

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОПЕПТИДОВ ГИПОФИЗА КРЫС МЕТОДОМ  
ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ ПЛАЗМЕННО-ДЕСОРБЦИОННОЙ  
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ  
С ИОНИЗАЦИЕЙ ОСКОЛКАМИ ДЕЛЕНИЯ 252-CF (TOF-PDMS)**

**Л.И. Гребеник,  
В.Д. Чиванов\***

*Медицинский институт Сумского государственного университета,  
г. Сумы;*

*\*Институт прикладной физики НАН Украины, г. Сумы*

*Применение времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления 252-Cf позволило провести определение некоторых пептидов гипофиза крыс. Полученные результаты подтверждают тот факт, что указанный метод имеет достаточную чувствительность для изучения гипофизарных нейропептидов.*

*Ключевые слова: времяпролетная масс-спектрометрия, ионизация, гипофизарные нейропептиды.*

*Застосування часопротітної мас-спектрометрії з іонізацією уламками розподілу 252-Cf дозволило провести визначення деяких пептидів гіпофіза пацюків. Отримані результати підтверджують той факт, що зазначений метод має достатню чутливість для вивчення гіпофізарних нейропептидів.*

*Ключові слова: часопротітна мас-спектрометрія, іонізація, гіпофізарні нейропептиди.*

## **ВВЕДЕНИЕ**

Оптимальный режим функционирования, координация взаимодействия органов и систем, адекватность ответа на внешние воздействия определяются наличием в организме тонких молекулярных механизмов регуляции метаболических процессов. Один из наиболее активных регуляторных механизмов обеспечивается участием особых пептидных соединений-нейропептидов. Эти молекулы-биорегуляторы широко представлены в различных тканях и отличаются разнообразием биологического действия. В настоящее время установлено, что нейропептиды принимают участие в регуляции таких физиологически важных процессов, как боль и обезболивание, терморегуляция, пищеварение, сон, размножение, обучение, эмоциональные реакции и т.п.

Изучение нейропептидов имеет ряд направлений, в том числе: количественное и качественное определение, исследование тканевого распространения и клеточной локализации, структуры, механизмов действия, поиск возможностей синтеза природных пептидов и их аналогов, применение нейропептидов в качестве нейротропных и психофармакологических препаратов и т.п. [1, 2]. Значительные достижения в исследовании нейропептидов стали возможны благодаря применению широкого арсенала физико-химических методов: электронной и радиоавтографической световой микроскопий, рентгеноструктурного и флюоресцентного анализов, высокоэффективной жидкостной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, ионообменной хроматографии, ЯМР- спектроскопии высокого разрешения в сильных магнитных полях, иммуноцитохимических методов, радиоиммунологического анализа и т.п. Однако ни один из указанных методов не позволяет получить точные и

легко воспроизводимые результаты. Анализ литературных данных показывает, что существует необходимость не только применения и сочетания различных методических приемов, но и разработка новых научных подходов, предполагающих применение современных, высокоинформативных и высокоспецифичных физико-химических методов [3, 4]. К таким, в частности, относятся масс-спектрометрический (МС) анализ [5, 6, 7, 8].

В последние годы появились работы, обосновывающие целесообразность и перспективность изучения нейропептидов масс-спектрометрическими методами такими, как FAB, MALDI, TOF-PDMS, газовая хроматография/масс-спектрометрия [9, 10, 11]. Однако, в силу недостаточно хорошо разработанной методики определения указанных молекул (главным образом в биологических образцах), работ по применению методов масс-спектрометрии в этой области исследований крайне недостаточно.

