

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОПЕПТИДОМИКИ (ОБЗОР)

Е.А. Тепляшина

к.б.н., доцент,

кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: elenateplyashina@mail.ru

Р.Я. Оловяникова

к.б.н.

Е.В. Харитонова

к.фарм.н., ст. преподаватель,

кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: ekaterinav1201@gmail.com

О.Л. Лопатина

д.б.н., профессор, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: ol.lopatina@gmail.com

В.А. Кутяков

к.б.н., доцент,

кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: victor-koutjakov@yandex.ru

С.И. Пащенко

ассистент,

кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: psi51@mail.ru

Е.А. Пожиленкова

к.б.н., доцент,

кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: elena.a.pozhilenkova@gmail.com

А.Б. Салмина

д.м.н, профессор, зав. кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии,
Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск)

E-mail: allasalmina@mail.ru

Адаптация организма человека к изменчивым факторам внутренней и внешней среды невозможна без нормальной регуляции деятельности органов и систем. Нейропептиды – биологически активные соединения, синтез которых происходит преимущественно в клетках центральной нервной системы, играют определяющую роль в механизмах памяти, обучения, сна, регулируют процессы обмена веществ, поддержания гомеостаза. Эти соединения используются в качестве лекарственных препаратов – нейропротекторов при нейродегенерации.

Проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, содержащей информацию о современном состоянии и перспективах развития нейропептидомики, ориентированной на изучение спектра пептидов головного мозга в норме и при патологии. Нейропептиды являются регуляторами функциональной активности клеток центральной нервной системы в норме и при патологии, активно участвуя в патогенезе нарушений развития, ишемического и травматического повреждения головного мозга, хронической нейродегенерации. Авторами рассмотрены возможности применения модификаций различных аналитических методов (хроматографических, масс-спектрометрических и хромато-масс-спектрометрических) и их комбинаций в биомедицинских исследованиях и при поисках биомаркеров. Пептидомика позволяет получить информацию о белках малой массы и продуктах протеолитической деградации белков.

Нейропептиды обладают избирательной проницаемостью через гематоэнцефалический барьер, поэтому комплекс пептидов может служить индикатором патологических процессов и использоваться в качестве маркеров ранних стадий заболевания или медиаторов патологических процессов. Из множества чувствительных и специфичных методов исследования нейропептидов масс-спектрометрия (МС) становится ведущей технологией в пептидомике. Эта платформа идеально подходит для анализа метабо-

лизма лекарственных средств, терапевтического мониторинга лекарственных средств, протеомики, метаболомики, анализа объектов окружающей среды, пищевой продукции, токсикологии и клинических применений.

Таким образом, одной из важнейших прикладных целей нейропептидомики является лабораторная диагностика новых биомаркеров, обладающих ультрачувствительностью, высокой специфичностью и прогностической значимостью для создания новых алгоритмов диагностики и для оценки риска развития заболевания в контексте превентивной персонализированной медицины.

Ключевые слова: протеомика, пептидомика, нейропептиды, нейродегенерация.

Для цитирования: Тепляшина Е.А., Оловяникова Р.Я., Харитонов Е.В., Лопатина О.Л., Кутяков В.А., Пашенко С.И., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. Теоретические и технологические основы нейропептидомики (обзор). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(10):3–11. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-01>

Нейропептиды регулируют функциональную активность клеток центральной нервной системы в норме и при патологии, будучи вовлеченными в молекулярный патогенез нарушений развития головного мозга, хронической нейродегенерации, ишемического и травматического повреждения головного мозга. Нейропептиды являются предметом изучения одного из разделов протеомики – пептидомики. В настоящее время протеомика позволяет охарактеризовать количественный и качественный состав белков клеток, тканей и организма в целом [1]. В свою очередь пептидомика имеет аналогичную методическую базу и рассматривается как раздел протеомики, анализирующий белки малой массы (< 10 кДа), а также весь набор продуктов их протеолитической деградации *in vivo* и *in vitro* [2].

Кроме пептидов, выполняющих достаточно специфические функции (гормоны, нейропептиды, цитокины или факторы роста), биологические ткани и жидкости содержат довольно мощный пептидный «фон», состоящий в основном из фрагментов более крупных функциональных белков. Они часто служат индикаторами нормальных или патологических процессов, что может быть использовано при выявлении новых маркеров ранних стадий заболевания или медиаторов патологического процесса.

