

2. *Нерсесова, Л. С.* Роль креатинкиназы и ее субстратов в центральной нервной системе в норме и при различных патологиях / Нерсесова Л. С. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 2011. – Т. 47. – № 2. – С. 120–127.
3. *Wyss, M.* Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease – a Bright Future Ahead?/ Wyss M, Braissant O., Pischel I., Salomons G. S. et al.// Subcell. Biochem. 2007. – Vol. 46. – № 17. – P. 309–334.
4. *Петрова, Т. А.* Оптимизация условий определения активности креатинкиназы колориметрическим методом / Петрова Т. А., Лызлова С. Н. // Вестн. ЛГУ. – 1985. – № 24. – С. 88–90.
5. *Ennor, A. H.* Some properties of creatine phosphokinase/ A. H. Ennor, H. Rosenberg // Biochem. J. – 1954. – Vol. 57. – P. 295.

## **МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ В АНАЛИЗЕ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА**

### **THE METHODS OF PROTEOMICS IN ANALYSIS OF CHEMICALLY MODIFIED HUMAN HEMOGLOBIN**

***Е. Я. Рута-Жуковская<sup>1</sup>, Д. Д. Шевчук<sup>2</sup>, В. Э. Сяхович<sup>1,2</sup>, С. А. Беляев<sup>1</sup>***  
***E. Ruta-Zhukouskaia<sup>1</sup>, D. Shauchuk<sup>2</sup>, V. Syakhovich<sup>1,2</sup>, S. Beliaev<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Республика Беларусь  
sv@antidoping.by*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь*

<sup>1</sup>*National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В настоящей работе был изучен характер химической модификации основной фракции гемоглобина человека А<sub>1</sub> с использованием глутарового альдегида. В ходе работы были изучены сайты модификации α- и β-субъединиц, и было выявлено, что присоединение глутарового альдегида проходит по поверхностным лизинам. А также были разработаны подходы для определения характера химической модификации гемоглобина человека с использованием тандемной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и протеомики «top-down».

In the present work we studied the nature of chemical modification of the main fraction of human hemoglobin A<sub>1</sub> using glutaraldehyde under mild conditions. In the course of the work, the sites of modification of α- and β-subunits were studied, and it was found that glutaraldehyde attachment proceeds via surface lysines. During the work, approaches were developed to determine the nature of the chemical modification of human hemoglobin using high-resolution tandem chromatography mass spectrometry with «top-down» proteomics procedure.

*Ключевые слова:* основная форма гемоглобина человека, тандемная хромато-масс-спектрометрия, кровезаменители на основе гемоглобина, глутаровый альдегид.

*Keywords:* main form of human hemoglobin, tandem chromatography-mass spectrometry, hemoglobin-based oxygen carriers, glutaraldehyde.

В настоящее время постоянно возрастает потребность в трансфузии цельной крови и ее отдельных компонентов как в связи с ростом числа операций по пересадке и транспортировке органов и тканей, так и с увеличением частоты возникновения экстренных ситуаций обусловленных природными факторами. Нехватка донорской крови и наличие ряда ограничений по ее использованию, таких как возможность *заражения инфекционными заболеваниями*, необходимости определения группы крови и резус-фактора, изменение свойств крови и ее компонентов в процессе хранения требуют создания и применения искусственных кровезаменителей. Дефицит донорской крови, особенно редких групп, остро ощущается в чрезвычайных ситуациях, сопряженных с многочисленными жертвами. Альтернативу донорской крови могут составить искусственные кровезаменители, обладающие способностью транспортировать газы крови, прежде всего, кислород и углекислый газ. По сравнению с донорской кровью кровезаменители имеют ряд преимуществ: они не требуют групповой совместимости, свободны от инфекций, обладают длительным сроком годности, что позволяет запасать их в больших количествах и при необходимости использовать немедленно [1].

Из разработанных к настоящему моменту одним из используемых видов кровезаменителей являются кровезаменители на основе гемоглобина – важнейшего компонента крови, обеспечивающего снабжение организма человека кислородом. В настоящее время интенсивно ведутся исследования по использованию гемоглобина, по-

лученного из других организмов в качестве основы для создания кровезаменителей, которые имеют ряд преимуществ над человеческим [2; 3].

Хромато-масс-спектрометрия (МС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях белков и пептидов. Подход «top-down» представляет собой установление точной структуры белков исключительно возможностями МС, получение информации на основе масс-спектрометрического анализа целых, неповрежденных белковых молекул. Среди преимуществ следует отметить высокое покрытие последовательности для белка, способность определить посттрансляционные модификации и возможные мутации. Тандемная МС применяется для анализа смесей белков, по сложности превышающих аналитические возможности метода peptide mass fingerprinting (PMF). При анализе многокомпонентных образцов используют предварительное разделение смеси, чаще всего за счет применения методов хроматографии [4], для исключения попадания в коллизионную ячейку ионов с близкими массами.

