

**РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УЧАСТКОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА).**

*Л.В. Юрина<sup>1</sup>, А.Д. Васильева<sup>1</sup>, А.Е. Бугрова<sup>1</sup>, М.И. Индейкина<sup>2</sup>, А.С. Кононихин<sup>3</sup>, Е.Н. Николаев<sup>4</sup>, М.А. Розенфельд<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет г. Долгопрудный, Московская область, Россия

<sup>3</sup> Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, Москва, Россия,

<sup>4</sup> Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия.

В настоящее время изучение окисления белков, в том числе белков плазмы, является одним из наиболее перспективных научных направлений в области радикальной биологии и медицины. Белки как уязвимая мишень для активных форм кислорода участвуют в окислительных модификациях, которые приводят к структурным и химическим повреждениям. Окислительная модификация белка может привести к значительной потере биохимических функций белка [1].

Объектом исследования был выбран белок фибриноген (4 % от общего количества белков плазмы), проявляющий большую чувствительность к воздействию окислителей, чем другие белки плазмы крови (альбумин, иммуноглобулины, трансферрин, церулоплазмин), являющийся ключевым белком в системе свертывания крови [2]. Также фибриноген является чувствительным маркером воспаления и некроза тканей (один из белков острой фазы воспаления), основным белком плазмы, влияющим на величину СОЭ. Концентрации фибриногена в плазме соотносится с увеличением риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [3].

В рамках данного исследования были разработаны и адаптированы следующие методы, основанные на иммунопреципитации на магнитных частицах (для фибриногена): 1) иммуноферментный анализ на магнитных частицах для определения количества преципитированного белка; 2) трипсинолиз на магнитных частицах с исключением стадии элюирования для дальнейшего анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Разработка методик трипсинолиза на магнитных шариках за исключением стадии элюции для дальнейшего анализа (ВЭЖХ-МС/МС) позволила: 1) упростить процедуры при работе с большим количеством образцов, 2) сократить общее время анализа, 3) избежать 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. Схема эксперимента приведена на рисунке 1.

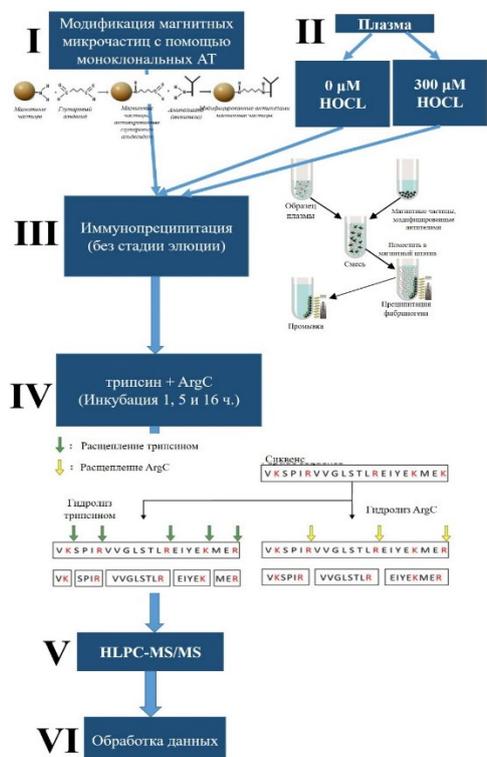


Рисунок 1. Схема эксперимента.

Результаты, полученные в рамках данного исследования с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, помогут создать принципиально новые диагностические подходы для клинической и лабораторной практики, основанные на обнаружении и количественном определении окислительных сайтов, возникающих в результате развития окислительного стресса при различных патологиях.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-01313\_а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 16-14-00181.**

**ЛИТЕРАТУРА.**

[1] I. Dalle-Donne, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. Mass Spectrom Rev (2005) 24(1):55–99.  
 [2] E. Shacter, J.A. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. Free Radical Biology and Medicine (1994) 17(5):429–437.  
 [3] L. Wilhelmsen, K. et al.. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. N Engl J Med (1984) 311:501–505