Экспериментальная пептидомика позволила обнаружить хорошо воспроизводимые при нормальных условиях пептидные пулы мозга, сердца, лёгких и других органов, которые отличаются между собой у одной особи, но примерно совпадают у разных особей. Механизм образования пептидных пулов проще всего выяснять на культурах клеток, потому что, в отличие от целых тканей и органов, имеются данные, что пептиды генерируются именно этим типом клеток, а не каким-то другим (или вообще не являются артефактом выделения из тканей). Действие компонентов пепти-

дома можно рассматривать как комплексное, то есть осуществляемое сразу всем ансамблем пептидов [2], однако мишени действия большинства «теневых» пептидов мало изучены.

ОБЩИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕПТИДОМИКИ

Возможность анализа пептидомов до определенного времени была поставлена под сомнение из-за проблем, связанных с неспецифическим расщеплением белков и пептидов протеазами во время подготовки образца, и сложностей, сопряженных с обработкой полученных данных [3]. Это привело к разработке новых методов пробоподготовки с целью точной идентификации новых потенциальных нейропептидов. Ряд проведенных ранее исследований показал, что тепловая инактивация, выполненная различными способами (например, сфокусированное микроволновое излучение [4], или контролируемое нагревание образца [5] в значительной степени предотвращают образование протеолитических пептидных фрагментов по сравнению с традиционными протоколами, основанными на мгновенном замораживании [6, 7].

К основным методам анализа белковых и пептидных молекул можно отнести метод масс-спектрометрии в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), метод иммунохимического тестирования с различными модификациями, микросеквенирование (для определения первичной структуры белковых фрагментов), электрофорез в полиакриламидном геле и другие методы разделения белков и пептидов [8].

С развитием технологий – разработкой более чувствительных детекторов, скорости работы ионных ловушек и квадрупольей, сопряженной масс-спектрометрии, высокопроизводительных методик хроматографии – появилась возможность определять низкомолекулярные соединения, пептиды и белки в значительно более низких концентрациях,

предшествующих клиническому проявлению патологических состояний. В последние годы концентрация пептида в пробе, необходимая для анализа, снизилась на несколько порядков – от нано до аттомоля; время, необходимое для анализа, – от нескольких часов до миллисекунд; разрешение масс-спектров возросло от 1 до 100 тысяч; точность определения массы – от 1000 до 5 ppm; вместо обычного квадрупольного используют гибридный анализатор, а эффективность количественного определения достигается применением метода множественных изотопов [9].

Методологическая платформа пептидомики включает в себя отбор аналитического образца, экстракцию (обогащение), разделение, детекцию, обработку данных, формирование отчета (рис. 1). В качестве образцов могут быть использованы ткани органов, биологические жидкости (например, тканевая жидкость, ликвор, плазма/сыворотка крови, питательная среда, в которой культивируются клетки и ткани *in vitro*). Экстракция пептидов достигается использованием фильтрации, осаждения денатурирующими растворителями, твердофазной экстракции, хроматографических и других методов. Для разделения белков и пептидов применяются, в частности, обращенно-фазовое разделение, многомерная белковая идентификация и др. Характерным отличием протеомики от пептидомики является наличие стадии протеолиза белков с помощью трипсина или других эндопептидаз [2].

Эффективность детекции пептидных соединений доказана после применения изотопного разделения, электроспрейной ионизации с тандемной масс-спектрометрией (ESI-MS/MS), матрично-ассоциированной времяпролетной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/TOF), жидкостной хроматографии с последующей матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (LC-MALDI).

Разнообразные программы обработки данных: SEQUEST (программа анализа данных тандемной масс-спектрометрии), MASCOT (программа обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии), PCA (компонентный анализ), PLS-DA (метод дискриминационного анализа наименьших квадратов), кластерный анализ и другие стратегии, предназначенные для определенных целей, позволяют идентифицировать, определить последовательности аминокислот, детектировать биомаркеры пептидного происхождения.