Одним из наиболее чувствительных методов для определения нейропептидов является TOF-PDMS. Этот метод был разработан и представлен в 1974 г. для изучения пептидов и белков [12]. К настоящему времени методические приемы, применяемые в TOF-PDMS, и возможности метода значительно расширены и усовершенствованы. Однако проблема определения различных веществ в биологических образцах (в том числе пептидов) остается актуальной и сегодня.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью настоящей работы являлось изучение возможностей метода TOF-PDMS для определения нейропептидов в многокомпонентных биологических образцах, полученных из ткани гипофиза крыс. Известно, что содержание этих регуляторных пептидов в ткани гипофиза определяется пико- и фемтомолями вещества в расчете на один мг белка. TOF-PDMS является высокочувствительным и высокоселективным методом исследования. Это позволяет детектировать очень малые количества нейропептидов в микрообъемах минимально очищенных образцов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Использовали гипофизы нелинейных белых крыс (самцов) массой 190-250 г. Гипофизы выделяли в течение 1 минуты после декапитуирования крыс и быстро замораживали в полипропиленовых пробирках ( $V = 1,5$  мл), помещая их в жидкий азот. Далее ткань гипофизов массой 5 г гомогенизировали, добавляли 10-кратный объем ацетона (о.с.ч., "Chemapol", Чехия), подкисленного HCl, уравнивали в течение 24 часов при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и центрифугировали 20 мин при 27 000 g в центрифуге с охлаждением "K-24" (Германия). Надосадочную жидкость сливали, высушивали и добавляли 2-кратный объем диэтилового эфира; 20 мкл полученного раствора помещали на позолоченный пробонесущий диск. В качестве матрицы-подложки использовали традиционную для PDMS нитроцеллюлозу (NC) ("Schleicher & Schuell", Германия), которую наносили на диск электронапылением раствора NC в ацетоне (установка "Электроспрей-УНП", "Selmi", Украина). Полученные пробы оставляли на 20 мин при комнатной температуре для адсорбции пептидов на нитроцеллюлозной матрице. Часть проб промывали деминерализованной водой и подсушивали в струе азота. Диаметр пятен проб составлял 5-6 мм. Анализ проводили на МСБХ с ионизацией осколками деления  $^{252}\text{Cf}$  (АО "Selmi", Сумы, Украина). Основные параметры определения: ускоряющее напряжение  $+15$  kV, объем накапливаемых данных событий распада  $^{252}\text{Cf}$  – 50 000, разрешающая способность системы регистрации – 1 нс/канал; снятие

спектра проводили в режиме вычитания фона. Каждый эксперимент повторяли не менее 5-6 раз. На рисунках приведены усредненные масс-спектры.

TOF-PDMS разработан для анализа нелетучих, неполярных, термолабильных молекул в мультикомпонентных образцах [12]. Однако невозможность количественного определения анализируемых веществ не позволяет достаточно широко применять данный метод в медико-биологических исследованиях. Несмотря на это, в ряде случаев, при правильно подобранной методике пробоподготовки TOF-PDMS становится незаменимым инструментальным аналитическим методом. В немногочисленных работах по определению нейропептидов методом TOF-PDMS показана возможность детекции в биологических образцах некоторых нейропептидов (вазопрессина, вазопрессин- и окситоцин-нейрофизинов, ПОМК, меланотропина, эндорфинов и др.) [5]. Однако авторы указывают на невозможность детекции указанным методом значительной части нейропептидов. Этот факт связывают, в первую очередь, с особенностями подготовительного этапа - получением анализируемых образцов. Поэтому в настоящее время ведется поиск методических приемов, которые бы значительно расширили возможности TOF-PDMS при изучении нейропептидов.

Исходя из изложенного выше, решение поставленной задачи в эксперименте осуществлялось путем изменения некоторых условий подготовки анализируемых проб.

На рисунках 1 и 2 представлены масс-спектры биологических образцов, полученных из ткани гипофизов крыс.

В TOF-PDMS органические вещества детектируются в виде характерных для пламенной десорбции квазимолекулярных ионов (КМИ) -  $[M \pm H]^{\pm}$  и  $[M + (Me)_n]^+$ , где M - молекулярная масса вещества;  $H^+$  - протон; Me - ионы  $K^+$  или  $Na^+$ ,  $n \geq 1$ . В масс-спектрах пики с определенными массовыми числами m/z соответствуют регистрируемым квазимолекулярным ионам.

На рис. 1 представлен масс-спектр, где отмечен пик с  $m/z = 579$ , который имеет наибольшую интенсивность. Наши расчеты показали, что указанный пик соответствует КМИ  $[M+Na]^+$  [Leu<sup>5</sup>]-энкефалина Mr 556, имеющего следующую структуру: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Пик с  $m/z = 762$  не идентифицирован.

