

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДОВ КОЖНОГО СЕКРЕТА БЕСЧЕШУЙЧАТОГО ВИДА РЫБ

Меркулова Н.Л.¹, Грехнева Е.В.¹, Чуйкова С.В.², Малышев В.Н.²

¹ Курский государственный университет

ул. Радищева, 33, г. Курск, 305000, РФ; e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru

² ООО «Акватехнологии»

ул. Малиновая, 66, г. Курск, 305023, РФ

Поступила в редакцию: 11.07.20

Аннотация. В данной работе осуществлено выделение и анализ пептидной фракции секреторной жидкости клария угревидного (*Clarias gariepinus*). Выделение осуществлялось методами переосаждения и сопровождалось промежуточными очистками на сорбентах. Пептидная природа выделенной фракции подтверждалась методом ИК-спектроскопии. Масс-спектрометрический анализ пептидной фракции экстракта секреторной жидкости показал, что в составе преобладают хорошо удерживаемые пептиды с молекулярной массой 2000-3000 Да, а также более короткие гидрофильные пептиды. Последовательности пептидов определяли с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей UniProt (uniprot-catfish+AND+organism__Clarias+gariepinus+[13013]). Программно было найдено 14547 пептидных последовательностей, относящихся к 131 группе белков. Показано, что экстракт секреторной жидкости содержит большое количество пептидов, относящихся к различным классам белков протеома *Clarias gariepinus* (бета-актины, семейство цитохрома, белки теплового шока, миостатин, НАДН-дегидрогеназный комплекс и др.), которые определяют широкий набор биологических свойств, характерных для кожного секрета рыбы. Дальнейшее изучение кожного секрета клария угревидного представляется перспективным в плане фракционирования пептидного пула и определения фармакологической активности более узких фракций.

Ключевые слова: кларий угревидный, кожный секрет, пептидные фракции, масс-спектрометрия, секвенирование.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время активно ведется поиск новых полипептидных препаратов, обладающих биологической активностью. Изучение и систематизация защитных пептидов живых организмов начались сравнительно недавно [1], тем не менее, на их основе уже созданы фармацевтические композиции. Такие препараты представляют собой, как правило, смесь олигопептидов, выделенных из различных тканей и органов животных. К уже известным и широко применимым лекарственным средствам относятся тималин, кортексин, церебролизин, актовегин, солкосерил и др. отечественных и зарубежных производителей. Указанные препараты, как заявляют производители, обладают иммуномодулирующими свойствами, стимулируют процессы регенерации и кроветворения, улучшают течение процессов клеточного метаболизма, проявляют антиагрегационную и противоопухолевую активность, оказывают нейротрофический, нейропротективный, ноотропный, противовоспалительный, противораковый, антиконвульсантный и противоопухолевый эффекты. Процесс выделения таких пептидов отличается высокой трудоемкостью, длительностью и дороговизной.

При этом недостаточно внимания, по нашему мнению, уделяется изучению свойств и состава органов и тканей рыбы. Особенный интерес в этом плане могут представлять бесчешуйчатые виды рыб, в частности африканский клариевый сом или кларий угревидный (*Clarias gariepinus*). Особенностью данного вида является то, что, не обладая механической защитой в виде чешуи, сом вырабатывает на поверхности кожи секрет, призванный выполнять многочисленные защитные функции [2-4].

Слизь играет огромную роль в жизнеобеспечении всех видов рыбы: она обеспечивает механическую защиту путем уменьшения трения тела о воду, предотвращает попадание в организм паразитов и бактерий (бактерицидная защита), ускоряет свертывание крови в случаях ранений (гемостатическая функция) [5], интенсифицирует обмен веществ, осуществляет осмотическую регуляцию, осаждаёт муть и выделяет специфический видовой запах [6]. Так, например, с бактерицидными свойствами слизи линия связывают повышенную устойчивость его к заражению паразитами, в отличие от других представителей рыб этого семейства. Показана антимикробная активность компонентов слизи по отношению к золотистому стафилококку (*st. aureus*) кишечной палочке (*e. coli*), а также фунгицидная активность по отношению к *Candida albicans*. Имеются сведения о проявлении противораковой активности компонентов слизи [7, 8].