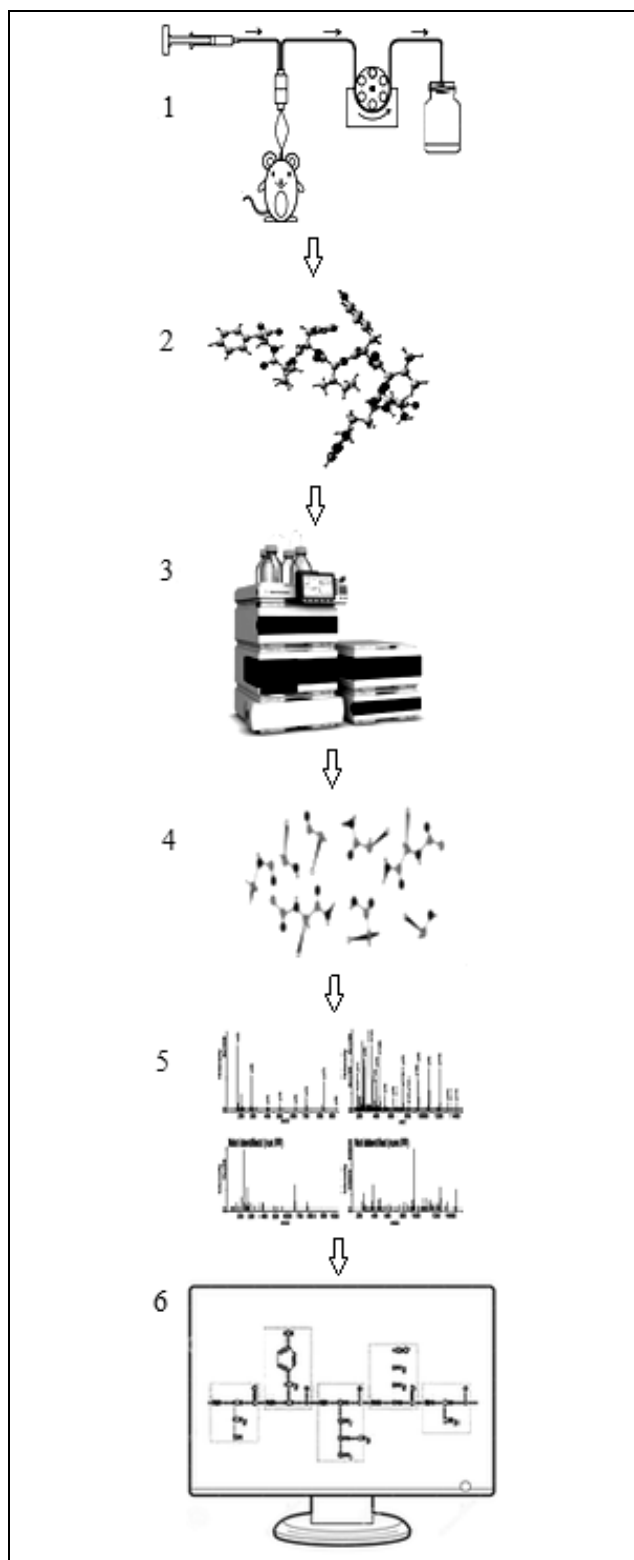


Схема пробоподготовки и исследования пептидов: 1 – отбор пробы (проведение микродиализа); 2 – протеолиз белков и экстракция; 3 – разделение пептидов (методами ВЭЖХ, капиллярного электрофореза); 4 – ионизация, идентификация (масс-спектрометрия); 5 – количественный анализ (метод изотопной метки, оценка без маркировки); 6 – обработка результатов

Для установления структуры пептидов в настоящее время наиболее информативными являются следующие технологии:

масс-спектрометрия (МС) – определяет последовательности, посттрансляционные модификации (ПТМ) и структурную информацию;

прогнозирование *in silico* – прогнозирует последовательности и структуру пептида из белка-предшественника и последовательность генов;

спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) – предоставляет информацию о конформации пептида;

спектроскопия – использует характерные пики для определения шаблонов складывания;

рентгеновская кристаллография – характеризует ключевые структурные узлы с высоким пространственным разрешением.

Для получения информации о структуре, функциях и локализации нейропептидов необходимо сочетание нескольких технологических подходов: например, структурные особенности соединений изучаются с помощью масс-спектрометрии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса, вычислительного прогнозирования; локализация пептидов устанавливается посредством иммуногистохимии и MALDI; для понимания функциональности используются количественная оценка, поведенческие исследования и электрофизиологические методы [10].

ESI-MS/MS наряду с MALDI-MS в режиме отсроченной экстракции (DE) стали стандартами в пептидомике. Способность MALDI-MS обеспечивать очень быстрый скрининг сотен образцов открывает новые возможности в анализе пептидов. Для преодоления химической дериватизации пептидов были разработаны и применены более подходящие новые масс-спектрометрические методы с использованием диссоциации, вызванной столкновением (CID). Кроме того, CID в сочетании с ESI-MS/MS обеспечивает гораздо более качественные данные без необходимости химической подготовки образцов, а также существенно увеличивает пропускную способность и скорость фрагментации [9].

