
МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 664.959

**ЦИТОХРОМ С ИЗ СЕРДЕЦ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ:
МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

© 2006 г. Н.Б. Аюшин, Н.Н. Ковалев

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,

Владивосток 690950

Поступила в редакцию 13.05.2005 г.

Окончательный вариант получен 16.09.2005 г.

С помощью нескольких методов из сердец морских ластоногих выделен цитохром С. Проведено сравнение эффективности этих методов, определены молекулярная масса, аминокислотный состав и спектральные характеристики полученных препаратов. Показано, что принципиальных отличий от коммерческих препаратов цитохрома С, применяющихся в качестве лекарственных средств, не имеется, препараты имеют высокую степень чистоты и могут быть рекомендованы для применения в фармакологии.

Цитохром С – это железосодержащий митохондриальный белок, участвующий в процессах биологического окисления в качестве переносчика электронов. Он содержит одну полипептидную цепь, состоящую из 104 аминокислотных остатков, и одну гемогруппу, которая ковалентно связана с полипептидом. Молекула цитохрома С свернута в компактную глобулу, причем большинство гидрофильных функциональных групп расположено снаружи, а гидрофобных – внутри глобулярной структуры, что обуславливает его хорошую растворимость в воде. Молекулярная масса этого белка для большинства видов составляет около 12 500. Цитохром С функционирует путем попеременного окисления и восстановления атома железа, находящегося в гемогруппе (Уайт и др., 1981). Широкое распространение цитохрома С в природе указывает на его большое биологическое значение. Он участвует в процессах тканевого дыхания, является антигипоксантом, способным корректировать процессы потребления и утилизации кислорода клеткой (Скулачев, 1969), что определяет его фармакологическое применение (Смирнов, Криворучка, 1998; Машковский, 1997).

Физико-химические свойства цитохрома С из сердечной мышцы млекопитающих изучены довольно подробно. Спектр поглощения его восстановленной формы не меняется при изменениях pH, максимумы поглощения находятся при 550 ± 3 нм; 521 ± 3 нм; 415 ± 3 нм. Это говорит, что связи между атомами железа и четырьмя атомами азота порфириновой группы остаются ковалентными. Окисленная форма цитохрома С имеет пять спектров различного типа, характер которых зависит от pH среды.

Потребность в препарате никогда не была удовлетворена в полной мере, поскольку традиционным сырьем для его получения являются сердца крупного

рогатого скота и свиней, являющихся пищевым продуктом. Кроме того, в последнее время, ткани сельскохозяйственных животных для получения лекарственных препаратов почти не используются из-за опасности распространения заболеваний прионовой природы. Поэтому поиск непищевых источников получения цитохрома C является весьма актуальным, тем более что получить его с помощью синтеза невозможно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве альтернативного сырья для получения цитохрома C нами использовались сердца морских млекопитающих, а именно – ластоногих, добываемых на северо-востоке России.

Сердца ластоногих, в частности котиков, сивучей и тюленей заготавливались на о. Тюлений Сахалинской области и судами промысловой разведки (ТУРНИФ), хранились при $-15\text{—}18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нарботка готового препарата для дальнейшего изучения проводилась в ТИНРО-центре (г. Владивосток), в АО «Тулпар» (г. Алма-Аты, Казахстан), НПО «Биохимреактив» (г. Рига, Латвия) и на Санкт-Петербургском заводе медпрепаратов, где выпускаются лекарственные формы цитохрома C из сердец крупного рогатого скота и свиней.

Аминокислотный анализ проводили на автоматическом аминокислотном анализаторе Hitachi AAA-835 (Япония).

Определение молекулярной массы проводили с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле (Методы..., 1978).