По некоторым данным регулярная секреция и отторжение слизи защищают рыб от паразитов и патогенных бактерий. Индуцируемые в кожном секрете вещества, такие как иммуноглобулины, комплементы, лизоцимы, С-

реактивный белок, антибактериальные пептиды, протеазы, лектин, гемолизин и мукополисахариды определяют защитные свойства слизи [9, 10].

Рыбы, лишённые чешуи или чешуя которых редуцирована (к числу которых относится также и клариевый сом), отличаются повышенным выделением секреторной жидкости поверхностью кожи. А это значит, что слизь, являясь побочным и нежелательным продуктом на рыбоперерабатывающих предприятиях, может стать источником получения новых фармакологически-активных веществ.

Данная работа посвящена изучению возможности выделения и анализа пептидов секрета (слизи) клария угревидного. В связи с тем, что данный вид рыбы выращивается в установках замкнутого цикла рядом рыбных хозяйств России, процесс получения слизи не представляет никаких технических трудностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белково-пептидная фракция была выделена осаждением из водно-солевых растворов слизи. Данный процесс включал следующие этапы: растворение слизи в водном растворе соли, удаление механических примесей фильтрованием или центрифугированием, высаливание высокомолекулярной белковой фракции, очистка на сорбенте (при необходимости) и осаждение пептидов неводным растворителем. После достижения полноты осаждения пептиды отделяли фильтрованием или центрифугированием, промывали на фильтре неводным растворителем и высушивали под вакуумом. Полученный продукт представлял собой порошок серо-голубого цвета без запаха, легко растворимый в воде.

Пептидно-белковая природа выделенного продукта подтверждалась методом ИК-спектроскопии с помощью ИК-Фурье спектрометра Perkin Elmer Frontier в диапазоне волновых чисел $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$, с разрешением 1 см^{-1} , (сканов-20). ИК-спектры снимали в таблетке с KBr.

Масс-спектрометрический анализ выделенной фракции осуществляли высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием системы Ultimate 3000 RS («Thermo Scientific», США) в сочетании с масс-спектрометром Q-exactive («Thermo Scientific», США) с орбитальной ловушкой и квадрупольным масс-анализатором. Элюирование проводили на колонке Acquity UPLC Peptide BEH C18 $50\times 2.1\text{ мм}$ с размером частиц 1.7 мкм в градиентном режиме (скорость потока – 0.3 мл/мин ; А – 0.1% муравьиная кислота; Б – 90% ацетонитрил, 0.1% водный раствор муравьиной кислоты; от 5 до 50% Б за 30 мин , далее до 100% Б за 5 мин , после 5 мин промывки возвращались к начальным условиям и уравнивали колонку). МС-анализ проводили на масс-спектрометре Q-exactive в режиме положительной ионизации с использованием источника HESI («Thermo Scientific», США) со следующими параметрами настроек: напряжение на эмиттере 3.5 кВ , температура капилляра $320\text{ }^\circ\text{C}$. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500 m/z при разрешении $70\,000$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объект исследования – кожный секрет клария угревидного был предоставлен компанией ООО «Панинское Плюс» (Курская область) на котором данный вид рыбы выращивается с использованием установок замкнутого цикла при соблюдении всех санитарных норм и правил.

Выделение пептидной фракции осуществлялось по методике описанной выше и выгодно отличается от стандартных методик применяемых для получения пептидных препаратов благодаря особенностям

