

УДК 543.5:547.96:577.112

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ПРОСТРАНСТВА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2011 г. А. П. Ильина*, О. Г. Куликова*, Д. И. Мальцев*, М. С. Краснов**, Е. Ю. Рыбакова**, В. С. Скрипникова**, Е. С. Кузнецова***, А. К. Буряк***, В. П. Ямскова**, И. А. Ямсков*

* *Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991*
e-mail: Yamskov@mail.ru

** *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334*
e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

*** *Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991*
e-mail: AKBuryak@ipcjrssi.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) проведен анализ пептидов, входящих в состав ранее не изученных биорегуляторов, выделенных из межклеточного пространства тканей различных органов млекопитающих, а также растений и грибов. В исследовании были включены 15 различных тканей млекопитающих, 13 видов растений и 2 вида грибов. На примере исследования биорегуляторов, выделенных из разных тканей глаза, было показано, что в их состав входят пептидные компоненты с одинаковыми значениями молекулярных масс. В состав биорегуляторов, выделенных из тканей различных органов млекопитающих или разных видов растений и грибов входят пептиды с различными значениями молекулярных масс. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения об основной функции биорегуляторов данной группы – участии в регуляции органно-тканевого гомеостаза в биологических системах.

В различных тканях млекопитающих и растений была обнаружена новая, ранее не изученная группа биорегуляторов, которые в сверхмалых дозах (10^{-8} – 10^{-15} мг белка/мл) оказывают влияние на миграцию и адгезию клеток, клеточную пролиферацию и дифференцировку. Показано, что свойство биорегуляторов данной группы стимулировать восстановление и репарацию в патологически измененных тканях связано с их способностью дополнительно активировать клеточные источники регенерации [1–10]. На основании своеобразия их свойств и активности данные биорегуляторы выделены в отдельную группу мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ).

Установлено, что МГТБ в сверхмалых дозах стимулируют восстановительные процессы в патологически измененных тканях, а их биологическая активность характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности. На основе МГТБ разработаны и применяются в медицине фармакологические препараты, например, Адгелон для лечения кератопатий различной этиологии, заболеваний суставов и переломов. Большие перспективы использования МГТБ обуславливают большой интерес к их поиску и выделению из различных биологических объектов (млекопитающие, растения, микроорганизмы и т.д.).

К настоящему времени установлено, что МГТБ имеют сложный состав: методом ЯМР было показа-

но присутствие в них не только белковой, но также углеводной и липидной компонент, однако остается не известной их функциональная значимость в составе МГТБ [6, 11–13]. Наиболее изучена белковая компонента МГТБ – пептиды (мол. масса 1–8 кДа), ответственные за их активность, а также белки-модуляторы, оказывающие влияние на биологическое действие пептидов и взаимодействующие с ними по Ca^{+2} -связывающему механизму [13, 14]. Кроме того, установлено, что МГТБ имеют внеклеточную локализацию, например, МГТБ, выделенный из печени крысы, локализован в ней в области синусоида, МГТБ, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота, – в межгепатоцитарном пространстве; из сетчатки глаза быка – на поверхности отростков фоторецепторов, а МГТБ, выделенный из листьев подорожника большого, – в межклеточном пространстве ткани листа [8, 15–17]. Для выделения и очистки биорегуляторов данной группы был разработан оригинальный метод, включающий биохимические методики, метод биотестирования и методы физико-химического исследования белков [1, 18]. Применение этого методического подхода позволило получить небольшие количества очищенных пептидов, входящих в состав МГТБ, что определило применение методов масс-спектрометрии для их исследования. Высокая чувствительность MALDI-TOF масс-спектрометрии (10^{-4} – 10^{-8} М) позволяет обнаруживать минорные компоненты сложных

белковых смесей и устанавливать молекулярные массы этих белков на всех этапах исследования.

Следует отметить, что основным этапом очистки МГТБ является отделение их от примесных белков при высаливании тканевого экстракта в насыщенном растворе сернокислого аммония. В этих условиях МГТБ остаются в растворенном состоянии, а остальные белки переходят в осадок. Поэтому фракции надосадочной жидкости (супернатанты), полученные после высаливания тканевых экстрактов, содержат, в основном, МГТБ, представленные комплексом, образованным биологически активными пептидами и модулятором, состоящим из белков с молекулярной массой от 15 до 66 кДа [14]. В связи с этим исследование состава пептидов на данной стадии представляется весьма актуальным, поскольку это дает возможность выявить наиболее полно пептидные компоненты, входящие в состав МГТБ.

