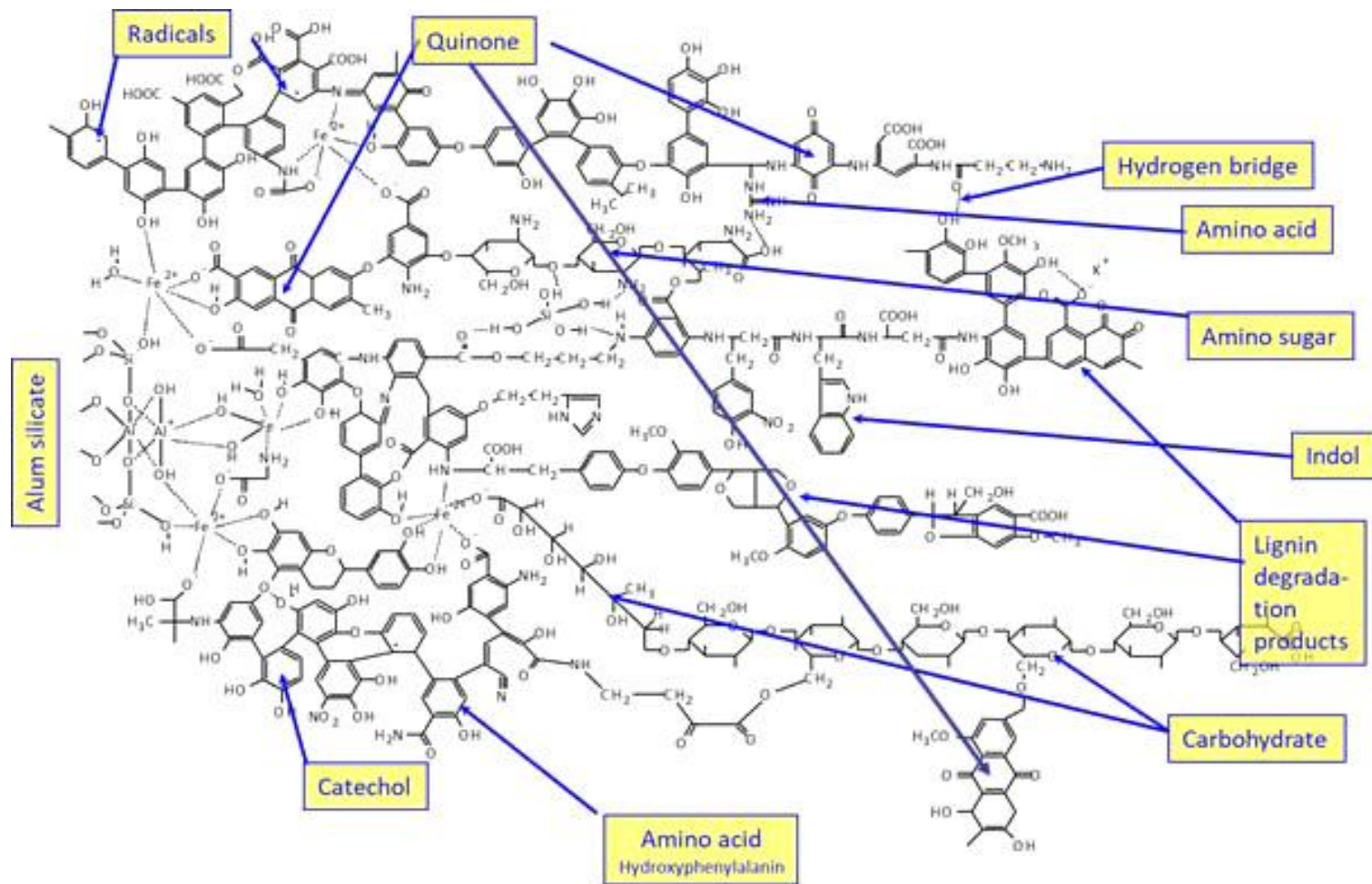


Направление исследований:  
влияние гуминовых кислот в водной среде на  
биохимические и молекулярные аспекты  
жизнедеятельности рыб

Первые результаты:

ГУМИНОВАЯ КИСЛОТА СПОСОБНА  
ВЫЗЫВАТЬ ОТРИЦАТЕЛЬНУЮ РЕГУЛЯЦИЮ  
СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА РЫБ

А.А. Морозов, В.В. Юрченко



# Эффекты гуминовых кислот

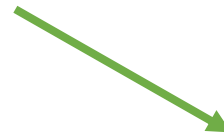


- синтез белков теплового шока
- повышение активности ферментов биотрансформации

(Timofeyev et al., 2004; Matsuo et al., 2006)

- окислительный стресс
- феминизация

(Steinberg et al., 2003; 2009)



- ускорение роста
- увеличение продолжительности жизни

(Meinelt et al. 2004)

**Задача исследования** - изучение изменений протеома плазмы крови рыб, происходящих в результате краткосрочного действия гуминовой кислоты в концентрациях, наблюдаемых в природных водах.

