objective: Development of methods for isolating active biotechnological substances (ABTS) from reindeer organs.

Material and methods. In the work we used – parotid, prostate, pancreas, abomasum, testes, pituitary gland and vitreous body from reindeer. The determination of the enzymatic activity of hyaluronidase was carried out according to PM 42-2606-93. The determination of the component composition was carried out by the methods of gel chromatography and gel electrophoresis. Determination of the amino acid composition was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC)

Results. Optimal conditions for carrying out the process of BAS extraction from various organs of CO have been selected. Promising organs of RM for obtaining ABTS are the pancreas and testicles.

Conclusion. Optimal conditions for carrying out the process of BAS extraction from various organs of SS have been selected and the component composition of the obtained extracts has been determined. The possibility of obtaining ABTS from the organs of CO, of which the most promising are: the pancreas for the development of the technology of digestive enzymes and the testes for the production of essential amino acids, has been shown.

Key words: reindeer, endocrine-enzyme raw materials, extraction, gel chromatography, gel electrophoresis, HPLC.

For reference: Karavaeva L.I., Kotova N.V., Glazova N.V., Bunyatyan N.D., Evteev V.A., Prokofiev A.B. Modern approaches to the isolation and purification of active biological substances from reindeer organs. *Farmatsiya*, 2022; 71 (5): 33–37. <https://doi.org/10/29296/25419218-2022-05-05>

Введение

Наибольшую долю среди выпускаемых активных биотехнологических субстанций (АБТС) занимают средства для системы пищеварения (22%) – это добавки, содержащие различные ферментные препараты.

В России официальной Фармакопеей страны зарегистрировано более 50 наименований органо-препаратов, производимых из 29 органов и тканей сельскохозяйственных животных. К таким традиционно используемым животным относятся крупный рогатый скот (КРС) и свинья. Помимо традиционного использования КРС и свиней, в качестве донора органов используется также и северный олень (СО). Это связано с тем, что поголовье домашних оленей на Ямале – самое боль-

шое в мире и насчитывает около 700 тыс. особей. Сырье СО содержит такие жизненно важные для организма человека группы биологически активных веществ (БАВ), как ферменты, аминокислоты, гормоны, пептиды, различные минеральные вещества и др. Эти БАВ, содержащиеся в органах и тканях СО, участвуют в восстановлении энергетического баланса, повышают иммунитет, замедляют процессы старения в организме, нормализуют обмен веществ и т.д.

В настоящее время номенклатура препаратов, выделенных из органов и тканей животных, разрешенных к медицинскому применению, составляет свыше 250 наименований. Поэтому исследования возможности производства АБТС из эндокринно-ферментного сырья СО является актуальными.

Цель исследования: разработка методов выделения БАТС из органов СО.

Материал и методы

В работе использовали околоушную, предстательную, поджелудочную железы, сычуг, семенники, гипофиз и стекловидное тело СО.

Концентрацию белка в растворе определяли по методу Лоури. Определение активности альфа-амилазы согласно ГОСТ 34440-2018 [1]. Для определения протеолитической активности использовали модифицированный метод Кунитца [2]. Определение ферментативной активности гиалуронидазы проводилось по ФС 42-2606-93. Гель-хроматографический метод использовали для определения компонентного состава экстрактов. В качестве молекулярно-ситового геля использовался сефадекс фирмы Sigma марки G-75. Для изучения компонентного состава проб был использован электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия по Лэммли [3].

Определение свободных аминокислот в пробах экстрактов околоушной железы и семенников проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (табл. 1). В работе был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф серии Prominence фирмы Shimadzu. Система сбора и обработки данных для жидкостного хроматографа: компьютер с программным обеспечением LabSolutions LC. Колонка Supelcosil C18 (250×4,6 мм, 5 мкм).

Результаты и обсуждение

Выделение БАВ из предварительно измельченного сырья (размер 5–8 мм) СО проводили экстрагированием различными растворителями в течение 1–4 ч при температуре 1–5°C. После чего отделяли жмых на лабораторной центрифуге Uni

SenMR Herolab при температуре +5°C и частоте вращения 11000 об/мин в течение 15 мин.