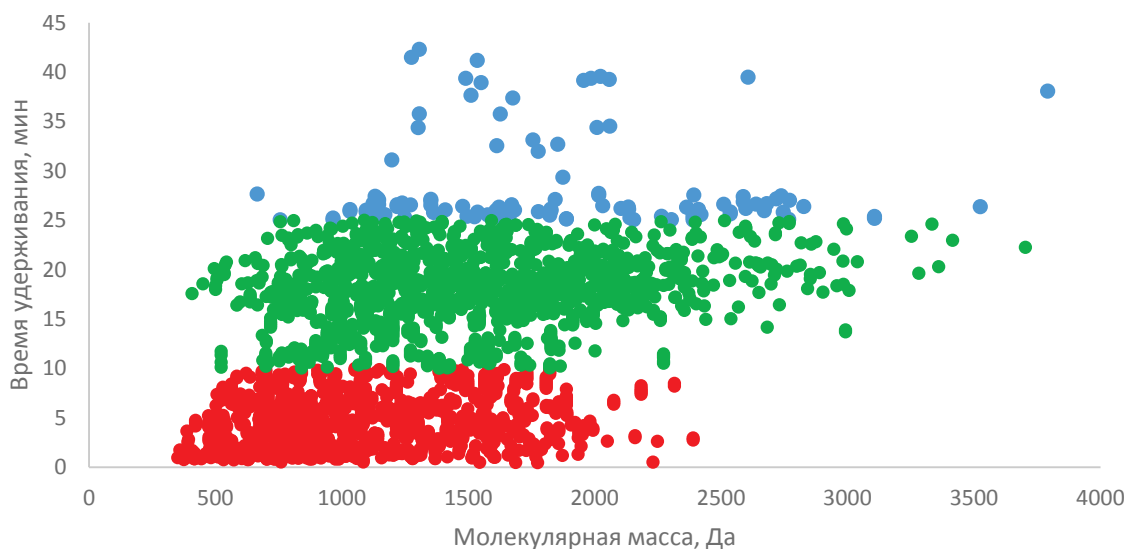


Рисунок 1. 2D- масс-спектрограмма пептидной фракции экстракта секреторной жидкости *Clarias gariepinus*

используемого сырья. Одним из основных условий полного выделения пептидов кожного секрета является эффективное диспергирование вязко-текучей массы слизи в водно-солевом растворе.

Белково-пептидная природа выделенного экстракта была подтверждена методом ИК-спектроскопии. Были найдены следующие характеристические полосы поглощения: амид А – ок. 3300, амид В – ок. 3100, амид I – 1654; амид II – 1504 см⁻¹. Приведенные полосы однозначно указывают на белковую природу полученного продукта, что дополнительно подтверждалось сравнением полученного спектра с библиотечными аналогами.

Полученные серии многозарядных ионов для анализируемых пиков также подтверждают пептидную природу анализируемых веществ. В частности, в исследованных экстрактах обнаруживается «пептидный шум» с диапазоном масс порядка 500-3500 Да, в котором наблюдаются особенно интенсивные молекулярные ионы, соответствующие молекулярным массам: 665,72, 681,698, 876,65, 892,62, 2637,43, 2661,27, 2844,35. Из пептидов более высокого массового диапазона (до 10000 Да) наибольшей интенсивностью отличаются ионы, соответствующие Mw – 8930,5 Да.

Результаты МС-экспериментов представлены в виде двумерной (2D) масс-спектрограммы. Каждая точка 2D-спектрограммы соответствует пептиду: по оси «Х» отложено значение молекулярной массы этого пептида, а по оси «У» – значение хроматографического времени удерживания пептида, характеризующее скорость прохождения пептида через хроматографическую колонку.

Анализ расположения точек на объединенной 2D-масс-спектрограмме пептидной фракции экстракта секреторной жидкости показывает, что в составе преобладают хорошо удерживаемые пептиды с молекулярной массой 2000-3000 Да, а также более короткие гидрофильные пептиды.

Полученные в результате высокоэнергетической фрагментации, индуцированной столкновением (HCD), масс-спектры были проанализированы посредством тандемной МС.

Последовательности пептидов определяли с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Scientific) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей UniProt (uniprot-catfish+AND+organism_Clarias+gariepinus+[13013]). Программно было найдено 14547 пептидных последовательностей, относящихся к 131 группе белков. Пептиды с максимальной достоверностью секвенирования приведены в таблице 1.

Показано, что экстракт секреторной жидкости содержит большое количество пептидов, относящихся к различным классам белков протеома *Clarias gariepinus* (бета-актины, семейство цитохрома, белки теплового шока, миостатин, НАДН-дегидрогеназный комплекс и др.), которые определяют широкий набор описанных ранее биологических свойств, характерных для кожного секрета рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была предпринята попытка выделения и анализа пептидной фракции довольно перспективного объекта – секреторной жидкости (слизи) клария угревидного. В результате – подтверждена пептидно-белковая природа полученного экстракта и осуществлен масс-спектрометрический анализ выделенной фракции.