В настоящем исследовании были идентифицированы пептиды, входящие в состав МГТБ, выделенных из различных источников: тканей млекопитающих, растений, а также грибов. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа были проанализированы супернатанты 15 тканевых экстрактов животного происхождения, 18 — растительного и 2 видов грибов.

Цель работы — определение молекулярной массы пептидных компонентов, входящих в состав фракций супернатантов, содержащих МГТБ.

МЕТОДИКА

Биологический материал. Ткани глаза (склера, роговица, хрусталик, радужка, стекловидное тело, сетчатка, пигментный эпителий, цилиарное тело) получали из свежезнуклеированных глаз молодых бычков *Bos taurus Taurus* L. возрастом до 1 года (всего 60 глаз), которые так же, как и печень (1.5 кг) бычков были предоставлены Таганским мясоперерабатывающим комбинатом г. Москвы. Печень, мозг, сердце и кость выделяли из крыс Вистар, обоего пола, массой 180–250 г, содержащихся в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Использовали препарат “Сыворотка крови крупного рогатого скота, стерильная, инактивированная, питательная добавка при культивировании клеток и тканей”, произведенный в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, и эмбриональную телячью сыворотку фирмы “Seriva” (Германия).

Растительное сырье (лук *Allium cepa* L., чеснок *Allium sativum* L., алоэ *Aloe arborescens* L., чистотел *Chelidonium* L., свекла *Beta vulgaris* L., арбуз *Citrullus lanatus* Thunb., дыня *Cucumis melo* L., тыква *Cucurbita pepo* L., хрен *Armoracia rusticana* Gilib., лимон *Citrus limon* L., подорожник *Plantago major* L., полынь *Artemisia absinthium* L. и одуванчик *Taraxacum officinale*

Wigg.) было получено из Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН, грибы (лисичка *Cantharellus cibarius* Fr. и трутовик *Fomes fomentarius* L.) были собраны в экологически чистом регионе Владимирской области.

Выделение биорегуляторов. Ткани млекопитающих, в том числе глаза быка, отделяли друг от друга микрохирургическим способом, и так же, как и ткани растений и грибов, разрезали на фрагменты размером 1–1.5 см и экстрагировали 2 ч при 4°C в водно-солевом растворе (0.15 М NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ Hepes). После центрифугирования тканевого экстракта (3000 г, 30 мин) надосадочную жидкость собирали и высаливали сухим сернокислым аммонием до получения насыщенного раствора соли (780 г/л) в присутствии 10⁻² М ЭДТА, и оставляли на 80–90 ч при 4°C. Полученный солевой раствор смеси белков центрифугировали (10500 г, 45 мин). После этого супернатант отделяли от осадка и длительно диализовали против воды до полного удаления соли. Полученные бессолевые супернатанты экстрактов концентрировали, используя вакуумный роторный испаритель при 40°C, определяли в них количественное содержание белка по методу Варбурга и Кристиана [19], мембранотропную активность адгезиометрическим методом [2] и исследовали MALDI-TOF масс-спектрометрическим методом.

Масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра UltraFlex 2 (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм при частоте импульсов до 20 Гц. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции–ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона *m/z* от 1000 до 20000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий спектров по 50 импульсов лазера для каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы “Bruker Daltonics” (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла ±2 Да. В качестве матрицы применяли α-циано-4-гидроксикоричную кислоту “Sigma-Aldrich” (Германия) в виде насыщенного раствора в смеси 50%-ного ацетонитрила и 2.5%-ной трифторуксусной кислоты. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии.

Таблица 1. Сигналы масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов крысы и быка

Источник	M, m/z	Концентрация белка, мг/мл
Склера глаза <i>Bos taurus Taurus L.</i>	4171, 4302, 4531, 4819	0.039
Роговица глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	1442, 3376, 3973, 4302, 4418, 4531, 4817, 8604	0.0105
Хрусталик глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4302, 4529, 4817, 8604	0.0041
Радужка глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	3944, 4301	0.083
Цилиарное тело глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4301	0.068
Стекловидное тело глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4300, 4370, 4420	0.081
Сетчатка глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4302, 4528, 4819, 8603	0.068
Пигментный эпителий глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4303, 4532, 4819	0.0017
Сыворотка крови КРС	1666, 1812, 1915, 2016	0.072
Эмбриональная сыворотка крови КРС	4301, 8601	0.100
Печень быка <i>Bos taurus taurus L.</i>	2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237	1.370
Печень крысы Вистар	3649, 5025	1.000
Мозг крысы Вистар	2820, 3481, 4300, 4331, 4403, 4671, 4801, 9945	1.690
Сердце крысы Вистар	3049, 3262, 7565, 7684, 8463, 8581, 8766, 8967, 9094, 9951, 10404	1.520
Кость крысы Вистар	4301	0.050