Для определения оптимальных условий проведения процесса экстракции из различных органов СО были проведены исследования зависимости концентрации белка от использования различных экстрагентов: уксусной кислоты (0,01 Н, 0,1 Н), серной кислоты (0,01 Н, 0,1 Н), изотонического раствора, очищенной воды и подкисленного ацетона (1% раствор HCl в 90% ацетоне), кроме того важными факторами для оптимальных условий является температура и pH. В табл. 2 представлены оптимальные условия проведения процесса экстракции БАВ из органов СО.

Анализ белкового состава полученных экстрактов проводили методами элютивной гель-хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле. Анализ экстрактов околоушной, предстательной и поджелудочной железы и гипофиза СО, проводили гель-хроматографическим методом. Гель-хроматограммы экстрактов органов СО представлены на рис. 1.

На рис. 1 (1) представлена гель-хроматограмма экстракта околоушной железы СО. Показано, что в экстракте присутствует белковый пик с молекулярной массой, около 50 кДа (проявляет амилолитическую активность) и более низкомолекулярные белки, не проявляющие ферментативную активность. Результаты гель-электрофореза подтверждены методом гель-электрофореза. Из гель-хроматограммы, представленной на рис. 1 (2) видно, что в экстракте присутствует 2 белковых пика с молекулярной массой в области 15 кДа, 2-й пик – <5 кДа. Поэтому можно предположить, что 1-й пик составляют белковые примеси, а целевой продукт адренокортикотропный гормон, кортикотропин (АКТГ) содержится во 2-м пике. Как видно из рис. 1 (3), на гель-хроматограмме предстательной железы прослеживается только 1 пик с размытым фронтом белков. Максимум пика ко-

Таблица 1

Результаты аминокислотного анализа проб

Table 1

Results of amino acid analysis of samples

Аминокислота	Результат, мг/мл	Аминокислота	Результат, мг/мл	Аминокислота	Результат, мг/мл	Аминокислота	Результат, мг/мл
Аспарагинин	0,104	Глицин	0,104	Пролин	0,094	Валин	0,076
Глутамин	0,083	Гистидин	0,101	Тирозин	0,090	Фенилаланин	0,112
Гидроксипролин	0,122	Аргинин	0,102	Изолейцин	0,156	Триптофан	0,119
Серин	0,095	Треонин	0,137	Лейцин	0,110	Лизин	0,086

того составляет по калибровочной кривой около 37 кДа. На рис. 1 (4) показано, что в экстракте поджелудочной железы присутствуют белки с молекулярной массой 29; 24; 16; 13 кДа. Проверка активности пиков показала, что в полученном экстракте присутствуют активные протеазы (1,

2-й пики – химотрипсин, трипсин), в небольших количествах, РНКаза (4-й пик), а так же предположительно, фрагменты ДНК-азы расщепленные активной протеазой (3-й пик).

Анализ экстракта семенников СО проводили методами гель-хроматографии и гель-электрофореза. Из литературных данных известно, что гиалуронидаза из семенников крупного рогатого скота является гликопротеином и обладает свойством полиморфизма [4]. Присутствует димер (120 кДа), растворимая форма гликозилированного белка гиалуронидазы (55–65 кДа), более низкомолекулярные белковые примеси.

Электрофореграмма экстрактов из семенников СО подтвердила сложный компонентный состав, который описан выше. На рис. 2 представлена электрофореграмма белков экстракта из семенников СО.

