

УДК 543.51: 57.088.1

АНАЛИЗ СЫВОРОТОЧНЫХ БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА С ТРИПСИНОМ

Тюлин А.А. (Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого)

Научный руководитель – м.н.с. Тараскин А.С.

(ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург)

Аннотация. В данной работе были рассмотрены особенности взаимодействия альфа-2-макроглобулина (α -2МГ) с трипсином, используемые для определения концентрации α -2МГ непосредственно в сыворотки крови человека с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. После добавления трипсина к сыворотке крови человека *in vitro* измерялась концентрация пептида VGFYESDVMGR, высвобожденного из α -2МГ после частичного гидролиза трипсином последнего, с помощью изотопно-меченного внутреннего стандарта (^{18}O) и впоследствии рассчитывалась концентрация α -2МГ. Оптимизированный масс-спектрометрический подход был верифицирован одним из стандартных методов определения концентрации α -2МГ – методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Введение. Одним из основных гликопротеинов сыворотки крови является α -2МГ, который способен ингибировать широкий класс протеаз, в том числе и трипсин. При этом особенность взаимодействия трипсина с α -2МГ заключается в гидролизе ферментом двух связей в «зоне приманки» белка с последующим высвобождением пептида VGFYESDVMGR. Известно, что концентрация α -2МГ в сыворотке значительно изменяется в случае некоторых заболеваний, следовательно, её измерение может быть использовано в диагностике. Обычно используются иммунологические и ферментативные методы для определения концентрации α -2МГ, однако они обладают существенными недостатками, такими как: необходимость использования специфичных антител и специфичных субстратов для гидролиза. Более того, методы, основанные на использовании антител, не различают свободную форму α -2МГ и его продукты реакции, а связывание антител с α -2МГ сильно зависит от конформации последнего, которая может существенно меняться в процессе взаимодействия с протеазами.

Основная часть. Для определения концентрации α -2МГ в сыворотке крови, предлагается использовать масс-спектрометрический подход (MALDI-TOF MS) с применением изотопно-меченного внутреннего стандарта. Метод основан на измерении концентрации пептида VGFYESDVMGR, высвобождаемого из α -2МГ в ходе реакции с трипсином. Этот пептид легко может быть идентифицирован масс-спектрометрически, а его концентрация прямо пропорциональна концентрации α -2МГ. В количественной протеомике масс-спектрометрические методы получили широкое распространение относительно недавно. Наиболее распространённый подход – количественный анализ белков с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии. Однако данный метод не позволяет провести количественный мультиплексный анализ сразу нескольких компонентов и требует наличие этапа предварительной очистки образцов, а также уступает по времени MALDI масс-спектрометрии, которая использовалась в данной работе.

С помощью ИФА и предлагаемого метода, была измерена концентрация α -2МГ в сыворотках крови 20 пациентов. Образцы были любезно предоставлены отделом молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Выборка включала 5 здоровых пациентов; 5 пациентов с гнойно-воспалительным заболеванием мягких тканей, с подозрением на сепсис; 5 пациентов с вирусами гриппа А (H3N2 и H1N1), подтверждёнными сертифицированным ОТ-ПЦР набором (Амплиценс®); 5 пациентов с COVID-19, что также было подтверждено сертифицированным ОТ-ПЦР набором. В результате полученные концентрации α -2МГ у группы здоровых пациентов были

в пределах нормы (от 1 до 6 г/л в зависимости от пола и возраста), а у остальных групп пациентов наблюдалось отклонение от референсных значений. При этом наблюдались отличия в значениях, полученных двумя сравниваемыми методами. В результате статистического анализа результатов, было выявлено, что между значениями концентрации, полученными с помощью ИФА и с помощью масс-спектрометрического подхода, присутствует линейная корреляция.

Необходимо отметить, что в комплексе α -2МГ с трипсином, фермент не полностью утрачивает свою активность, а способен расщеплять некоторые низкомолекулярные белки (<20 кДа). Было показано, что благодаря этой особенности можно определить концентрации сразу несколько биомаркеров сыворотки крови (включая сывороточный амилоид А и фетуин А) без её предварительного фракционирования с помощью масс-спектрометрического подхода. При этом их уровни сильно изменяются при развитии системного воспаления, что может быть также использовано в диагностике.

Выводы. В данной работе был применён и верифицирован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, позволяющий измерять концентрацию α -2МГ в сыворотке крови. Такой подход позволяет количественно оценить уровни биомаркеров различных патологических процессов в сыворотке без её предварительного фракционирования. Цикл заморозки и оттаивания, а также лиофилизация могут существенно повлиять на конформационные характеристики коммерческих стандартов (характерных для ИФА) и, как следствие, на процесс связывания антител с антигенами, в то время как масс-спектрометрический подход лишён вышеуказанных недостатков, а для используемого синтетического пептида важна лишь исходная целостность соединения. Неоспоримым преимуществом разработанного подхода является возможность быстрого одновременного измерения потенциальных биомаркеров воспаления.

Тюлин А.А. (автор)

Подпись

Тараскин А.С. (научный руководитель)

Подпись