Таблица 1. Примеры пептидов, выделенных из экстракта секреторной жидкости *Clarias gariepinus*

Пептид	UNIPROT	MH+, Да	t _R , мин
LTEAPLNPKANREKM	G9J5Z5;A0A075F7H2	1711,91775	17,58
MGQKDSYVGDEAQSQRGILT	A0A075F7H2	2183,07998	18,85
WISKQEYDESGPSIVHRK	A0A075F913	2159,09194	18,71
LTEAPLNPKANREKMTQ	G9J5Z5;A0A075F7H2	1941,02236	17,46
LRVAPEEHPVL	G9J5Z5;A0A075F7H2	1259,70938	20,52
DDAPRAVFPISVGRPRHQG	A0A075F7H2	2075,09047	20,77
SGGTTMYPGIADRMQKE	A0A075F913	1841,85294	20,23
KAGFAGDDAPR	A0A075F7H2	1104,54435	2,57
RVAPPEEHPVL	G9J5Z5;A0A075F7H2	1146,62885	17,84
LSIEKASSHLQGGAKRVVVS	Q98TW5	2066,17959	19,38
TLIAYKNGKLGVNAEHSWADAPIVgh	A0A2K9YCM2	2760,45693	19,84
YALPHAILR	G9J5Z5	1053,62180	21,48
LTEAPLNPKANREK	G9J5Z5;A0A075F7H2	1580,87490	8,28
RDVVKQLLPK	A0A023NM74	1195,74131	20,84
RLPPISYTGRFTLE	Q8JIX2	1649,88462	21,73
AMNPTNTIFDAKRLIGRR	A1YAQ6	2074,13222	18,28
VVDNGSGMCK	A0A075F7H2	1009,44481	1,99
ISNLANLALP	A0A342KC26	1025,60063	19,84

Пептид	UNIPROT	MH+, Да	t _R , мин
SLAPSTMKIKIAPPERK	A0A075F913	1980,16860	21,54
FPETWGGGSVKVYVLYy	A0A0K0TNJ2	1899,98391	16,64
KTKRRREIESLVIDSp	A0A2K9YCK5	1926,11831	18,46
WDDMEKIWHHTF	A0A075F7H2	1644,72818	24,45
GHLSVFKNSTWDHIMHKFVIGHLKG	A0A142I5D6	2888,51674	19,70
SYVGDEAQSKRGILT	A0A075F7H2	1623,83255	18,88
DEELLDGSLDSVDLKKDLQIP	A0A482G8P2	2342,17641	20,97
FAGDDAPR	A0A075F7H2	848,39012	2,39
MAGGVDTTAVPLQFAL	G3EBT3	1590,82560	3,93
GERQLVKVVKWAKGLPg	A3QQ63	1864,12758	19,40
ETPTFTTAARFRVAATLVLFVFAAa	O42329	2670,46230	25,96
DVLCEFTDSSGHVDALDFLRVVDV	D7PC79	2853,35390	19,52
KNDPPMEAGTFTAQVII	A0A2K9YCN9	1831,93203	16,65
AVFPSIVGRPRHQG	A0A075F7H2	1520,84534	19,92
LMACAQTGSGKTA AFLPI	D9Z8J0	1892,98537	16,60