Содержание цитохрома вычисляли по формуле (ФС 42-2533-88):

$$C = (D_{550} \times 13 \times 10) / (\Sigma_{550} \times d) \text{ [мг/мл]},$$

где C – концентрация цитохрома C, мг/мл; D_{550} – оптическая плотность раствора при длине волны 550 нм; 13 – коэффициент пересчета концентрации моль/л; Σ_{550} – коэффициент экстинкции, равный 27,7 для восстановленной формы и 11,1 для окисленной; d – длина пробега луча в измерительной кювете (обычно равно 1 см); 10 – разбавление препарата (не учитывается в исходном экстракте).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сырье перед выделением цитохрома дефростировали на воздухе, обезжиривали, срезая ножом жир и сухожилия, и измельчали в фарш на электромясорубке. Цитохром C – содержащую фракцию выделяли из полученного фарша несколькими способами:

1) методом рекомендуемым Фармкомитетом РФ, применяемым для получения фармацевтического препарата цитохрома C из сердец свиней, лошадей и крупного рогатого скота. Он включает экстракцию фарша трихлоруксусной кислотой при pH 3,8–4,1, ступенчатое высаливание балластных белков

кристаллическим сульфатом аммония, осаждение цитохрома *C* 20% раствором трихлоруксусной кислоты, отделение осадка центрифугированием. Собранный осадок растворяют в дистиллированной воде, замораживают, размораживают и отфильтровывают, диализуют против физиологического раствора на сутки. Полученный раствор стерилизуют, разводят физраствором до концентрации цитохрома 2,5 мг/мл, стерильно фильтруют, разливают во флаконы и лиофилизируют.

2) методом с использованием неорганической кислоты, согласно которому проводили экстракцию фарша, освобожденного от жира и связок, 0,25% серной кислотой при pH $4,5 \pm 0,05$. Осадок удаляли центрифугированием, экстракт нейтрализовали гидроокисью бария до pH $8,5 \pm 0,05$, и через несколько часов отфильтровывали выпавший осадок на нутч-фильтре. Фильтрат пропускали через колонку с катионообменной смолой, промывали 0,25% раствором аммония сернокислого с pH 8,5 от несорбированного белка и элюировали с катионита 5% раствором сернокислого аммония. Очистку цитохрома *C* от балластных белков проводили сульфатом аммония. Отфильтровывали и осаждали цитохром кадмиевым комплексом. Осадок дважды промывали раствором йодистого натрия и отделяли центрифугированием. Затем растворяли осадок в деминерализованной воде, сорбировали материал на катионите, промывали и освобождали цитохром 0,5% раствором аммиака, после чего препарат лиофилизировали.

Препарат, полученный этим способом, отличается хорошим выходом, высокой чистотой и отсутствием неорганических солей, поэтому он лучше подходит для выпуска сухих (таблетированных, капсулированных и ампулированных) форм.

Количественное содержание цитохрома *C* в сырье и препаратах, полученных различными методами, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Содержание цитохрома *C* в сердечной мышце разных видов ластоногих животных и крупного рогатого скота.

Table 1. Cytochrom *C* containing in hearts of some sea pinnipedia and cow.

	Общее содержание (первичный экстракт), мг/кг	Выход, % от общего содержания	
		Классическая методика	Метод с использованием неорганической кислоты
Морской котик	220	40%	44%
Сивуч	250	-	-
Настоящий тюлень	140	-	-
Крупный рогатый скот	191	62%	21%

Как видно из данных таблицы, количественное содержание цитохрома *C* в сердцах ластоногих сравнимо, либо превышает таковое у крупного рогатого скота.

Поскольку сердца ластоногих животных заготавливались в разное время и в разных местах, а наработка препаратов для дальнейшего изучения их свойств проводилась также в разных местах, в таблице приведены усредненные данные, более присущие заводским условиям работы. В лабораторных условиях удавалось достичь 80%-го выхода сухого препарата из сердец морских котиков.

Массовая доля цитохрома C в препаратах, полученных разными методами из сердец морских котиков, оказалась следующей:

- для полученного по методике Фармкомитета – 81%;
- для полученного экстракцией серной кислотой с ионообменной доочисткой – 98,5%.

Итак, с использованием этих двух технологий удалось получить достаточно высокие выходы цитохрома C из сердец ластоногих. Несмотря на то, что процентный выход цитохрома из сердец крупного рогатого скота выше, его общее содержание в этом сырье ниже, чем в сердцах ластоногих. На основании этого можно утверждать, что сердца ластоногих как сырье для получения цитохрома как минимум не уступают традиционному.