Большую часть времени исследователя в области пептидомики занимают интерпретация данных, статистический анализ и проверка промежуточных результатов. LC-ESI-MS также стала основным инструментом для количественного определения, все более и более заменяя традиционные подходы, использующие иммунохимические ос-

новы, которые не обладают достаточной чувствительностью и/или специфичностью. Необходимая стандартизация достигается путем введения нескольких методов изотопного мечения, начатых с помощью изотопно-кодированных аффинных меток в 2002 г. [10].

Важно отметить, что количественное определение различий в количестве пептидов между образцами является одной из наиболее важных и сложных задач в пептидомике. Для этой цели можно использовать как меченое (изотопное и изобарическое), так и бесконтактное количественное определение.

Количественное определение пептида без маркировки: может быть выполнено путем извлечения интенсивности сигнала пептида или спектрального подсчета. Такая оценка часто считается менее информативной, однако метод имеет ряд преимуществ: не требует дополнительной пробоподготовки, позволяет использовать меньшие количества проб и может быть выполнен практически с любой аналитической платформой.

Изобарическая маркировка: позволяет мультиплексировать многие образцы в одном анализе, что улучшает пропускную способность и уточняет определение за счет ко-ионизации целевых пептидов. Основными схемами изобарной маркировки являются изобарические метки для относительного и абсолютного количественного определения (iTRAQ) и тандемные массовые метки. Спектры МС/МС можно анализировать с помощью свободно распространяемого программного обеспечения: i-Tracker и jTraQX [11].

Изотопная маркировка: количественное определение МС часто выполняется с изотопно-мечеными образцами. Преимущество изотопной маркировки перед изобарной заключается в том, что для проведения количественной оценки не требуется фрагментации пептида. Время цикла автоматизированного МС/МС обычно не дает фрагментировать все пептиды в образце, но маркировка изотопов позволяет первоначально количественно определять больше пептидов. С другой стороны, изотопно-меченые спектры более сложны для интерпретации результатов, поскольку число ионных сигналов увеличивается [12].

Глобальный анализ разнообразных нейропептидных структур методом пептидной тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) важен для определения первичных пептидных последовательностей в сочетании с ПТМ, которые характеризуют их

различные активные виды [13]. Высокопроизводительный анализ сотен и тысяч пептидов был усовершенствован с помощью технологии тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS в сочетании с биоинформатикой пептидов [14], что открывает новые возможности в идентификации широкого спектра нейропептидов в ткани головного мозга при различных его функциональных состояниях.

При исследовании очень коротких пептидов (2–4 остатка аминокислот), которые трудно поддаются идентификации методом LC-MS/MS, обычно обращаются к стратегиям метаболомики, которые могут быть идеально приспособлены для идентификации и количественного определения очень коротких пептидов, основанных на их низкомолекулярном весе и более гидрофильной природе, подходящей для метаболомики. Так, основной методикой для метаболомических анализов малых молекул служит метод GC-MS (gas chromatography mass spectrometry), но лучшие результаты получают, когда метаболомику объединяют с биоинформационными исследованиями.

В настоящее время перспективной технологией, которая применяется в молекулярной биологии и представляет собой один из современных способов детекции белковых молекул, является создание микрочипов. В основе белковых микрочипов лежат те же принципы, что и у традиционных методов иммуноферментного анализа, однако формат биочипа позволяет одновременно детектировать сотни белков с использованием малых объемов реагентов и образцов [15].

В процессе анализа с применением микрочипов экстрагированные из биологического материала и химически меченые белки или другие аналиты инкубируют с зондами на поверхности микрочипа. Далее осуществляют отмывку несвязавшихся лигандов и регистрацию процессов межмолекулярных взаимодействий с помощью флуоресцентных, люминесцентных, электрохимических и даже масс-спектрометрических методов. Создана разновидность микробиочипов для SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) или MALDI. Детекция белковых молекул с использованием таких микробиочипов дает возможность определять до 10 000 белков в одном образце, и при этом регистрируются даже незначительные изменения их концентрации. Использование микробиочипов является чувствительным методом, позволяющим разделять белки по конкретному критерию (например, молекулярная масса или суммарный заряд) [16].

Современная технология МС позволяет определять структуры аминокислотных последовательностей нейропептидов, профилировать множественные нейропептиды в нормальных и патологических условиях, а также количественно оценивать их содержание с целью использования в качестве биомаркеров для мониторинга эффективности терапии. Дополнительные протеомные исследования нейропептидных секреторных везикул информируют об особенностях синтеза, хранения и секреции нейропептидов [13].