Интерпретация масс-спектров. При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых сигналов соответствует белковым молекулам, а определяемые массы – массам целых (нефрагментированных) белков. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://www.uniprot.org>). При вводе параметра “молекулярная масса” использовали экспериментальное значение массы, измеряемое с точностью ± 2 Да. В случае неудачи проводили повторный поиск со значением массы, соответствующим утрате N-концевого метионина, учитывая возможность посттрансляционной модификации белков.

Статистическая обработка. Для формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчетов, описательной статистики, построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании были изучены 15 фракций МГТБ, полученных из различных тканей мле-

копитающих, а также 18 фракций биорегуляторов данной группы 13 видов растений и биорегуляторы, полученные из 2 видов грибов (табл. 1, 2). Как было установлено ранее, при высаливании в насыщенном растворе серноокислого аммония происходило осаждение всех примесных белков [4, 6]. Осажденные белки не проявляли мембранотропную активность, поэтому эту фракцию далее не исследовали. В супернатанте содержались биорегуляторы, оказывающие мембранотропное действие в сверхмалых дозах. В связи с этим представлялось актуальным провести сравнительное исследование пептидного состава биорегуляторов, выделенных из различных объектов на данной стадии очистки, в том числе, для идентификации минорных компонентов, входящих в состав биорегуляторов [6, 13]. Концентрация суммарного белка в исследуемых фракциях супернатантов варьировала от 2 мкг/мл до 1.7 мг/мл для белков животного происхождения (табл. 1) и от 60 мкг/мл до 3 мг/мл для белков растительного и фунгального происхождения (табл. 2). В работе был использован стандартный протокол масс-спектрометрии с применением матриц и параметров снятия масс-спектров, позволяющих регистрировать преимущественно белковые молекулы. Были проанализированы три наиболее распространенных матрицы для ионизации образца MALDI-TOF масс-спектромет-

Таблица 2. Сигналы масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов растений и грибов

Источник	M, m/z	Концентрация белка, мг/мл
Лук <i>Allium cepa</i> L.	4037	2.690
Чеснок <i>Allium sativum</i> L.	2997, 3308, 3646, 3833, 6838, 7675, 8256, 8350, 8478	0.798
Алоэ <i>Aloe arborescens</i> L.	1142, 1807, 1974, 2908, 3032, 3256, 3331, 3412, 4213, 4349	0.160
Чистотел <i>Chelidonium</i> L.	4844, 9688	0.364
Свекла <i>Beta vulgaris</i> L.	1616, 2154, 2611	0.057
Арбуз (кожура) <i>Citrullus lanatus</i> Thuhb.	3486	0.396
Арбуз (мякоть) <i>Citrullus lanatus</i> Thuhb.	3725, 4146, 7450	0.684
Дыня (кожура) <i>Cucumis melo</i> L.	4444, 4590, 8887, 9179	0.154
Дыня (мякоть) <i>Cucumis melo</i> L.	3894, 3978, 4148, 4673, 4714, 7958, 9348, 9436	0.422
Тыква (семена) <i>Cucurbita pepo</i> L.	2560, 2721, 3009, 3135, 3206, 3365, 3704, 4299, 4819, 6156, 6420, 8600	0.125
Тыква (мякоть) <i>Cucurbita pepo</i> L.	1233, 1284, 2940, 4556	0.705
Хрен <i>Armoracia rusticana</i> Gilib.	3725	0.466
Лимон (семена) <i>Citrus limon</i> L.	3365, 3438, 3480, 3570, 3610, 3756, 3803, 3862	0.116
Лимон (мякоть) <i>Citrus limon</i> L.	1837, 1891, 3465, 3805, 6931	0.400
Лимон (кожура) <i>Citrus limon</i> L.	2814, 3196, 4071, 4359, 8152	0.208
Подорожник <i>Plantago major</i> L.	2374, 2963	0.064
Полынь <i>Artemisia absinthium</i> L.	4815	0.165
Одуванчик <i>Taraxacum officinale</i> Wigg.	2871, 3124, 5750, 6256, 7227, 7253, 7542, 8371, 8430, 8794, 9371, 10345	1.400
Лисичка <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	3650	3.000
Трутовик <i>Fomes fomentarius</i> L.	4421	1.000

