

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ В ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАБАРГИ СИБИРСКОЙ

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля*, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.Л. Люблинский

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н,
п. Светлые горы, владение 1

Данные белкового компонентного состава мускуса и тканей кабарги представлены в научной литературе малоизученными и неполноценными. В данной работе выполнено протеомное исследование белкового состава биологически активных компонентов экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской методами гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и пептидного картирования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения после ферментативного расщепления трипсином. Это эффективные методы для получения достоверных данных белкового состава тканей кабарги сибирской, которые обращают пристальное внимание на белковую фракцию мускуса кабарги как источник биологически активных компонентов. Установлено молекулярно-массовое распределение, характерное для белковых экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской. Выявлены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного соотношения главных белковых компонентов. Подробно представлены результаты идентификации наиболее значимых (мажорных и минорных) белковых компонентов в экстрактах изучаемых объектов в соответствии с алгоритмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot. Данные белкового профилирования кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Отображены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской. Предложены маркерные белковые компоненты в составе изучаемых экстрактов и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных белков в составе экстрактов с биологическими эффектами.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС, гель-размерная хроматография, мускус кабарги, пептидное картирование, PNOС

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):35–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-35-47>

Поступила 07.02.2019

Принята после доработки 11.02.2019

Опубликована 10.03.2019

PROTEOMIC ANALYSIS IN THE IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPONENTS IN THE PREPUTIAL GLAND SECRETION OF THE SIBERIAN MUSK DEER

Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya*, Daniil V. Khvostov,
Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy

Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk,
Settlement Svetlye Gory, building 1

The Siberian musk deer (*Moschus Moschiferus*) is a deer-like animal. The substance that is secreted by sexually mature males is highly valued worldwide for its perceived pharmaceutical and perfumery properties. However, there is a lack of comprehensive information regarding the component composition of the musk and tissues of this species. A complex study of the protein composition of biologically active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer was performed using the methods of size-exclusion chromatography and peptide mapping. The latter method was realized using high-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometric detection following fermentation by trypsin. These are effective methods for generating vast amounts of data that can facilitate research on the Siberian musk deer. A molecular weight distribution characteristic of the investigated extracts was established. Optimal conditions for the extraction, chromatographic separation and relative quantitative determination of the main musk components were determined. Detailed information on the most significant (major and minor) protein components in the studied samples is presented in accordance with the algorithm of the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench search program and the UniProt protein database. Protein profiling data was clustered according to their molecular and biological functions. The identified proteins were assessed in terms of possible mechanisms of biological action and targets, which can be affected by the protein components of the objects under the study. A conclusion is made about a multicomponent composition of the Siberian musk deer preputial gland secretion. Marker protein components in the studied extracts are suggested. Possible links between the identified proteins and biological effects are outlined.

Keywords: HPLC-MS, musk, peptide mapping, SEC, PNOC

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomic Analysis in the Identification of Active Components in the Preputial Gland Secretion of the Siberian Musk Deer. *Biomedicine*. 2019;15(1):35–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-35-47>

Submitted 07.02.2019

Revised 11.02.2019

Published 10.03.2019

Введение

Кабарга сибирская (*Moschus moschiferus*) является оленевидным животным. Мускус, выделяемый половозрелыми самцами, высоко ценится во всем мире за выраженные фармацевтические свойства и возможность использования в парфюмерии. Биоаналитические данные компонентного состава муску-

са кабарги представлены в научной литературе малоизученными и неполноценными.

Ранее авторами была предложена методика развернутой идентификации низкомолекулярных биологически активных компонентов в составе препуциальной железы кабарги сибирской (ПЖК) методом газовой хроматографии с масс-селективным

детектором с применением современных методических приемов пробоподготовки, экстракции и дериватизации [1]. Были установлены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных летучих компонентов ПЖК в условиях лиофильного высушивания с сохранением многокомпонентного спектра активных компонентов. Согласно установленному в ранней работе составу ПЖК нами предложено выделить 3 группы соединений, значимых с точки зрения биологического эффекта и его выраженности: 1) стероидные компоненты, 2) жирные кислоты, 3) пептиды и белки.