Спектрофотометрическое исследование препаратов, полученных по этим методам, показало наличие максимумов поглощения при 550 ± 3 нм, 521 ± 3 нм и 415 ± 3 нм, что соответствует спектру поглощения подлинного цитохрома C (ФС 42-2533-88).

Молекулярная масса доминирующего в препаратах компонента, соответствующего цитохрому C, измеренная методом гель-электрофореза, оказалась равна $12\,450 \pm 100$ дальтон.

Проводили сравнение аминокислотного состава препаратов цитохрома C, полученных из сердец ластоногих и крупного рогатого скота. Определение производилось с помощью автоматического аминокислотного анализатора после проведения деградации белка раствором соляной кислоты. Результаты представлены в таблице 2.

Более высокое значение содержания почти всех аминокислот в препарате из сердец ластоногих свидетельствует, прежде всего, о лучшей очистке этого препарата от балластных примесей. В основном почти все аминокислоты этого препарата имеются почти в той же пропорции друг к другу, как и у препарата из сердец крупного рогатого скота, однако содержание серина у первого значительно выше, а метионина, напротив, значительно ниже, чем у второго. Вряд ли это свидетельствует о значительных различиях в конформации биомолекулы, так как биологическое действие обоих препаратов весьма сходно.

Таким образом, простые методы, основанные на экстракции трихлоруксусной кислотой, позволяют получить из сердец ластоногих препараты,

соответствующие марке «Б» (согласно стандартам, содержащим не менее 70% основного вещества), а более сложный метод с ионообменной доочисткой – марке «А» (не менее 90%).

Таблица 2. Сравнительное содержание белковых аминокислот в препаратах цитохрома C.
Table 2. Comparative containing of protein amino acids in some preparations of cytochrom C.

Аминокислота	Содержание, мг%	
	Препарат из сердец ластоногих	Препарат из сердец крупного рогатого скота
Аспарагиновая кислота	0,276	0,188
Треонин	0,154	0,130
Серин	0,101	0,039
Глутаминовая кислота	0,452	0,301
Глицин	0,186	0,152
Аланин	0,186	0,115
Цистин	0,026	0,014
Валин	0,097	0,075
Метионин	0,030	0,071
Изолейцин	0,102	0,100
Лейцин	0,175	0,114
Тирозин	0,065	0,052
Фенилаланин	0,119	0,092
Лизин	0,425	0,327
Гистидин	0,105	0,081
Аргинин	0,137	0,067
Пролин	0,128	0,075

Различия в аминокислотном составе цитохромов C ластроногих и крупного рогатого скота можно считать незначительными, тем более что в спектральных характеристиках нативных цитохромов и значении их молекулярной массы различий не обнаружено.

В настоящее время проводятся опыты по замене диализа на завершающей стадии выделения по методу с использованием ультрафильтрации, что позволит в несколько раз сократить продолжительность процесса.

Таким образом показано, что сердца ластроногих являются перспективным источником получения биопрепарата, а разработанные технологические подходы позволяют получать препарат с высокой степенью очистки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. Изд. 13-е. Харьков: Торсинг, 1997. 590 с.
- Методы практической биохимии. Под ред. Уильямс Б., Уилсон К. М.: Мир, 1978. 270 с.
- Скулачев В.П. Аккумуляция энергии в клетке. М.: Наука, 1969. 439 с.
- Смирнов А.В., Криворучка Б.И. Антигипоксантаы в неотложной медицине // Анестезия и реаниматология, 1998. №2. С. 50-57.

Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. В трех томах. М.: Мир, 1981. С. 490.

ФС 42-2533-88. Цитохром С для инъекций.

**CYTOCHROM C FROM SEA MAMMALS HEARTS:
METHODS OF OBTAINING AND PERSPECTIVES OF USE**

© 2006 y. N.B. Ayushin, N.N. Kovalev

Pacific Scientific Research Fisheries Center, Vladivostok

Cytochrom C from hearts of sea pinnipedia was isolated by some methods. This methods was compare to effectivity; the spectral characteristics, molecular weight and amino acid compound was determined. Fundamental differences between the cytochromes C from pinnipedia and commercial substance not found. Preparations have the high degree of purity, and may be recommend for use in pharmacology.