ПЕПТИДОМИКА КАК ОСНОВА ДЛЯ РАЗВИТИЯ НЕЙРОПЕПТИДОМИКИ

Развитие пептидомики позволило идентифицировать тысячи эндогенных нейропептидов, происходящих из предшественников – пропептидов – и охватывающих практически все известные гипоталамические пептиды и их посттрансляционные модификации, включая как широко распространенное фосфорилирование серина, так и С-концевое амидирование. Доказано, что по сравнению с внутриклеточными белками в нейропептидах фосфорилирование серина более распространено. Идентифицированные сайты фосфорилирования отвечают законам стехиометрии и имеют конформацию S-x-E, вероятно, вследствие действия одной секреторируемой киназы Fam20C. Было идентифицировано более 100 сайтов фосфорилирования, из которых более половины не были описаны ранее [17].

Нейропептидомика может определять особенности ПТМ нейропептидов. Так, было продемонстрировано, что ПТМ, сопровождающие процессинг пронеуропептидов, могут включать N-концевое образование пироглутамата, окисление тиольных групп до дисульфидов, сульфатирование, ацетилирование, гликозилирование и другие реакции. Установлено, что протеолитический процессинг пронеуропептидов в активные пептиды происходит в парных сайтах основных остатков последовательностей *лиз-арг*, *арг-арг*, *арг-лиз* и *лиз-лиз*. Эти сайты обычно фланкируют NH₂- и COOH-концы пронеуропептидов [13]. Продемонстрировано, что протеолитический процессинг иногда происходит в одноосновных сайтах *Arg*, а также в многоосновных сайтах остатков. Процессинг на неосновных остатках происходит достаточно редко. Важно отметить, что ограниченный протеолиз на флангированных сайтах пронеуропептидов является ключевым процессом, необходимым для биосинтеза многочис-

ленных активных нейропептидов из неактивных предшественников [14].

В своем обзоре V. Hook с соавт. (2018) обращают внимание на то, что в указанных парных сайтах расщепления основных остатков участвуют цистеиновые протеазы катепсина L и катепсина V, а также сериновые субтилизин-подобные протеазы проконвертазы PC1/3 и PC2. Эти два протеазных пути включают последующие стадии процессинга пептидов экзопептидазами: аминопептидазой B (AP-B) и катепсином H (для удаления N-концевых основных остатков в полученных пептидных интермедиатах в сочетании с карбоксипептидазой E (CPE) (для удаления C-концевых основных остатков) соответственно. Например, катепсин V в клетках нейробластомы человека участвует в выработке энкефалина и нейропептида NPY, что проиллюстрировано в трансгенных моделях [13].

Elena Romanova и Jonathan V. Sweedler (2015) в своем исследовании проанализировали ряд протоколов и описали оптимизированный метод выделения нейропептидов и оценили ПТМ соответствующих белков. Выделение нейропептидов проводилось из гипоталамуса крысы, сразу после выделения ткани гипоталамуса образцы подвергали нагреву с целью получения гомогенных термически денатурированных клеток, в сочетании с добавлением ингибиторов протеаз. В качестве экстракционной среды использовали восстанавливающий денатурирующий буфер, содержащий 8 М мочевины. Нейропептиды были получены из крупных фрагментов белка, выделенных методом центрифугирования с использованием фильтров для частиц с массой 30 кДа. Также использовался метод жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Затем полученные данные обрабатывались с помощью качественного и количественного анализа [18]. Таким протоколом (продолжительность которого не превышала 1 ч) были идентифицированы 11509 модификаций специфических пептидных вариантов. Для оценки воспроизводимости была проведена иерархическая кластеризация из 1135 уникальных нейропептидов, картированных с предшественниками прогормональных белков и идентифицированных как минимум в двух из 12 образцов.

С появлением эффективных реагентов для меченя стал возможен количественный анализ пептидов. С использованием стабильного изотопного меченя нейропептиды из экспериментальных и контрольных образцов химически модифицируют-

ся путем добавления структурно идентичных функциональных групп, включающие разные изотопы одного и того же элемента. Таким образом, после меченя нейропептиды из образцов контрольной и экспериментальной групп значительно различаются по молекулярной массе [6, 19].