Широкий спектр показаний к применению экстрактов мускуса [5] является следствием описанного в предыдущей работе многокомпонентного состава ткани. В изучаемом материале особое внимание стоит обратить на регуляторные соединения пептидной природы, гормонально активные комплексы и ростовые факторы, в т.ч. активирующие жизненный цикл стволовых клеток [2, 4]. Регуляторные пептиды (РП), как известно, играют жизненно важную роль в различных системах контроля многих биологических процессов организма. Они могут сосуществовать с классическими медиаторами, модулируя и усиливая их активность. Каждый из пептидов, с одной стороны, обладает уникальными свойствами, а с другой стороны, имеет перекрывающийся с остальными РП спектр биоактивностей. В совокупности все множество РП организма образует эффективный функциональный пул, решающий огромное число задач, связанных с процессами регуляции и контроля. При этом большинство из них способны индуцировать и ингибировать активность и производство других РП, формируя данным образом разветвленную, взаимосопряженную систему регуляции биологических функций.

Трудность систематизации и анализа результатов экспериментальных данных при

изучении пептидов и белков обусловлена тем, что число известных РП животных и человека превышает уже 9000. Акцентирование внимания на выявлении пептидных взаимосвязей позволяет провести анализ структурно-функциональных закономерностей совокупности РП и дает теоретические обоснования для применения данных комплексов и их аналогов в качестве терапевтических агентов и лекарственных средств [2, 4, 8].

В мировом научном сообществе известны работы по выявлению взаимодействующих пар белков, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями, серповидноклеточной анемией, шизофренией и др. Картирование интерактомоов нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, амиотропный латеральный склероз, а также прионовые болезни, позволило выявить, что белки, ассоциированные с этими заболеваниями, характеризуются наличием общих взаимодействующих партнеров.

Изучение белок-белковых взаимодействий и выявление участвующих в данном процессе партнеров, специфичных для той или иной патологии, представляет собой важный инструмент в изучении механизмов возникновения и развития заболеваний, поиска биологических активных веществ и регуляторов в сложных источниках белков, которым и является выбранный объект исследования. В дополнение ко всему вышесказанному структурно-функциональная информация о пептидах растительного и животного происхождения важна для системной биологии, может также использоваться в различных прикладных областях, в сельском хозяйстве, в производстве диетических продуктов, фармацевтических препаратов, продуктах функционального питания [4, 8]. Например, растительный пептид луназин, выделенный из сои и ячменя, обладает антионкогенным действием. Короткие растительные пептиды группы

циклотидов, обладающие инсектицидным действием, имеют также другие биологические эффекты: снимают нервное напряжение, нарушают репликацию вируса иммунодефицита, обладают гемолитической и цитотоксической активностью. Все это указывает на наличие потенциала и у растительных пептидов в области разработки лекарств.

Актуальность исследования

Методы систематического, количественного и идентификационного изучения пептидов, содержащихся в живых клетках и тканевых жидкостях, в области биомедицинских исследований в большинстве своем сосредоточены на изучении и создании новейших лекарственных препаратов, формирующихся из результатов поиска индикаторных и эффективных комбинаций различных субстанций пептидов и/или белков и их идентификации, для последующего использования в диагностике, эффективной терапии и применении их как функциональных продуктов питания.

Оказывается весьма парадоксальным тот факт, что при наличии достаточно продолжительной истории применения изучаемых экстрактов и субпродуктов из тканей кабарги многоя информация, касающаяся компонентного состава мускуса и тканей представителей данного вида, по-прежнему представляется малоизученной и неполноценной. Надежно не идентифицированы компоненты, ассоциированные с широким спектром биологической активности данных тканей. Однако благодаря вкладу многих ученых, в т.ч. лаборатории биоаналитических исследований НЦБМТ ФМБА России, на сегодняшний день известно, что в состав экстрактов из ПЖК входит огромное число соединений различной природы [1, 12, 10]. Следующим логичным этапом в рамках цикла данных исследовательских работ предстает изучение пептидно-белкового состава изучаемых тканей. Предпо-

лагается, что с помощью идентификации пептидно-белкового состава могут быть охарактеризованы многие виды биологической активности субстанции и препаратов на основе экстрактов и субпродуктов изучаемых тканей.