На рис. 2 представлен масс-спектр того же экстракта из ткани гипофиза крыс. На данном масс-спектре определено большее количество пиков, однако однозначно нами идентифицировано только несколько. Пик с  $m/z = 2356$  соответствует КМИ  $[M+H]^+$  кортикотропин-подобного пептида - CLIP(1-21). Пик с  $m/z = 504$  - КМИ  $[M+H_2]^{++}$  окситоцина Mr 1007. Детектирование окситоцина в виде двузарядного иона, с нашей точки зрения, обусловлено особенностями структуры - наличием двух остатков аминокислоты Cys.

Масс-спектры, представленные на рисунках 1 и 2 получены при TOF-PDMS-анализе одного и того же экстракта. Отличия в наборе пиков связаны с некоторыми деталями подготовки анализируемых проб. Масс-спектр рисунка 1 получен при анализе проб, подготовка которых включала этап удаления избыточного количества анализируемого материала путем промывания деминерализованной водой. Такая процедура необходима для удаления нежелательных примесей после адсорбции детектируемых веществ и повышения эффективности их ионизации в процессе анализа.

Масс-спектр на рис.2 получен при анализе проб, подготовку которых проводили без дополнительной процедуры промывания водой.

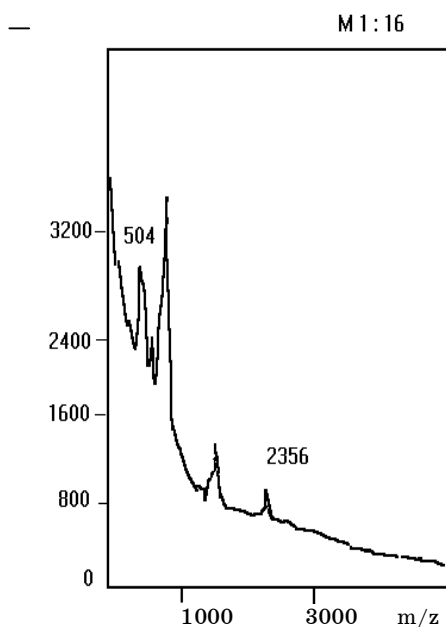


Рисунок 1 - Масс-спектр экстракта из гипофиза крыс. Подготовка пробы без промывания H<sub>2</sub>O

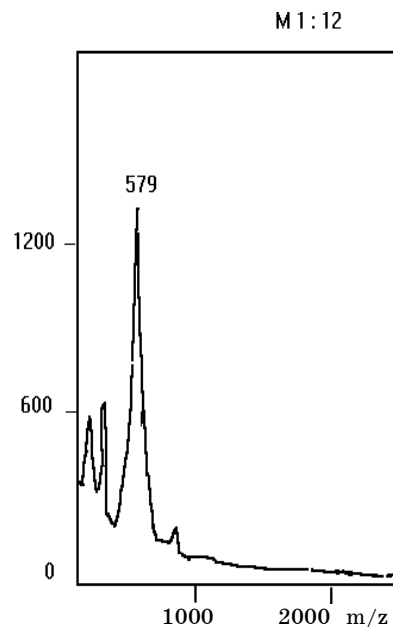


Рисунок 2 - Масс-спектр экстракта из гипофиза крыс. Подготовка пробы - промывание H<sub>2</sub>O

Изучение возрастных особенностей содержания некоторых опиоидных нейропептидов и ряда других регуляторных пептидов в крови крыс позволило прийти к заключению о возможности применения TOF-PDMS для количественного анализа. Полученные результаты приведены в сводной таблице 1.

Представленные результаты свидетельствуют в пользу того, что метод TOF-PDMS (при дальнейшем совершенствовании процедуры пробоподготовки) может быть с успехом применен для определения большей части нейропептидов в биологических образцах. Кроме того, с нашей точки зрения, указанный метод является перспективным для скрининг-анализа, например, при синтезе природных нейропептидов и их аналогов.

Таблица 1 - Возрастные изменения содержания некоторых нейропептидов

Нейропептиды	Содержание нейропептидов пмоль/л	
	взрослые крысы	старые крысы
Эндорфин	10,8 ± 1,3	16,3 ± 2,1
Мет-энкефалин	798 ± 65	1400 ± 110
Лей-энкефалин	215 ± 24	690 ± 30
Нейротензин	29 ± 10	24 ± 2,5
Вазопрессин	3,1 ± 0,7	7,3 ± 1,1

## ВЫВОДЫ

1 TOF-PDMS является высокочувствительным МС-методом, применение которого дает возможность определения некоторых нейропептидов в минимально очищенных биологических образцах, полученных из микроколичеств ткани гипофиза крыс.