**Модельный объект** - японская медака *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel 1846).



Proteomes 2022\_01 results

Filter by: 1 Reference proteomes

Map to: UniProtKB

Demo: Help video

Repeat search in UniProtKB (102,885)

Proteome ID	Organism	Organism ID	Protein count	BUSCO	CPD	Genome representation (RefSeq)
<input type="checkbox"/> UP0000001038	<b>Oryzias latipes</b> (Japanese rice fish) (Japanese killifish) (Strain: Hd-rR)	8090	36128	 n:3640 C:95.7% (S:61% D:34.8%) F:1.1% M:3.2% actinopterygii_odb10	Close to standard (high value)	full

# Методы исследования

- Гуминовая кислота (CAS 1415-93-6, производитель Sigma-Aldrich)
- Температура воды  $25 \pm 1$  °С, фотопериод - 16:8 ч
- Смена 50% объёма воды ежедневно
- Длительность воздействия – 96 часов
- Анализ содержания растворённого углерода – методом бихроматной окисляемости.

Группа	ГК, мг/л, НОМИН.	С орг., мг С/л, 0 ч	С орг., мг С/л, 78 ч	рН ( $\pm$ SD)	O <sub>2</sub> , мг/л, ( $\pm$ SD)	Масса рыб, г, ( $\pm$ SD)
Контроль	0	< ПО	< ПО	$8.14 \pm 0.16$	$6.6 \pm 0.3$	$0.49 \pm 0.08$
1	5	< ПО	< ПО	$7.98 \pm 0.43$	$6.6 \pm 0.3$	$0.50 \pm 0.07$
2	40	4.5	6.6	$8.10 \pm 0.24$	$6.6 \pm 0.2$	$0.50 \pm 0.11$
3	80	9.4	9.4	$8.16 \pm 0.22$	$6.7 \pm 0.2$	$0.50 \pm 0.05$

Примечание: ГК – гуминовая кислота, С орг. – концентрация органического углерода, SD – стандартное отклонение, ПО – предел обнаружения.

# Методы исследования

- Отбор проб
  - Анестезия - трикаин метансульфонат (100 мг/л, 5 мин)
  - Пробы плазмы крови отбирали от 4-х самцов и 4-х самок из каждой группы из хвостовой вены/артерии.
  - Аликвоты плазмы крови рыб из одной группы объединяли в одну суммарную пробу, замораживали в жидком азоте и хранили в нём до проведения протеомного анализа.

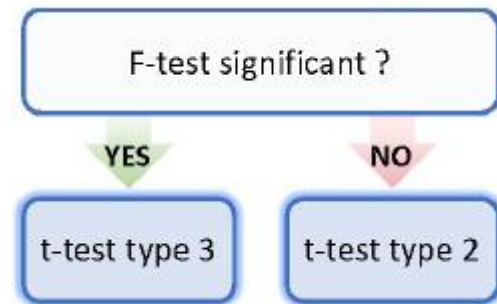
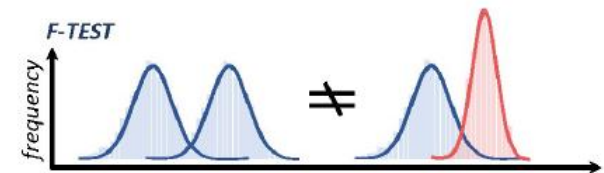
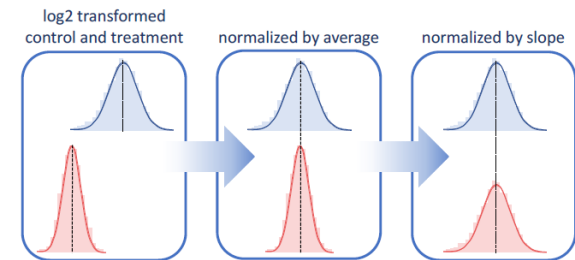
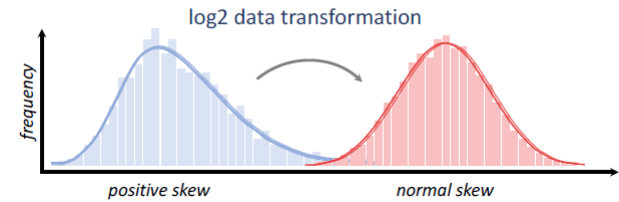
# Методы исследования