Анализируемые объекты представляют собой многокомпонентные белково-пептидные комплексы. Использование ряда методов с применением хроматографического фракционирования позволяет получить данные о количественном и качественном составе белкового профиля с визуализацией пула белков изучаемых экстрактов.

Цель исследования

Целью исследования стала расшифровка белкового профиля и идентификация биологически активных соединений пептидно-белковой фракции из ПЖК.

Задачи состояли в разработке методов пробоподготовки экстрактов исследуемых тканей в различных условиях, подборе методик для дальнейшего белкового профилирования и их идентификации в нативном сырье и лиофилизатах преупуциальной железы кабарги сибирской методами гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) после ферментативного гидролиза трипсином.

Материалы и методы

Образцы экстрактов ПЖК были получены из коллекции лаборатории биоаналитических исследований НЦБМТ ФМБА России. Они были выделены методами гомогенизации под высоким давлением, тангенциального фракционирования в условиях технологии водно-спиртовой экстракции и последующей лиофилизации.

Материалы исследования

В работе использовались следующие реактивы и материалы (Sigma, США): спирт

этиловый, ортофосфорная кислота, натрия хлорид, натриевая соль дезоксихолевой кислоты, трис(гидроксиэтил)-аминоэтанол, 1 М р-р дитиотреитола, 1 мМ р-р соляной кислоты, трипсин из свиной поджелудочной железы, эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*. Раствор бычьего сывороточного альбумина (Bio-Rad, США). Фильтры центрифужные с диаметром пор 0,22 мкм в комплекте с микроцентрифужными пробирками вместимостью 2,0 мл — для ферментативного расщепления; калибровочный р-р для ВЭЖХ-МС ВР — для калибровки масс-спектрометра. А также: ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, метанол для ВЭЖХ (все — Merck, Германия); муравьиная кислота (Fluka, Германия) — для приготовления подвижных фаз.

Все растворители и реагенты были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с использованием деионизованной воды.

ВЭЖХ-МС/МС ВР анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа модели 1260 Infinity II Agilent Technologies, оснащенного насосом, двухканальным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Multisampler 1260 Analytical head 100 µl с масс-спектрометрическим детектором QTOF 6545XT с электрораспылительной ионизацией Dual Jet Stream (Agilent Technologies, США), хроматографическая колонка Advance Bio Peptide Mapping длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 2,7 мкм (Agilent Technologies, США).

ГРХ-анализ выполняли на хроматографической системе среднего давления NGC Discover (Bio-Rad, США), оснащенной многоволновым спектрофотометрическим детектором, датчиком pH элюента, кондуктометрической ячейкой и хроматографической колонкой для ГРХ высокого разрешения Enrich SEC 650, в качестве калибровочных стандартов с известными

молекулярными массами использовали Gel Filtration Standard (Bio-Rad, США).

Идентификацию белкового состава проводили с использованием базы данных полипептидных последовательностей UniProt в сети Интернет (<https://www.uniprot.org>) и программы для сбора и обработки данных Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Agilent, США).

Методы исследования

Определение общего белка проводили по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.3.0012.15, «Определение» белка. Образцы нативной ткани и лиофилизатов экстракта мускуса кабарги предварительно растворяли в воде, очищенной до концентрации 150 мг/мл в соответствующем объеме растворителя. Содержание белка определяли по калибровочной кривой для р-ра бычьего сывороточного альбумина.

Молекулярно-массовое фракционирование продукта проводили на жидкостном изократическом хроматографе высокого давления со спектрофотометрическим проточным детектором с длиной волны 280 нм с помощью соответствующей хроматографической колонки, предварительно откалиброванной по стандартным глобулярным водорастворимым белкам известной молекулярной массы (рис. 1, табл. 1). При проведении исследования определяли суммарное содержание всех белков, а также отдельных белков (пептидов) с соответствующими молекулярными массами. Далее анализировали соотношение суммы белков в диапазоне калибровочных молекулярных масс к общему их количеству и делали заключение о молекулярно-массовом распределении белков и пептидов в анализируемом продукте.