2 Модификация условий пробоподготовки повышает эффективность определения, так как расширяет спектр детектируемых веществ.

3 С целью расширения аналитических возможностей метода необходимо дальнейшее изучение влияния изменений некоторых этапов подготовки проб на качество получаемых масс-спектров.

## SUMMARY

### MEASUREMENT OF RAT PITUITARY NEUROPEPTIDES BY TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRY (TOF-PDMS)

*L.I. Grebenik, V.D.Chivanov\**

*Medical Institute of Sumy State University,  
Rymshyi-Korsakov Str., 2, Sumy, Ukraine, 40007  
\*\* Institute of Applied Physics NASU,  
Petrovavliiv'ska Str., 58, Sumy, Ukraine, 40030*

*Using time-of-flight mass-spectrometry with bombardment by fission fragments of <sup>252</sup>Cf some rat pituitary peptides have been detected. It is suggested that this method have the sensitivity required for the studying of a neuropeptides.*

*Key words: time-of-flight mass-spectrometry, ionizing, hypophysial neuropeptides.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скворцова В.И. Современные нейропротекторные стратегии: применение нейропептидов в лечении двигательных и когнитивных нарушений / В.И. Скворцова, А.Б. Гехт // *Здоров'я України*. – 2008. – № 12/1. – С. 36-38.
2. Скрипченко Н.В. Роль и место нейропептидов в терапии бактериальных гнойных менингитов у детей / Н.В. Скрипченко // *Биомедицинский журнал*. – 2006. – Т. 7. – С. 268-280.
3. Fu Q. Identification of neuropeptides from the sinus gland of the Jonah crab, *Cancer borealis* and the Maine lobster, *Homarus americanus* using nanoscale liquid chromatography tandem mass spectrometry / Q. Fu, M. Goy, L. Li // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – № 337. – С. 765-778.
4. Li L. Peptides in our brain: measurement approaches and challenges / L. Li, J.V. Sweedler // *Inaugural volume of Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2008. – № 1. – С. 451-483.
5. Imaging Mass Spectrometry of Neuropeptides in Decapod Crustacean Neuronal Tissues / Stephanie S. DeKeyser, Kimberly K. Kutz-Naber, Joshua J. Schmidt [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2007. – № 6 (5). – P. 1782-1791.
6. Combining bottom-up and top-down mass spectrometric strategies for de novo sequencing of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from *Cancer borealis* / M. Ma, R. Chen, Y. Ge [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2009. – № 81. – P. 240-247.
7. Mass spectral comparison of the neuropeptide complement of the stomatogastric ganglion and brain in the adult and embryonic lobster, *Homarus americanus* / S.S. Cape, K.J. Rehm, M. Ma [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2008. – № 105. – P. 690-702.
8. Mass spectral imaging of neuropeptides in crustacean nervous tissue by MALDI TOF/TOF / S.S. DeKeyser, K. K. Kutz-Naber, J. J. Schmidt [et al.] // *Journal of Proteome Research*. – 2007. – № 6. – P. 1782-1791.
9. Wang J. Enhanced neuropeptide profiling via capillary electrophoresis off-line coupled with MALDI FTMS / J. Wang, M. Ma, R. Chen, L. Li // *Analytical Chemistry*. – 2008. – № 80. – P. 6168-6177.
10. Ma M. Methyl esterification assisted MALDI FTMS characterization of orcokinin neuropeptide family / M. Ma, K. K. Kutz-Naber, L. Li // *Analytical chemistry*. – 2007. – № 79. – P. 673-681.
11. Dowell J.A. Rat neuropeptidomics by LC/MS/MS and MALDI-FTMS: enhanced dissection and extraction techniques coupled with 2D RP-RP HPLC separation / J.A. Dowell, W. Vander Heyden, L.Li // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – № 5. – P. 3368-3375.
12. Torgerson D.F. New approach to the mass spectrometry of non-volatile compounds / D.F. Torgerson, R.P. Skowronski, R.D. Macfarlane // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1974. – № 60. – P. 616.

*Поступила в редакцию 16 июня 2009 г.*