рии. В результате оценки воспроизводимости масс-спектров, разрешения сигналов, соотношения сигнала к шуму, числа сигналов, их интенсивность и диапазона значений масса/заряд, регистрируемых в ходе анализа, нами была выбрана для исследований α -циано-4-гидроксикоричная кислота. Снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 1000–20000 m/z , в основном, сигналы регуляторных пептидов фиксировали от 2000 до 10000 m/z , что соответствовало данным, полученным при исследовании МГТБ другими методами [11, 13, 14]. Большинство информационных сигналов располагалось в области от 2000 до 5000 m/z (табл. 1, 2).

Анализ значений сигналов масс-спектров пептидов, содержащихся в супернатантах экстрактов различных тканей крысы и быка, показал, что в нескольких тканях органов, таких, как мозг и кость (большая берцовая) крысы, эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС), сетчатка, хрусталик, стекловидное тело, радужка, цилиарное тело, пигментный эпителий, склера и роговица глаза быка, присутствовал пептид с молекулярной

массой 4301 ± 2 Да (табл. 1). Данный пептид не был обнаружен в биорегуляторах, выделенных из сыворотки крови и печени взрослых особей КРС и печени и сердца крысы (табл. 1). Следует отметить, что в биорегуляторах, выделенных из тканей глаза быка, были идентифицированы еще сигналы со значениями m/z , равными 4530 и 4818 (табл. 1). Возможно, что в состав МГТБ тканей одного органа – глаза, входят одинаковые по молекулярной массе пептиды. Будут ли данные пептиды идентичны друг другу, подтвердят результаты анализа их первичной аминокислотной последовательности. Важно отметить, что данные по исследованию специфической активности МГТБ, выделенных из тканей глаза, показывают, что она характеризуется наличием тканеспецифического, но не видоспецифического действия [9, 20]. Можно предположить, что тканеспецифичный характер активности МГТБ могут определять другие пептиды, свойственные только данному типу ткани. Например, полученные нами данные показали, что ряд таких пептидов присутствовал в супер-

натантах экстрактов тканей роговицы, склеры, стекловидного тела (табл. 1).

В препаратах растительного происхождения не было обнаружено пептидов со сходными значениями молекулярных масс. Было показано, что не только в супернатантах, выделенных из растений одного и того же семейства, таких, как лук и чеснок (семейство Луковые), арбуз, дыня и тыква (семейство Тыквенные), полынь и одуванчик (семейство Астровые) содержались пептиды с молекулярными массами, отличными друг от друга. Только в случае биорегуляторов, выделенных из мякоти арбуза и дыни, были зафиксированы схожие сигналы m/z – 4146 и 4148 соответственно (табл. 2). Но даже пептиды, выделенные из разных тканей одного вида растения (кожура, мякоть и семена арбуза, дыни, тыквы и лимона), отличались по молекулярным массам (кроме сигналов 3803 и 3805 m/z , идентифицированных в супернатантах семян и мякоти лимона соответственно) (табл. 2). Аналогичное расхождение в значениях сигналов m/z наблюдали и при исследовании супернатантов, выделенных из экстрактов тканей грибов (табл. 2). Очевидно, такое различие в молекулярных массах пептидов обусловлено различием МГТБ, выделенных из растений и грибов.

Таким образом, полученные данные предполагают, что в состав биорегуляторов, выделенных из тканей одного органа (глаза быка) входят пептиды с одинаковыми значениями молекулярных масс, которые определяют участие данных МГТБ в регуляции органно-тканевого гомеостаза. Другие пептиды биорегуляторов тканей глаза с отличающимися значениями молекулярных масс, возможно, определяют тканеспецифический характер МГТБ [4, 21–23]. Важно отметить, что тканевые экстракты, содержащие МГТБ, проявляли тканеспецифический характер биологического действия [1, 4]. После высаливания все фракции супернатантов, выделенных из различных объектов, оказывали мембранотропное действие на модели органной культуры печени мыши. Эти данные указывают на то, что имеющие сложный состав МГТБ, структура которых характеризуется определенной пространственной архитектурой, имеют общую для всех биорегуляторов данной группы компоненту. Возможно, что пептид с молекулярной массой 4301 ± 2 Да, обнаруженный не только в биорегуляторах тканей глаза быка, но и в биорегуляторах, выделенных из тканей мозга и кости крысы и эмбриональной сыворотки КРС, входил в ее состав. Данное предположение является предметом наших дальнейших исследований.

