

УДК 577.322

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ САЙТОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УПРОЩЕННОЙ ОДНОСТАДИЙНОЙ МЕТОДИКИ ПРОБОПОДГОТОВКИ)

В.С. Иванов, А.Д. Васильева, Д.Ю. Азарова, А.С. Кононихин, М.А. Розенфельд

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Фибриноген, ключевой белок системы свертывания крови, среди всех белков плазмы проявляет самую высокую чувствительность к воздействию окислителей [1]. Окислительная модификация белков может привести к фрагментации боковой и основной цепи, агрегации посредством ковалентного поперечного сшивания и нарушению конформации, сопровождающим повышение гидрофобности молекулы и приводящим к изменению взаимодействий с биологическими партнерами [2]. Окисление фибриногена ведет к изменению процесса самосборки фибрина и формированию аномальных тромбогенных сгустков. Они характеризуются тонкими индивидуальными фибриновыми фибриллами, малой пористостью, низкой проницаемостью и, как следствие, повышенной устойчивостью к плазминовому гидролизу [3].

Разработка эффективной методики, которая бы включала выделение целевого белка из исследуемого образца плазмы или любой другой физиологической жидкости с последующим гидролизом выделенного белка для дальнейшего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с исключением большого количества стадий процесса (например, многочисленных стадий переосаждения, различных видов хроматографии при выделении целевых белков) и использования агрессивных условий (например, при элюировании белков с носителей), а также с уменьшением общей трудоемкости и времени подготовки проб к анализу, является необходимой для использования в протеомных исследованиях.

В рамках данного исследования была разработана и опробована методика ферментативного гидролиза на магнитных частицах за исключением стадии элюирования для дальнейшего анализа с помощью ВЭЖХ – МС/МС, позволила: 1) упростить процедуры при работе с большим количеством образцов, 2) сократить общее время анализа, 3) во избежание появления окислительных модификаций, не связанных с патологическими условиями или вызванных окислением, но возникающих в результате длительной подготовки образца или использования агрессивных условий элюирования, которые препятствуют анализу результатов.

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084–2014–0001 и 0084–2014–0005) и при финансовой поддержке гранта РНФ № 21–74–00146.

Литература

- Shacter E., Williams J.A., Levine R.L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 17:429–437.
- Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* 2016; 473(7):805–825. doi:10.1042/BJ20151227.
- Katie M. Weigandt, Nathan White, Dominic Chung, Erica Ellingson, Yi Wang, Xiaoyun Fu, and Danilo C. Pozzo. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen // *Biophysical Journal*. 2012. Vol. 103, P. 2399–2407.