В данных исследованиях были изучены сайты модификации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц, и нами было выявлено, что присоединение глутарового альдегида проходит по поверхностным лизинам. Помимо этого, были разработаны подходы для определения характера химической модификации гемоглобина человека с использованием тандемной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и процедуры протеомики «top-down».

Выделение и очистку основной формы гемоглобина человека  $A_1$  ( $hHbA_1$ ) осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой Fast Flow «GE Healthcare» (США) размером  $5 \times 25$  см с использованием хроматографической системы низкого и среднего давления NGC Discover «Bio-Rad» (США). Колонка была предварительно уравновешена 50 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,5. Элюцию форм гемоглобина проводили градиентом pH от 8,5 до 7,5 (рис. 1).

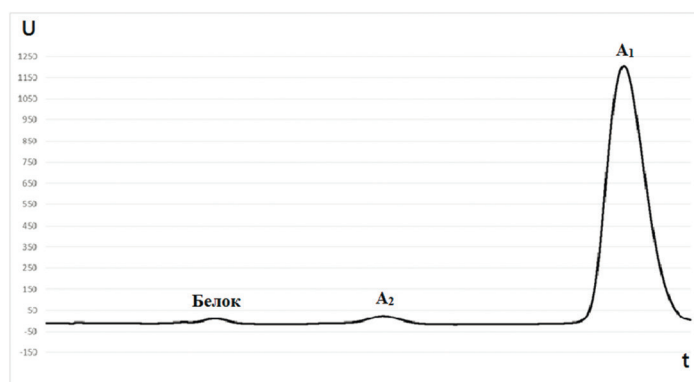


Рисунок 1 – Хроматограмма очистки основных форм гемоглобина человека  $A_1$  и  $A_2$  на DEAE-сефарозе Fast Flow «GE Healthcare», 280 нм

Концентрацию  $hHbA_1$  на всех стадиях выделения определяли спектрофотометрически на приборе Cary 50 UV-VIS «Varian» (США), используя для расчетов молярный коэффициент поглощения, равный  $13.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 540 нм [5].

С целью усиления процесса химической модификации,  $hHbA_1$  предварительно был переведен в дезоксигенированную форму. В ходе эксперимента было апробировано влияние аллостерического регулятора инозитолгексафосфата на выход целевой формы гемопротейна. Оптимальным методологическим приемом признано использование восстановителя натрия дитионита.

Химическую модификацию образцов  $hHbA_1$  осуществляли с использованием глутарового альдегида (ГА). При восстановлении дитионитом натрия  $hHb$  был дезоксигенирован посредством пропускания увлажненного тока азота над образцами при постоянном помешивании с использованием роторно-вакуумной установки Rotovar (Heidolph, Германия). Далее к дезоксигенированному раствору  $hHb$  добавляли 10 %-ный раствор дезоксигенированного глутарового альдегида до итогового молярного соотношения ГА /  $hHbA_1$  8/1. Инкубацию образцов проводили на протяжении 12 часов при  $4^\circ\text{C}$  и прекращали добавлением раствора цианоборгидрида натрия в мольном соотношении цианоборгидрида натрия к глутаровому альдегиду 10/1. Для удаления низкомолекулярных реагентов раствор  $hHbA_1$  был диализован против рабочего буфера в течение 12 часов. Полученный модифицированный гемоглобин был подвергнут фракционированию с использованием ячеек для ультрафильтрации с различными пределами отсечения масс белков.

Чистоту выделенных гемоглобинов  $HbA_1$  подтверждали методом протеомики «top-down» с использованием хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. Анализ  $HbA_1$  проводили в денатурирующих условиях на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 2,1  $\times$  150 мм «Thermo» (США). Масс-спектрометрический анализ осуществляли на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies, США).

Для анализа были взяты фракции модифицированного гемоглобина в диапазонах от 100 кДа, 50–100 кДа, 30–50 кДа и немодифицированный  $hHbA_1$ . Анализ проводили в денатурирующих условиях, что сопровождалось диссоциацией белка на отдельные субъединицы и высвобождению гема. При хроматографическом разделении

были получены пики отдельных субъединиц гемоглобинов, а также пик соответствующий диссоциированной от белка гемовой группе. Результаты масс-спектрометрического анализа представлены ниже на рис. 2.

Были моделированы спектры  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц однократно модифицированные глутаровым альдегидом. Эмпирические и моделированные масс-спектры соответствуют друг другу, что подтверждает наличие в образце модифицированных глутаровым альдегидом субъединиц. На рис. 3 представлены результаты сравнительного масс-спектрометрического анализа  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц интактного и химически модифицированного  $\text{hHbA}_1$ .