- На базе ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ) проводилась идентификация белков методом безметковой количественной оценки (label-free quantification, LFQ)
  - солюбилизация белков плазмы крови
  - расщепление белков трипсином с использованием фильтров Strap
  - ВЭЖХ-МС/МС
  - MaxQuant с поисковой системой Andromeda
  - база данных UniProt

The screenshot shows the UniProt website homepage. At the top, there is a search bar with the UniProt logo on the left and a search button on the right. Below the search bar, there are navigation links: BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, and SPARQL. A blue banner below the navigation links reads "The new UniProt website is here! Take me to UniProt BETA". Below the banner, there is a mission statement: "The mission of UniProt is to provide the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of protein sequence and functional information." The main content area is divided into several sections: UniProtKB (UniProt Knowledgebase) with a sub-section for Swiss-Prot (566,996) and TrEMBL (230,328,648); UniRef (Sequence clusters); UniParc (Sequence archive); Proteomes (Proteome sets); and Supporting data (Literature citations, Taxonomy, Subcellular locations). On the right side, there is a news section with a red banner for "View SARS-CoV-2 Proteins and Receptors" and a "News" section with social media icons and a "Forthcoming changes" section.

# Методы исследования

- Статистический анализ данных
  - Первичные данные обрабатывали в Microsoft Excel согласно рекомендациям Aguilan et al. (2020).
  - Значения относительного обилия белков (LFQ intensity) были преобразованы в  $\log_2$  и нормализованы по медиане и наклону.
  - Значимость изменений в опыте по сравнению с контролем определяли по результатам последовательного сравнения с помощью критерия Фишера и t-критерия Стьюдента.
  - Соотношение относительного обилия белков между каждой опытной группой и контролем рассчитывали по показателю кратности изменения (fold change, FC).



Цит. по: Aguilan et al. (2020): Guide for protein fold change and p-value calculation for non-experts in proteomics. Molecular Omics. DOI: 10.1039/D0MO00087F