Анализ на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity II проводили в режиме AutoMSMS. Хроматографическая колонка AdvanceBio Peptide Mapping, предколонка ZORBAX Extend-C18 Narrow-

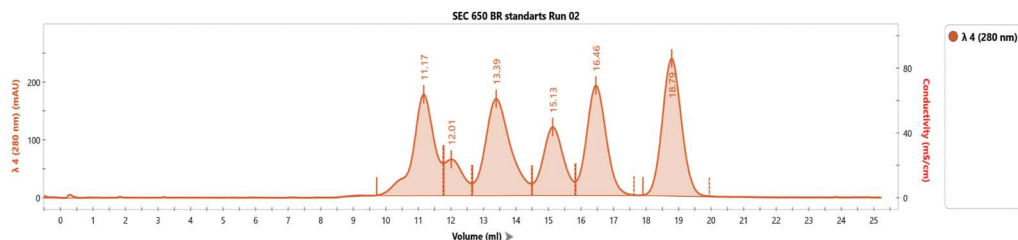


Рис. 1. Хроматограмма калибровочных стандартов по молекулярной массе для ГРХ.

Fig. 1. Chromatogram of the calibrated standards in terms of molecular mass for size exclusion chromatography.

Таблица 1. Калибровочная таблица для ГРХ

Table 1. Calibration table for size exclusion chromatography

Название пика	V_r , мл	V_c , мл	V_o , мл	K_{av}	Молекулярная масса, Да
Thyroglobulin	11,17	23,56	8	0,20	670 000
γ -globulin	13,39	23,56	8	0,35	158 000
Ovalbumin	15,13	23,56	8	0,46	44 000
Myoglobin	16,46	23,56	8	0,54	17 000
Vitamin B ₁₂	18,79	23,56	8	0,69	1350

Примечания: V_r — объем выхода с колонки пробы, V_c — объем колонки, V_o — «мертвый» объем колонки, K_{av} рассчитывается для каждого известного белка путем подстановки экспериментально определенных значений V_o , V_c и V_r в формулу: $K_{av} = (V_r - V_o) / (V_t - V_o)$.

Notes: V_r is the output volume from the sample column, V_c is the column volume, V_o is the “dead” column volume, K_{av} is calculated for each known protein by substituting experimentally determined values of V_o , V_c and V_r into the formula: $K_{av} = (V_r - V_o) / (V_t - V_o)$.

Bore Guard Column. Элюирование осуществляли смесью, состоящей из компонентов А и В, в градиентном режиме: до 0,5 мин — 5%В, с 0,5 до 15 мин увеличивается до 35%В, с 17 мин — до 95% и удерживается в течение 13 мин, с 30,01 мин — возвращается в исходные условия. Время уравнивания колонки на исходных условиях — 5 мин. Компонент А представлял собой 0,1% р-р муравьиной кислоты в деионизированной воде, компонент В — 0,1% р-р муравьиной кислоты и 10% деионизированной воды в ацетонитриле. Скорость потока — 400 мкл/мин, длительность анализа составила 30 мин. Условия масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 2.

Результаты и их обсуждение

Определение общего белка

Процентное содержание белка в изучаемых экстрактах демонстрирует, что среднестатистическое содержание белка в экстрактах равно 3,2%, а дисперсия при этом равняется 0,98 (данные не приведены). В присутствии детергента дисперсия остается практически неизменной, а содержание белка в растворе увеличивается на 1%. Расчеты были проведены с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Гель-размерная хроматография

Результаты ГРХ свидетельствуют о низкомолекулярном пептидо-белковом профиле водных экстрактов ПЖК. Диапазон

Таблица 2. Условия масс-спектрометрического детектирования
Table 2. Conditions for mass spectrometric detection

Наименование параметра	Значение
Масс-спектрометрический детектор	QTOF 6545XT
Режим источника ионизации	Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS ESI)
Разрешающая способность	60 000
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка соударительной диссоциации
Энергия ионизации	(30±15)%
Детектируемое зарядовое состояние	2-5
Режим сканирования	AutoMSMS
Диапазон детектируемых масс	100-2100
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Напряжение на распылителе	3,5 кВ
Напряжение фрагментора	175 В
Скорость потока газа-осушителя	13 л/мин
Давление газа на небулайзере	35 psig
Температура распылителя	250 °C

представленного распределения выходит за рамки разрешающей способности электрофореза.