Проведя идентификацию полученных масс-спектрометрических сигналов путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в электронных базах данных (SwissProt/TrEMBL), нами не было найдено соответствий. Данный факт подтверждает уникаль-

ность группы МГТБ, контролирующей органно-тканевой гомеостаз в сверхмалых дозах, и является предпосылкой для дальнейшего исследования и установления первичной структуры белков и пептидов этой группы биорегуляторов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И., Ланковская Т.П., Бочарова О.К., Маленков А.Г. // Биофизика. 1977. Т. 22. № 1. С. 168–174.
2. Маленков А.Г., Модянова Е.А., Ямскова В.П. // Цитология. 1978. Т. 20. № 8. С. 957–962.
3. Буверова Э.И., Брагина Е.В., Резникова М.М., Ямскова В.П., Хрущов Н.Г. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 1. С. 158–160.
4. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общ. биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
5. Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Ченцова Е.В., Илатовская Л.В., Ямскова В.П., Романова И.Ю. // Вопросы офтальмологии. 1997. Т. 113. № 2. С. 12–15.
6. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
7. Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 2. С. 74–79.
8. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 22–36.
9. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П., Богуславский Д.В., Ямсков И.А. // Радиационная биология и радиоэкология. 2003. Т. 43. № 3. С. 265–268.
10. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямскова В.П., Григорян Э.Н., Ямсков И.А. // Офтальмология. 2005. Т. 2. № 3. С. 81–87.
11. Ямсков И.А., Виноградов А.А., Даниленко А.Н., Маслова Л.А., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 1. С. 36–42.
12. Скрипникова В.С., Краснов М.С., Березин Б.Б., Бабушкина Т.А., Борисенко А.В., Измайлов Б.А., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Докл. РАН. 2007. Т. 417. № 5. С. 697–699.
13. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С., Борисенко А.В., Маргасюк Д.В., Вечеркин В.В., Скрипникова В.С., Назарова П.А., Битко С.А., Березин Б.Б., Яминский И.В., Мешков Г.Б., Грачев С.А., Серебрякова М.В., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П. // Известия РАН. Серия хим. 2009. № 3. С. 623–628.
14. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Бурак А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
15. Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Радиационная биология и радиоэкология. 2003. Т. 43. № 3. С. 269–272.

16. *Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E. Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 71–78.
17. *Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 35–45.
18. *Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г.* // Молекулярная биология. 1977. Т. 11. № 5. С. 1147–1154.
19. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
20. *Борисенко А.В., Ямскова В.П., Благодатских И.В., Березин Б.Б., Краюхина М.А., Ямсков И.А.* // Биол. мембраны. 2007. Т. 24. № 3. С. 244–250.
21. *Margusyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 47–59.
22. *Krasnov M.S., Gurmizov V.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 21–33.
23. *Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А.* Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. М.: МАКС Пресс, 2009. 84 с.

MALDI-TOF Mass Spectrometric Identification of Novel Intercellular Space Peptides

A. P. Il'ina^a, O. G. Kulikova^a, D. I. Maltsev^a, M. S. Krasnov^b, E. Yu. Rybakova^b, V. S. Skripnikova^b,
E. S. Kuznetsova^c, A. K. Buryak^c, V. P. Yamskova^b, and I. A. Yamskov^a

^a Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: Yamskov@mail.ru

^b Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

^c Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
e-mail: AKBuryak@ipcjrssi.ru

Received May 12, 2010

Abstract—We performed the matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis of the peptides entering into the composition of not yet explored bioregulators derived from the extracellular matrix of the tissues of the various organs of the mammals, and also plants and fungi. The study included 15 different mammalian tissues, 13 species of plants, and 2 species of fungi. Exploring the bioregulators derived from eye tissues, we demonstrated that their composition includes peptide components with the same values of the molecular weight. The composition of the bioregulators derived from the tissues of various organs of mammals or different species of plants and fungi includes the peptides with different values of molecular weight. Obtained data indicate the growing evidence of the assumptions about the major function of the bioregulators of this group—their involvement in the regulation of tissue-organ homeostasis in the biological systems.