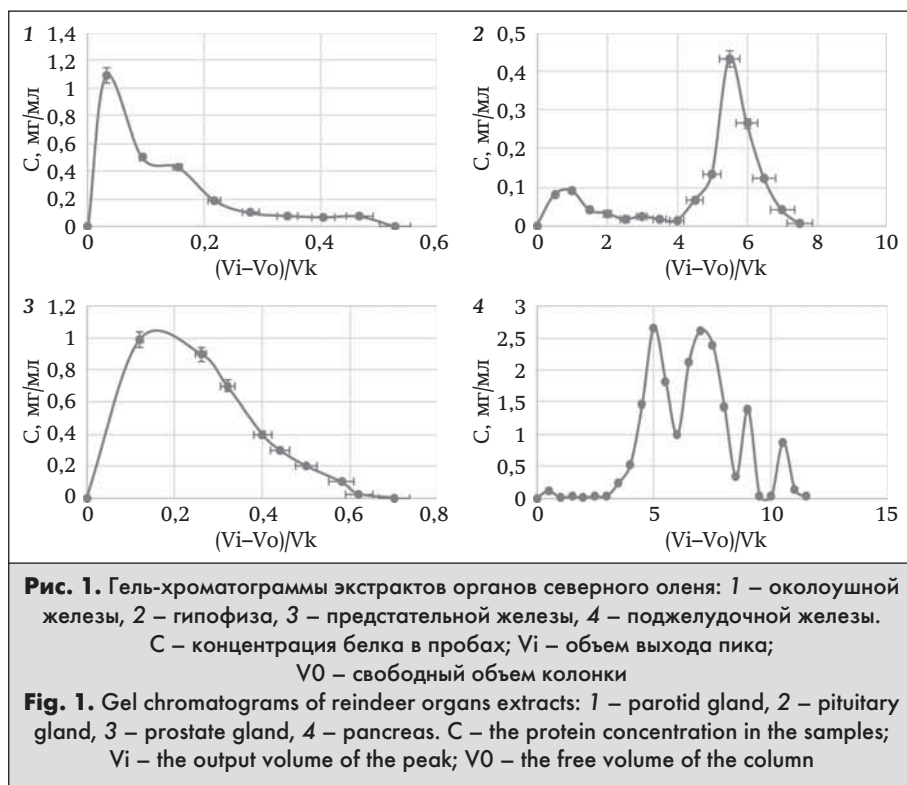
Для сравнения были использованы стандарты гиалуронидазы BRP Европейской Фармакопеи и гиалуронидазы Sigma.1 – стандарт гиалуронидазы BRP Европейской Фармакопеи; 2 – стандарт гиалуронидазы Sigma; 3 – экстракт гиалуронидазы из семенников СО. Маркеры компании Bio-Rad (справа указана молекулярная масса в кДа).

Как известно из литературных данных, в семенниках, околоушной железе, предстательной железе наиболее ценным целевым продуктом являются аминокислоты [5]. Для определения аминокислот предварительно во всех экстрактах осаждали белковые фракции сернокислым аммонием при различных степенях насыщения.

Таблица 2
Оптимальные условия проведения процесса экстракции биологически активных веществ из органов северного оленя

Table 2
Optimal conditions for the process of extraction of biologically active substances from the organs of a reindeer

Наименование органа	Условия проведения процесса экстракции			
	экстрагент	pH	температура, °C	время, ч
Поджелудочная железа	Раствор серной кислоты 0,25 Н	2,0–2,5	1–5°C	3
Околоушная железа	Изотонический раствор	6,1–6,5	1–5°C	1
Предстательная железа	3% раствор уксусной кислоты с добавлением раствора хлористого цинка	pH 4–5	1–5°C	48
Сычуг	Изотонический раствор	6,1–6,5	1–5°C	4
Семенники	Раствор уксусной кислоты 0,1 Н	4,3–4,8	1–5°C	3–4
Гипофиз	Подкисленный ацетон (1% раствор HCl в 90% ацетоне)	3,5–3,8	1–5°C	4
Стекловидное тело	Очищенная вода	4,5–5,0	1–5°C	0,5



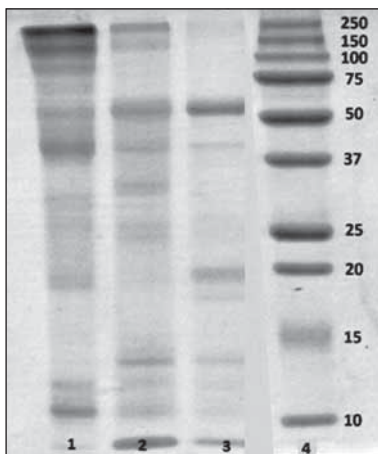


Рис. 2. Электрофореграмма белков экстракта из семенников северного оленя

Fig. 2. Electrophoregram of the proteins of the extract from the testes of the reindeer