Идентификация по молекулярной массе была проведена с использованием программного обеспечения ChromLab (Bio-Rad, США) (рис. 2) и проанализирована с помощью Microsoft Excel. В исследованном образце было выделено 5 маркерных участков с молекулярными массами, представленными в табл. 3.

Данные хроматограммы свидетельствуют о большом скоплении белков с массой до 3 кДа, что говорит о значительном коли-

честве низкомолекулярных белков и олигопептидов. Доля белков с большими молекулярными массами составляет не более 5%.

ВЭЖХ-МС

В методологической основе протеомного анализа (качественного и количественного) лежит масс-спектрометрия пептидов, которая в наши дни активно развивается и совершенствуется [3].

Результатом расшифровки белкового профиля фракции из ПЖК и их классификации стали аннотированные группы белков, представленные на рис. 3 и 4.

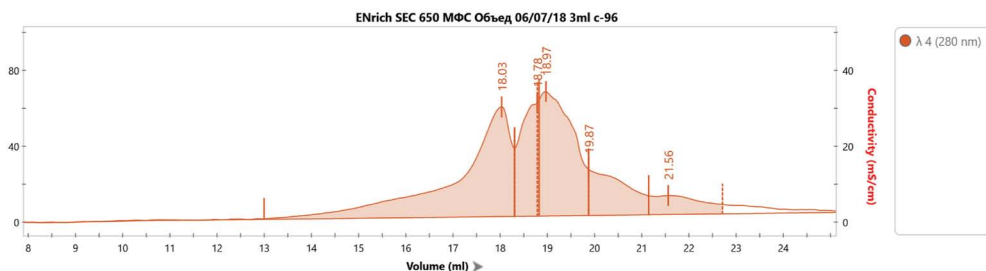


Рис. 2. Гель-размерная хроматография водного р-ра экстракта мускуса кабарги ПЖК.

Fig. 2. Size-exclusion chromatography of the aqueous solution of musk extract obtained from the preputial gland of musk deer.

Таблица 3. Молекулярно-массовое распределение белкового профиля экстракта ПЖК

Table 3. Molecular weight distribution of the protein profile of the preputial glandular extract obtained from musk deer

Номер пика	V _г , мл	V _с , мл	V _о , мл	K _{ав}	Отн. содержание, %	Молекулярная масса, кДа
1	18,03	23,56	8	0,64	40,18	2,8
2	18,78	23,56	8	0,69	13,00	1,6
3	18,97	23,56	8	0,71	28,33	1,3
4	19,87	23,56	8	0,76	11,78	0,7
5	21,56	23,56	8	0,87	6,71	0,2

ВЭЖХ-МС анализ после ферментативного гидролиза трипсином продемонстрировал идентификацию большого числа белковых компонентов. Полученные данные были проанализированы в базе данных UniProt. Заслуживает пристального внимания разнообразие функций и биологических ролей выявленных белковых компонентов мускуса кабарги. Суммарно из фракции ПЖК было идентифицировано 66 белковых компонентов различной природы, из которых 15 на момент анализа считались устаревшими и не были подвергнуты анализу ранее.

Приведенные диаграммы демонстрируют общие направления функций и процессов с привлечением и участием идентифицированных белков. На рис. 3, 4 и в табл. 4 отображены наиболее яркие представители изучаемых профилей с наибольшим индексом сходства.

В классификации по молекулярным функциям белковых компонентов из фракции ПЖК преобладают три направления: гидролазы, оксиредуктазы и трансферазы. По вовлеченности в биологические процессы преобладают следующие направления: биогенез/деградация клеточной стенки, транскрипция, деление клеток. Приведенные в табл. 4 результаты составляют лишь незначительную часть проанализированных белковых компонентов, однако они являются одними из известных и значимых среди них.