LAGPDGTAEIEIKDNI	A0A3R5SGA5	1654,85525	16,24
LLKDTRSIEn	E7BTQ2	1187,66343	19,90
KSSAVYHVLKSSNYVARF	D7PC79	2056,08022	17,68
NKFPRYVGAGGGFGPVAd	A0A2K9YCM2	1807,92251	17,09
VII LNHPGQIS	A0A2K9YCN9	1190,68804	21,06
NNAVIRVQHLHLQAAKMM	A3FMP7	2074,13222	18,28
VRVELLLGSPL	A0A0D3QG04	1195,74131	20,84
MLWAPMPIPNPVADMNLGm	A0A0K0TN18	2097,00112	16,97
VSGEPLTLDEVLN	G8I0Y9	1488,73798	19,65
LTALGLASVFIGGWAGLNQTQL	A0A342KC34	2230,24502	22,42
ATPLSQGQVALRr	C5HYK6	1395,81223	24,87
FFINLIPLIIF	A0A0K0TNJ6	1349,82813	19,74
RTNANEATRKASVGL	A0A2P1IUK5	1716,90395	16,05
LPGPYWLLGLGP	D7PC79	1282,72931	22,72
YMKPLLVGELASep	A0A142I5D6	1632,86094	24,16
SVVSNINSPVTTPL	Q8JIX2	1590,82505	4,49
LRERSGFTVRP	E7BTQ2	1317,73862	2,73
TGATILLLCVLIEIGQ	P53542	1656,95461	19,15
SRAAPHVRKLCEKYGVVYQ	A0A142I5D6	2204,16469	19,71
YLMIVWMGPKYMRNRQ	Q68YU2	2086,04349	17,75
YVGDEAQSKRGILT	A0A075F7H2	1536,80344	17,93
YALPHAIL	G9J5Z5	897,52056	23,97
QLNIDFRDVDL GELSSDVISH	E2FHQ1	2372,17690	17,61
AVYSILGSGWASNKYALIGALRAVAQTISYE	A0A0K0TN18;A0A342KC35	3359,78579	20,30
ADAAQKPPYSYVALi	G3EBS8	1605,85910	21,42
FAGDDAPRA	A0A075F7H2	919,42717	4,96
FTLLQVDITQPq	F4Y9J7	1401,76865	18,99
LKYPIE	A0A075F7H2	762,43926	19,00
TPTLILHNFSNMLGFF	A0A0K0TNJ6	1851,94741	16,12
KLTGRVLSL SFDAPGRILWAGDDRGSI FSF	F4ZZV6	3281,75454	19,64
QIPINEKELLv	D7PC79	1294,76355	24,94
LRLTKNGITEVERNAFNG	Q9PW16	2032,09037	26,46
KKSQSDVVG GALAPLALPTK	A0A2P1IUL2	1980,16860	21,54
VAFQFTVSPDGIDLQLSHEa	A0A2K9YCK4	2173,07729	17,66
GLMMVTIGLNQPQLAFLH	A0A0K0TNJ6	1983,03879	18,10
KEITSLAPSTMKIK	A0A075F913	1546,88198	6,74
LEVKISEVPKRTRRe	A0A023NM74	1839,08364	18,54
DEELLDGSLDSVDLKKDLQIPE	A0A482G8P2	2471,22304	21,21