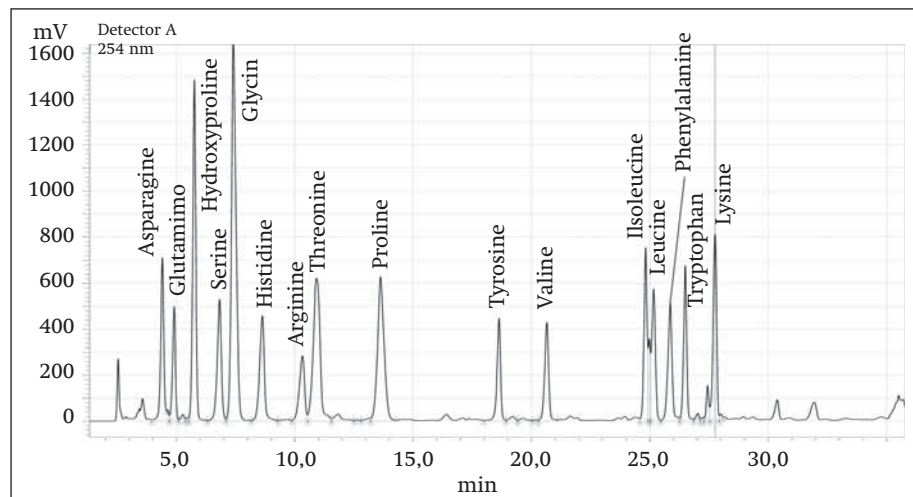


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма раствора очищенного экстракта семенников северного оленя, содержащего аминокислоты

Fig. 3. HPL-chromatogram of a solution of purified reindeer testis extract containing amino acids

Отделение осадка осуществлялось центрифугированием при температуре 1–5°C в течение 30 мин при частоте 11000 об/мин. Анализ полученных после отделения белков экстрактов проводили методом ВЭЖХ. Показано, что в семенниках СО содержится 16 аминокислот, среди которых присутствует полный набор незаменимых кислот – 10. Концентрация всех аминокислот достаточно высока, поэтому данный вид сырья является перспективным и позволяет отнести его к полноценным пищевым белкам, при этом набор аминокислот выше, чем в семенниках КРС (13 аминокислот). ВЭЖХ-хроматограмма раствора пробы очищенного экстракта семенников СО представлена на рис. 3. В околоушной железе и щитовидной железе содержится 14 аминокислот, из них 6 незаменимых аминокислот. Следует отметить, что концентрация аминокислот значительно ниже, чем в семенниках СО.

Заключение

Подобраны оптимальные условия проведения процесса экстракции БАВ из различных органов СО и определен компонентный состав полученных экстрактов.

Показана возможность получения АБТС из органов СО, из которых наиболее перспективными являются: поджелудочная железа для разработки технологии пищеварительных ферментов и семенники для получения незаменимых аминокислот.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Рухляева А.П. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981; 288. [Rukhlyadeva A.P. Methods for determining the activity of hydrolytic enzymes. M.: Light and food industry, 1981; 288 (in Russian)]
2. Northrop J.H. Crystalline trypsin. III. Experimental procedure and methods of measuring activity J. Gen. Physiol. 1932; 16 (2): 313–21.
3. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 680–5.
4. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008; 364. [Severin E.S., Aleinikova T.L., Osipov E.V., Silaeva S.A. Biological chemistry. M.: LLC "Medical Information Agency", 2008; 364 (in Russian)].
5. Шелепов В.Г., Донченко А.С., Лайшев К.А., Зеленовский Н.В. Анатомия северного оленя. Новосибирск, 2003; 434. [Shelepov V.G., Donchenko A.S., Laishev K.A., Zelenevsky N.V. Anatomy of a reindeer. Novosibirsk, 2003; 434 (in Russian)].

Поступила 11 апреля 2022 г.

Received 11 April 2022

Принята к публикации 8 июля 2022 г.

Accepted 8 July 2022