Особенно примечательно, что в экстрактах из ПЖК был идентифицирован

предшественник нейропептидов, которые являются природными агонистами ноцицептинового опиоидного рецептора NOP (ORL1). Данный белок носит название пре-проноцицептин (PNOС) и является предшественником ноцистатина, ноцицептина и орфанина FQ2. Первое упоминание о нем было опубликовано менее 30 лет назад и задает направление будущих исследований в отрасль нейрофизиологии [9]. Нейропептид ноцицептин является эндогенным лигандом рецептора NOP и индуцирует гипералгезию, аллодинию, тревожность и депрессию. Его предшественник также содержит и другой биологически активный пептид, который блокирует ноцицептин-индуцированные эффекты [11]. Таким образом, идентифицированный предшественник содержит два пептида, которые играют противоположные роли в передаче болевых сигналов. Терапевтический потенциал использования продуктов созревания PNOС демонстрируется и в современных исследованиях. Так, например, группой зарубежных ученых был обнаружен бифункциональный агонист рецепторов NOP и μ - (мю) опиоидного рецептора MOR [6]. Низкомолекулярный лиганд AT-121 рассматривается как молекула-кандидат к PNOС и демонстрирует морфиноподобные анальгетические эффекты, при этом не вызывая побочных эффектов (депрессия, зависимость, гипералгезия). Также в литературе присутствуют многочисленные упоминания о вовлеченности данных пептидов в процессы стресса, обучения и памяти.

Молекулярные функции

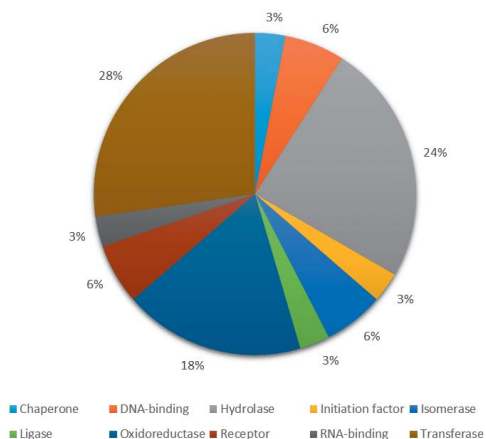


Рис. 3. Группы белков из экстрактов ПЖК, распределенные по молекулярным функциям (использована база белковых данных Uniprot).

Fig. 3. Groups of proteins in the preputial glandular extracts of musk deer, distributed by their molecular functions (using the Uniprot protein database).

Биологические процессы

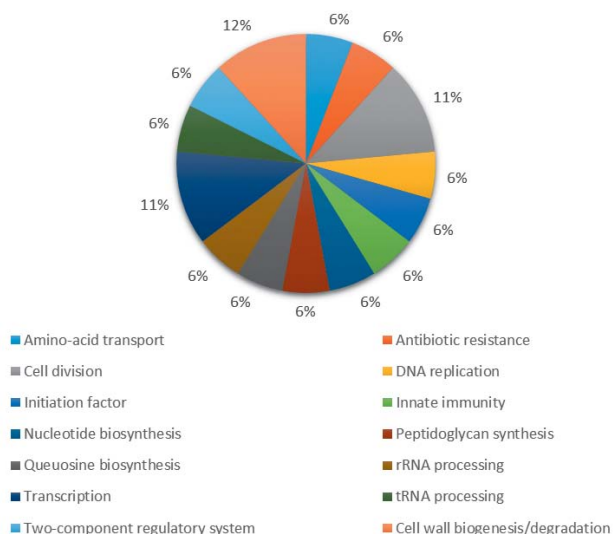


Рис. 4. Группы белков из экстрактов ПЖК, распределенные по биологическим процессам (использована база белковых данных Uniprot).

Fig. 4. Groups of proteins in the preputial glandular extracts of musk deer, distributed by their biological processes (using the Uniprot protein database).

Таблица 4. Молекулярно-массовые характеристики некоторых типичных аннотированных белков в составе экстракта ПЖК

Table 4. Molecular mass characteristics of some typical annotated proteins in the preputial glandular extracts of musk deer