Действие обычных изотопных реагентов нацелено на N-терминальный конец NH₂-группы Lys (например, d0- или d6-уксусный ангидрид, d0- или d4-янтарный ангидрид (SA) и d0- или d9-триметиламмоний бутират) [5] или C-конец (например, d0- или d3-метанол) [19]. В разработанном протоколе меченя используется янтарный ангидрид для количественного определения пептидов, поскольку его применение позволяет получить стабильные продукты меченя с небольшими различиями по молекулярной массе [5].

Для измерения относительных уровней нейропептидов используют ВЭЖХ, разработанную для сверхпроизводительных LC-MS/MS приложений. Данная технология производит автоматическую калибровку массы, интегрирование и настройку образца, инициализацию SIR/MRM-методов, выполнение теста в формате on-column. Возможности высокоэффективной хроматографии повышают способность дифференцировать меченые (нейро)пептиды в биологических образцах [20].

Таким образом, многообразие современных технологических подходов позволяет идентифицировать пептиды в исследуемых образцах с высокой чувствительностью, селективностью и скоростью. Это принципиально важно для определения нейропептидов в ткани головного мозга и в биологических жидкостях, изменение количественного и качественного состава которых быстро меняется в зависимости от функционального состояния клеток нейрональной и глиальной природы, интенсивности процессов нейропластичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи нейропептидомии весьма сложны и многообразны, так как нейропептиды пространственно, временно и химически неоднородны, что затрудняет их предсказание *in silico*. Зрелые, функционально компетентные нейропептиды продуцируются путем сложного ферментативного процессинга предшественников протеинов/прогормонов через ряд ПТМ, приводя к множеству конечных пептидных продуктов при экспрессии одного гена, кодирующего пропептид. Несмотря на то, что существует несколько методов целевых исследований

пептидов, для этой задачи идеально подходит масс-спектрометрия с ее качественными и количественными возможностями, которая обеспечивает быстрый, чувствительный, точный и высокопроизводительный пептидомный анализ нейропептидов, не требуя предварительного знания пептидных последовательностей. Поддерживаемая с помощью разделительной жидкостной хроматографии и биоинформатики, МС быстро становится ведущей технологией в нейропептидомике.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (проект № 2547.2020.7).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кутяков В.А., Харитонова Е.В., Оловяникова Р.Я., Салмина А.Б. Современное состояние и перспективы применения методов протеомики в химико-токсикологическом анализе (обзор). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019; 22(9): 47–52.
2. Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. Биоорганическая химия. 2011; 37(2): 199–215.
3. Li L., Sweedler J.V. Peptides in the brain: mass spectrometry-based measurement approaches and challenges. Annu. Rev. Anal. Chem. 2008; 1: 451–483.
4. Nylander I., Stenfors C., Tan-No K., Mathe A.A., Terenius L.A. Comparison between microwave irradiation and decapitation: basal levels of dynorphin and enkephalin and the effect of chronic morphine treatment on dynorphin peptides. Neuropeptides. 1997; 31: 357–365.
5. Che F.Y., Lim J., Pan H., Biswas R., Fricker L.D. Quantitative neuropeptidomics of microwave-irradiated mouse brain and pituitary. Mol. Cell Proteomics. 2005; 4: 1391–1405.
6. Che F.Y., Fricker L.D. Quantitative peptidomics of mouse pituitary: comparison of 32 different stable isotopic tags. J. Mass. Spectrom. 2005; 40: 238–249.
7. Svensson M., Boren M., Sköld K., Fälth M., Sjögren B., Andersson M., Svenningsson P., Andren P.E. Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. J. Proteome. Res. 2009; 8: 974–981.
8. Чугунов А.О. Неизвестные пептиды: «теневая» система биорегуляции. Наука и жизнь. 2010; 26–31.
9. Schrader M., Fricker L. Peptidomics: Methods and Strategies. Methods in Molecular Biology. 1-st ed. Springer, Berlin. 2018. 423 p.
10. DeLaney K., Buchberger A.R., Atkinson L., Gründer S., Mousley A., Li L. New techniques, applications and perspectives in neuropeptide research. Journal of Experimental Biology. 2018. 221 p.
11. Muth T., Keller D., Puetz S.M., Martens L., Sickmann A., Boehm A.M. jTraQX: a Free, Platform Independent Tool for Isobaric Tag Quantitation at the Protein Level. Proteomics. 2010; 10(6): 1223–1225.
12. Dallas D.C., Guerrero A., Parker E.A., Robinson R.C., Gan J., German J.B., Barile D., Lebrilla C.B. Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. Proteomics. 2015; 15(0): 1026–1038.
13. Hook V., Lietz C., Podvin S., Cajka T., Fiehn O. Diversity of Neuropeptide Cell-Cell Signaling Molecules Generated by Proteolytic Processing Revealed by Neuropeptidomics Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2018; 29(5): 807–816.
14. Yin P., Hou X., Romanova E.V., Sweedler J.V. Neuropeptidomics: Mass Spectrometry-Based Qualitative and Quantitative Analysis. Methods in Molecular Biology. 2011; 789: 223–236.
15. Четкин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики. Российские нанотехнологии. 2006; 1(1–2): 13–18.
16. Терентьев А.А., Молдогазиева Н.Т., Шайтан К.В. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки. Белок-белковые взаимодействия. Успехи биологической химии. 2009; 49: 429–480.
17. Secher A., Kelstrup C.D., Conde-Frieboes K.W., Pyke C., Raun K., Wulff B.S., Olsen J.V. Analytic framework for peptidomics applied to large-scale neuropeptide identification. Nat. Commun. 2016; 7: 11436.
18. Romanova E.V., Sweedler J.V. Peptidomics for the discovery and characterization of neuropeptides and hormones. Trends in Pharmacological Sciences. 2015; 36(9): 579–585.
19. Goodlett D.R., Keller A., Watts J.D., Keller A., Newitt R. Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001; 15: 1214–1221.
20. Kinter M., Sherman N.E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. John Wiley & Sons, Inc. New York. 2000.