# Результаты

Группа 1  
5 мг/л

Группа 2  
40 мг/л

Группа 3  
80 мг/л

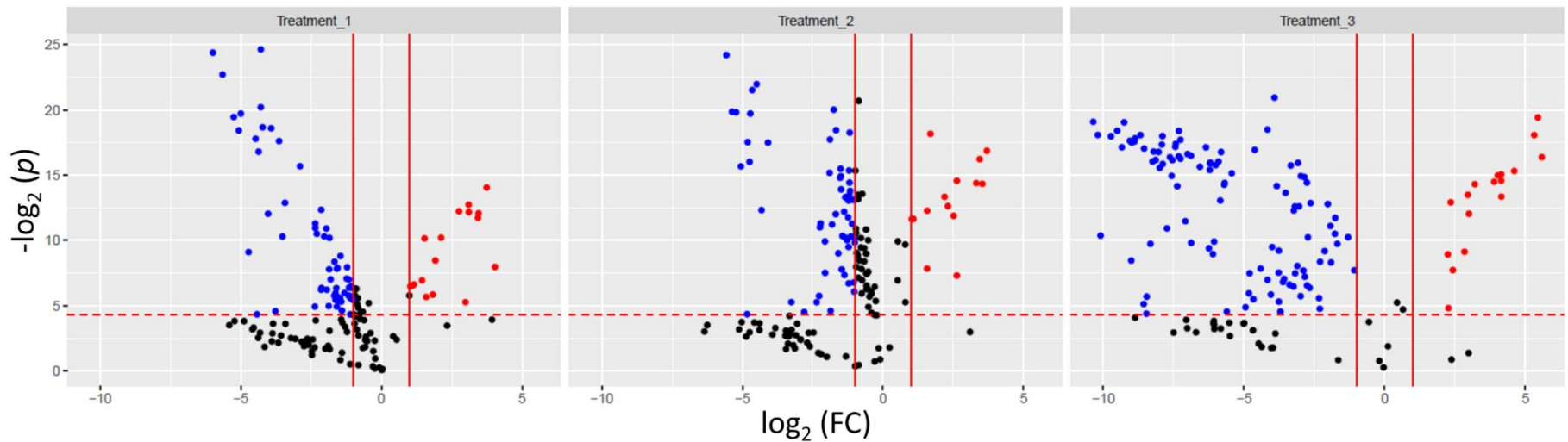
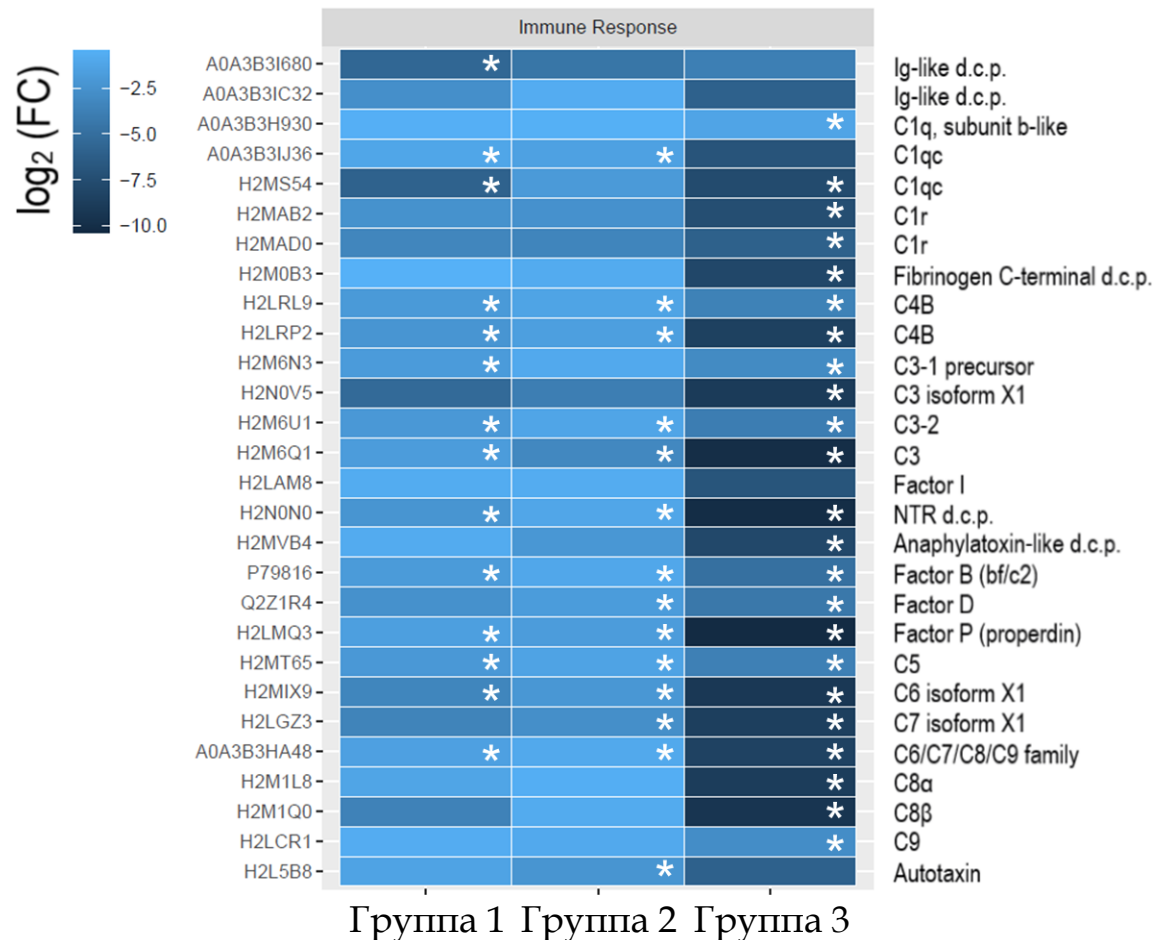


Рис. 1. Диаграммы изменения относительного обилия белков плазмы крови медаки.

*Примечание:*  $p$ -значения приводили к виду  $-\log_2(p)$ , статистическая значимость определялась порогом  $-\log_2(p) > 4,32$  и кратностью изменения больше 2, т.е.  $\log_2(FC) > 1$ .

# Тепловая карта изменения относительного обилия белков плазмы крови медаки, участвующих в иммунном ответе



Примечание: \* - статистически значимое изменение относительно контроля (t-test, p<0.05). «d.c.p.» - (-домен содержащий белок, domain-containing protein).

Глубокая благодарность за вклад в исследования

Р.А. Фёдорову (ИБВВ РАН)

О.В. Тихоновой, В.Г. Згоде, Е.В. Хряповой (ИБМХ)

Л.Г. Бакиной (СПб ФИЦ РАН)

Б.А. Кирюхину (ТюмГУ)

Д.А. Филиппову (ИБВВ РАН)

*Исследование выполнено при финансовой поддержке  
РНФ, проект № 20-76-00030*

# Спасибо за внимание!

Гуминовая кислота