Номер аннотир. белка	MS/MS Score	Покрывтие а. п.	Общая спектральная интенсивность	Моп. масса, Да	Наименование белка
1	11,54	3,7	-	32 744	LytR family transcriptional regulator
2	10,80	2,3	6,99E+04	52 108	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4
3	9,48	1,9	2,34E+04	84 548	Translation initiation factor IF-2
4	9,19	0,8	2,97E+04	135 077	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
5	7,45	13,6	2,48E+04	10 762	Prepronociceptin (Fragment)
6	6,35	6,0	2,34E+04	30 018	Abortive infection protein
7	6,34	5,6	0,00E+00	29 241	Class I SAM-dependent methyltransferase
8	6,00	11,6	-	17 775	ArsR family transcriptional regulator
9	5,67	0,9	-	97 710	Toll-like receptor 5
10	5,65	4,5	-	22 953	Hyaluronan synthase 2 (Fragment)
11	4,95	5,0	5,08E+03	32 640	Geranyl transferase
12	4,93	10,3	-	46 268	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
13	4,66	2,2	1,18E+04	39 610	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase
14	4,59	5,3	-	30 488	Stonin 2 (Fragment)
15	4,49	6,1	-	19 822	G protein-coupled receptor family C group 5 member C (Fragment)
16	4,21	5,5	7,96E+03	26 728	Cell division protein DivIVA
17	3,78	1,8	1,84E+04	40 830	FAD-binding oxidoreductase
18	3,36	1,5	1,07E+05	50 779	Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO
19	3,16	7,4	2,14E+04	21 117	Synaptotagmin IV (Fragment)
20	1,89	2,0	6,64E+04	38 816	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase

Известна роль ноцицептина в данных процессах с выраженным акцентом на вовлеченность системы NOP рецепторов в шизофрении [7]. Таким образом, дальнейшее изучение данных пептидов представляется интересным с точки зрения поиска эффективных терапевтических агентов в анальгезии, инициации процессов обучения и памяти, а также лечения злоупотребления опиоидами.

Выводы

В статье представлены данные протеомного анализа нативной ткани и лиофилизатов мускуса кабарги. Методом гель-размерной хроматографии получены данные по белковому профилированию и молекулярно-массовому распределению белков в экстрактах ПЖК в денатурирующих условиях.

С применением метода Брэдфорда установлено содержание общего водорастворимого белка в испытуемых экстрактах, выявлено влияние добавок детергента и условий экстрагирования на общий уровень белка в лиофилизатах. Максимальное содержание белка достигается в условиях с детергентами и составляет 10 масс. %.

Методом ВЭЖХ-МС ВР подвергнутых ферментативному гидролизу проб экстрактов идентифицированы обширные и представительные группы белков, характеризующие особенности широкого спектра биологической активности изучаемых объектов. Идентификация наиболее значимых (мажорных и минорных) белковых компонентов в экстрактах изучаемых объектов проведена в соответствии с ал-

горитмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot.

В результате интерпретации белкового состава изучаемых экстрактов препуциальной железы кабарги сибирской все обнаруженные белки кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Отображены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов ПЖК, предложены маркерные белковые компоненты в составе изучаемых экстрактов и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных белков в составе экстрактов с биологическими эффектами. Особый интерес представляет группа белков и пептидов семейства препроноцицептина (PNOC), выступающего предшественником ряда эндогенных нейропептидов: ноцистатина, ноцицептина, орфанина FQ2 и других регуляторных пептидов. Перспективными нейропептидами с выраженным спектром описанной в литературе биологической активности являются ноцицептин-подобные пептиды, тропные к рецептору ORL1. Так, сам ноцицептин индуцирует гипералгезию, аллодинию, тревожность и депрессию. Предшественники и пептидо-миметики ноцицептина также имеют выраженные ноцицептин-индуцированные эффекты. Суммарно в экстракте ПЖК идентифицировано 66 аннотированных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агелдинов Р.А. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги *Moschus moschiferus* методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором // Биомедицина. — 2018. — № 1. — С. 19–39.
2. Ковалева С.В., Исаева И.В., Лутцева А.И., Аладышева Ж.И., Пихтарь А.В. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). — 2005. — Т. 49. — № 1. — С. 135–145.
3. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. — М.: Техносфера, 2012. — 176 с.
4. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки. Белок-белковые взаимодействия // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 429–480.
5. Уйба В.В., Котенко К.В., Корчажкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. Применение мускуса кабарги в клинической практике: Метод. реком. — М., ФМБА России, 2013. — 18 с.
6. Ding H., Kiguchi N., Yasuda D. A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates // Science Translational Medicine. — 2018. — Vol. 10. — No. 456. — 11 p.
7. Khan M.S., Boileau I. A systematic review of the role of the nociceptin receptor system in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia // Transl. Psychiatry. — 2018. — Vol. 8. — No. 1. — 38 p.
8. Koroleva S.V., Ashmarin I.P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): vector model of RP-effects representation // J. of Theoretical Biology. — 2002. — V. 216. — No. 3. — Pp. 257–271.
9. Mollereau C., Simons M. J., Soularue P., Liners F. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93. — No. 16. — Pp. 8666–8670.
10. Oh S.R., Lee J.P., Chang S.Y., Shin D.H., Ahn K.S., Min B.S., Lee H.K. Androstane alkaloids from musk of *Moschus moschiferus* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). — 2002. — Vol. 50. — No. 5. — Pp. 663–664.
11. Okuda-Ashitaka E., Minami T., Tachibana S., Yoshihara Y. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission // Nature. — 1998. — Vol. 392. — No. 6673. — Pp. 286–289.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prihodko V.I., Zinkevich E.P. Musk deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of main lipid components from preputial gland secretion // J. Chem. Ecol. — 1987. — Vol. 13. — No. 1. — Pp. 71–83.