Поступила 10 июня 2020 г.

THEORETICAL AND TECHNOLOGICAL FOUNDATIONS OF NEUROPEPTIDOMICS (REVIEW)

© Authors, 2020

E.A. Teplyashina

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,
Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
E-mail: elenateplyashina@mail.ru

R.Ya. Olovyannikova

Ph.D. (Biol.)

E.V. Kharitonova

Ph.D. (Pharm.), Senior Lecturer,
Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
E-mail: ekaterinav1201@gmail.com

Lopatina O.L.

Dr.Sc. (Biol.), Professor,
Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
Email: ol.lopatina@gmail.com

V.A. Kutyaev

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,
Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
E-mail: victor-koutjakov@yandex.ru

S.I. Pashchenko

Assistant,
Department of Biological Chemistry with a course in medical, pharmaceutical and toxicological chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
E-mail: psi51@mail.ru

E.A. Pozhilenkova

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,
Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
Email: elena.a.pozhilenkova@gmail.com

A.B. Salmina

Dr.Sc. (Med.), Professor,
Head of the Department of Biological Chemistry with a Course in Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,
Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk)
E-mail: allasalmina@mail.ru

Adaptation of the human body to the changing factors of the internal and external environment is impossible without the normal regulation of the activity of organs and systems. Neuropeptides - biologically active compounds, the synthesis of which occurs mainly in the cells of the central nervous system, play a decisive role in the mechanisms of memory, learning, sleep, regulate metabolic processes, maintain homeostasis. These compounds are used as drugs - neuroprotective agents for neurodegeneration.

The analysis of domestic and foreign literature containing information on the current state and development prospects of neuropeptidomics, focused on the study of the spectrum of brain peptides in normal and pathological conditions. Neuropeptides are regulators of the functional activity of central nervous system cells in normal and pathological conditions, actively participating in the pathogenesis of developmental disorders, ischemic and traumatic brain damage, and chronic neurodegeneration. The authors consider the possibility of using modifications of various analytical methods (chromatographic, mass spectrometric and chromatographic-mass spectrometric) and their combinations in biomedical research and in the search for biomarkers.

Peptidomics provides information on low-mass proteins and products of proteolytic degradation of proteins.

Neuropeptides have selective permeability through the blood-brain barrier, therefore, a complex of peptides can serve as an indicator of pathological processes and can be used as markers of the early stages of the disease or mediators of pathological processes. Of the many sensitive and specific methods for studying neuropeptides, mass spectrometry is becoming the leading technology in peptidomics. This platform is ideal for analysis of drug metabolism, therapeutic monitoring of drugs, proteomics, metabolomics, analysis of environmental objects, food products, toxicology and clinical applications.

Thus, one of the most important applied goals of neuropeptidomics is the laboratory diagnosis of new biomarkers with ultra-sensitivity, high specificity and prognostic value for creating new diagnostic algorithms and for assessing the risk of developing a disease in the context of preventive personalized medicine.

Key words: proteomics, peptidomics, neuropeptides, neurodegeneration.