Нами выделены пептиды, относящиеся к семействам белков обладающих совершенно различным функционалом свойств. Поэтому перспективным представляется сужение рамок поиска пептидных фракций, относящихся к белково-пептидному пулу, проявляющему определенный вид биологической активности. С этой точки зрения, актуальной задачей является не идентифицировать все программно найденные пептидные последовательности (14547), а попытаться сузить границы поиска путем выделения более узких массивов пептидных фракций, с последующим определением возможной биологической активности каждой из них. Для этого планируется методом препаративной хроматографии выделить узкие фракции пептидного пула и, в случае выявления у данной фракции биологически-активных свойств, последующего определения ее точного пептидного состава.

Список литературы / References:

1. Артеменко К.А., Самгина Т.Ю., Дойл Дж Р., Льюеллин Л.Е., Билусич Д., Бови Дж Х., Лебедев А.Т. Защитные пептиды, выделенные из кожного секрета европейской озерной лягушки *Rana ridibunda*. *Масс-спектрометрия*, 2007, т. 4 (2), с. 79-88. [Artemenko K.A., Samgina T.Yu., Dojl Dzh R., L'yuellin L.E., Bilusich D., Bovi Dzh H., Lebedev A.T. Zashchitnye peptidy, vydelennye iz kozhnogo sekreta evropejskoj ozernoj lyagushki *Rana ridibunda*. *Mass-spektrometriya*. 2007, vol. 4 (2), pp. 79-88. (In Russ.)]
2. Xiao Mei Wang, Wei Dai, Ke Zhing Xing, Tian Jun Li, Xin Wang Antibacterial activities of antibacterial proteins/peptides isolated from organs and mucus of *Clarias gariepinus* reared at high stocking density. *Advanced Materials Research*, 2012, pp. 455-460.
3. Chen Cheng-xun Research on the isolation and purification of antimicrobial peptide in the surface mucus of catfish body and its antimicrobial activity. *J. of Anhui Agricultural Sciences*, vol. 26, 2010.
4. Tingtin Li, Quanwei Liu, Dangfeng Wang, Jianrong Li Characterization and antimicrobial mechanism of CF-14, a new antimicrobial peptide from the epidermal mucus of catfish. *Fish and shellfish immunology*, vol. 92, 2019, pp. 881-888.
5. Фомина Л.Л., Кулакова Т.С., Жунина О.А., Ошуркова Ю.Л., Вайцель А.Э. Оценка гемостатической активности слизи кожи рыб *in vitro*. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*, 2018, № 4 (40), с. 7-11. [Fomina L.L., Kulakova T.S., Zhunina O.A., Oshurkova YU.L., Vajcel' A.E. Ocenka gemostaticheskoy aktivnosti slizi kozhi ryb *in vitro*. *Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii*, 2018, no. 4 (40), pp. 7-11. (In Russ.)]
6. Козыренко Е.А., Оттесен О., Амин А. Особенности распределения и химического состава слизистых клеток в эпидермисе атлантической трески *Gadus morhua* L. *Вестник МГТУ*, 2010, т. 13, № 4/1, с. 655-660. [Kozyrenko E.A., Ottesen O., Amin A. Osobennosti raspredeleniya i himicheskogo sostava slizistyh kletok v epidermise atlanticheskoy treski *Gadus morhua* L. *Vestnik MGTU*, 2010, vol. 13, no. 4/1, pp. 655-660. (In Russ.)]
7. Лебедева Н.Е., Головкина Т.В. Состав и некоторые свойства слизи растительноядных рыб как критерий стрессового состояния. *Вестник Моск. Ун-та*, 1987, сер. 16, № 4, с. 28-33. [Lebedeva N.E., Golovkina T.V. Sostav i nekotorye svojstva slizi rastitel'noyadnyh ryb kak kriterij stressovogo sostoyaniya. *Vestnik Mosk. Un-ta*, 1987, iss. 16, no. 4, pp. 28-33. (In Russ.)]
8. Sangeetha Subramanian, Neil W Ross, Shawna L MacKinnon Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, vol. 150(1), pp. 85-92.
9. Ellis A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, no. 25, pp. 839.
10. Ingram G.A. Substances involved in the natural-resistance of fish to infection - a review. *J. Fish Biol.*, 1980, no. 16, pp. 23-60.

CHROMATO-MASS-SPECTROMETRIC STUDY OF SKIN SLIME PEPTIDES OF FISH WITHOUT SCALES**Merkulova N.L.¹, Grekhnyova E.V.¹, Chuikova S.V.², Malyshev V.N.²**¹Kursk State University*Radishcheva st. 33, Kursk, 305000, Russia; e-mail: grekhnyovaev@yandex.ru*²Limited Liability Company «Aquatetechnologies»,*Malinovaya st. 66, Kursk, 305023, Russia*

Abstract. In this work, the isolation and analysis of the peptide fraction of the secretory fluid of *Clarias gariepinus* was carried out. Isolation was carried out by reprecipitation methods and was accompanied by intermediate purifications on sorbents. The peptide nature of the isolated fraction was confirmed by IR spectroscopy. Mass spectrometric analysis of the peptide fraction of the secretory fluid extract showed that well-retained peptides with a molecular weight of 2000-3000 Da, as well as shorter hydrophilic peptides predominate in the composition. Peptide sequences were determined using Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Scientific) using the UniProt amino acid sequence database (uniprot-catfish + AND + organism__Clarias + gariepinus + [13013]). 14547 peptide sequences belonging to 131 protein groups were found programmatically. It was shown that secretory fluid extract contains a large number of peptides belonging to various classes of *Clarias gariepinus* proteome proteins (beta-actins, cytochrome family, heat shock proteins, myostatin, NADH-dehydrogenase complex, etc.), which determine a wide range of biological properties characteristic for skin secretion of fish. Further study of the skin secretion of *clarius* seems promising in terms of fractionation of the peptide pool and determination of the pharmacological activity of a narrower fraction.

Key words: *Clarias gariepinus, skin secretion, peptide fractions, mass spectrometry, sequencing.*