REFERENCES

1. Karkisichenko V.N., Dulya M.S., Khvostov DV, Ageldinov R.A. Analysis of the biologically active compounds of the musk deer *Moschus moschiferus* by gas chromatography with a mass-selective detector. Biomedicine. 2018. No. 1. Pp. 19–39 p. (In Russian).
2. Kovaleva S.V., Isaeva I.V., Luttseva A.I., Aladyshva Zh.I., Pikhtar A.V. Problems of standardization of hormone preparations of peptide — protein nature. Ros. khim. zh. (Zh. Ros. khim. ob-va im. D.I. Mendeleeva) = Russian Chemical J. (J. of the Russian Chemical Society named after D.I. Mendeleev). 2005. Vol. 49. No. 1. Pp. 135–145. (In Russian).
3. Lebedev A.T., Artemenko K.A., Samgina T.Yu. Fundamentals of mass-spectrometry of proteins and peptides. Moscow: Technosphere. 2012. 176 p. (In Russian).
4. Terentyev A.A., Moldogazieva N.T., Shaitan K.V. Dynamic proteomics in living cell modeling. Protein — protein interactions. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in biological chemistry. 2009. Vol. 49. Pp. 429–480. (In Russian).
5. Ujba V.V., Kotenko K.V., Korchazhkina N.B., Petrova N.B., Mikhajlov A.A. The use of the musk deer in clinical practice: Methodical recommendations. Moscow, FMBA of Russia. 2013. 18 p. (In Russian).
6. Ding H., Kiguchi N., Yasuda D. A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic nonhuman primates. Science Translational Medicine. 2018. Vol. 10. No. 456. 11 p.
7. Khan M.S., Boileau I. A systematic review of the nociceptin receptor in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia. Transl Psychiatry. 2018. Vol. 8. No. 1. 38 p.
8. Koroleva S.V., Ashmarin I.P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): vector model of RP — effects representation. J. of Theoretical Biology. 2002. V. 216. No. 3. Pp. 257–271.
9. Mollereau C., Simons M. J., Soularue P., Liners F. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. No. 16. Pp. 8666–8670.
10. Oh S.R., Lee J.P., Chang S.Y., Shin D.H., Ahn K.S., Min B.S., Lee H.K. Androstane alkaloids from musk of *Moschus moschiferus*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2002. Vol. 50. No. 5. Pp. 663–664.
11. Okuda-Ashitaka E., Minami T., Tachibana S., Yoshihara Y. Nocistatin, a peptide that block the action and transmission. Nature. 1998. Vol. 392. No. 6673. Pp. 286–289.
12. Sokolov V.E., Kagan M.Z., Vasilieva V.S., Prihodko V.I., Zinkevich E.P. Musk deer (*Moschus moschiferus*): Reinvestigation of lipid components from preputial gland secretion. J. Chem. Ecol. 1987. Vol. 13. No. 1. Pp. 71–83.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Дуля Максим Сергеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Maxim S. Dulya*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Stanislav L. Lyublinskiy, PhD Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author