For citation: Teplyashina E.A., Olovyanikova R.Ya., Kharitonova E.V., Lopatina O.L., Kutjakov V.A., Pashchenko S.I., Pozhilenkova E.A., Salmina A.B. Theoretical and technological foundations of neuropeptidomics (review). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(10):3–11. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-01>

REFERENCES

1. Kutjakov V.A., Haritonova E.V., Olovyanikova R.Ja., Salmina A.B. Sovremennoe sostojanie i perspektivy primeneniya metodov proteomiki v himiko-toksikologicheskom analize (obzor). *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. 2019; 22(9): 47–52.
2. Govorun V.M., Ivanov V.T. Proteomika i peptidomika v fundamental'nyh i prikladnyh medicinskih issledovanijah. *Bioorganicheskaja himija*. 2011; 37(2): 199–215.
3. Li L., Sweedler J.V. Peptides in the brain: mass spectrometry-based measurement approaches and challenges. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2008; 1: 451–483.
4. Nylander I., Stenfors C., Tan-No K., Mathe A.A., Terenius L.A. Comparison between microwave irradiation and decapitation: basal levels of dynorphin and enkephalin and the effect of chronic morphine treatment on dynorphin peptides. *Neuropeptides*. 1997; 31: 357–365.
5. Che F.Y., Lim J., Pan H., Biswas R., Fricker L.D. Quantitative neuropeptidomics of microwave-irradiated mouse brain and pituitary. *Mol. Cell Proteomics*. 2005; 4: 1391–1405.
6. Che F.Y., Fricker L.D. Quantitative peptidomics of mouse pituitary: comparison of 32. different stable isotopic tags. *J. Mass. Spectrom.* 2005; 40: 238–249.
7. Svensson M., Boren M., Sköld K., Fälth M., Sjögren B., Andersson M., Svenningsson P., Andren P.E. Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. *J. Proteome. Res.* 2009; 8: 974–981.
8. Chugunov A.O. Neizvestnye peptidy: «tenevaja» sistema bioreguljacji. *Nauka i zhizn'*. 2010; 26–31.
9. Schrader M., Fricker L. Peptidomics: Methods and Strategies. *Methods in Molecular Biology*. 1-st ed. Springer, Berlin. 2018. 423 p.
10. DeLaney K., Buchberger A.R., Atkinson L., Grunder S., Mousley A., Li L. New techniques, applications and perspectives in neuropeptide research. *Journal of Experimental Biology*. 2018. 221 p.
11. Muth T., Keller D., Puetz S.M., Martens L., Sickmann A., Boehm A.M. jTraqX: a Free, Platform Independent Tool for Isobaric Tag Quantitation at the Protein Level. *Proteomics*. 2010; 10(6): 1223–1225.
12. Dallas D.C., Guerrero A., Parker E.A., Robinson R.C., Gan J., German J.B., Barile D., Lebrilla C.B. Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics*. 2015; 15(0): 1026–1038.
13. Hook V., Lietz C., Podvin S., Cajka T., Fiehn O. Diversity of Neuropeptide Cell-Cell Signaling Molecules Generated by Proteolytic Processing Revealed by Neuropeptidomics Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2018; 29(5): 807–816.
14. Yin P., Hou X., Romanova E.V., Sweedler J.V. Neuropeptidomics: Mass Spectrometry-Based Qualitative and Quantitative Analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2011; 789: 223–236.
15. Chechetkin V.R., Prokopenko D.V., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. Biochipy dlja medicinskoj diagnostiki. *Rossijskie nanotehnologii*. 2006; 1(1-2): 13–18.
16. Terent'ev A.A., Moldogazieva N.T., Shajtan K.V. Dinamicheskaja proteomika v modelirovanii zhivoj kletki. Belok-belkovye vzaimodejstvija. *Uspehi biologicheskoy himii*. 2009; 49: 429–480.
17. Secher A., Kelstrup C.D., Conde-Frieboes K.W., Pyke C., Raun K., Wulff B.S., Olsen J.V. Analytic framework for peptidomics applied to large-scale neuropeptide identification. *Nat. Commun.* 2016; 7: 11436.
18. Romanova E.V., Sweedler J.V. Peptidomics for the discovery and characterization of neuropeptides and hormones. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015; 36(9): 579–585.
19. Goodlett D.R., Keller A., Watts J.D., Keller A., Newitt R. Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 1214–1221.
20. Kinter M., Sherman N.E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. John Wiley & Sons, Inc. New York. 2000.