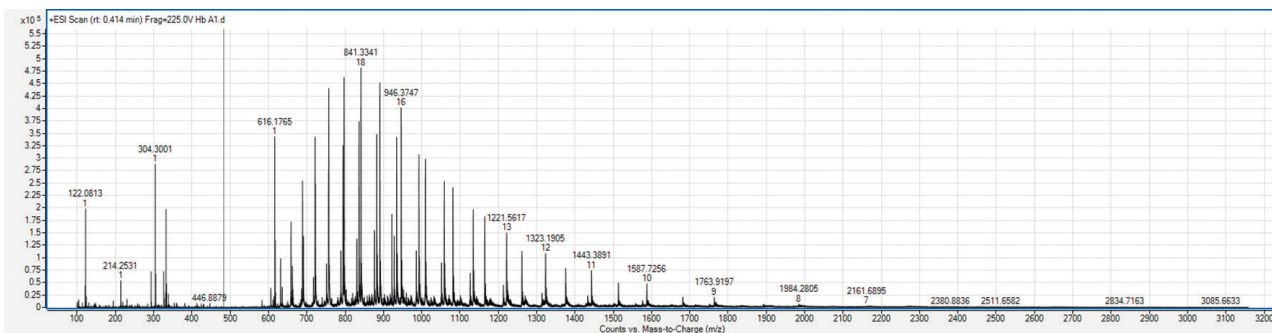


Рисунок 2 – Масс-спектр немодифицированного гемоглобина ( $\alpha$ -,  $\beta$ -субъединицы, гем)

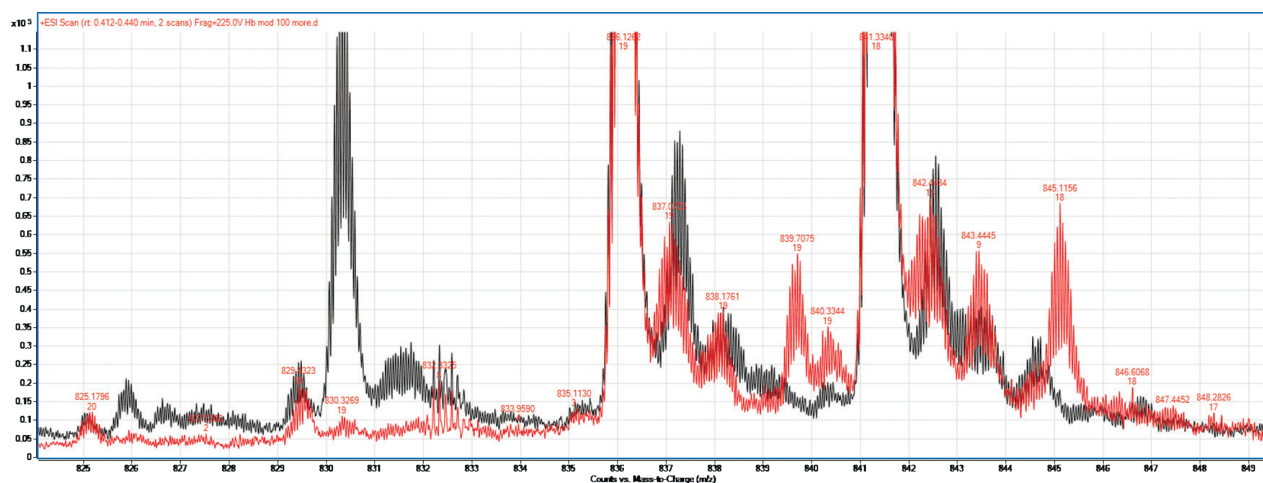


Рисунок 3 – Результаты масс-спектрометрического анализа модифицированного гемоглобина человека, демонстрирующие наличие ряда модифицированных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц данного белка (полимерная фракция) (\*фракция больше 100 кДа)

Анализ модифицированного и немодифицированного гемоглобина показал изменения зарядов у субъединиц гемоглобина, обнаружено увеличение фракций субъединиц с зарядами в области от +4 до +8. Данный факт связан с химической модификацией лизина в полипептидных цепях и, соответственно, уменьшение возможности протонирования. В модифицированной фракции преобладают менее заряженные ионы, а в не модифицированной с большим зарядом.

При проведении модификации глутаровым альдегидом  $\text{hHbA}_1$  с молярным соотношением глутарового альдегида к  $\text{hHbA}_1$  40/1, реакция проходит эффективнее, масс-спектрометрический анализ высокомолекулярных фракций показал наличие внутри- и межмолекулярных сшивок целевого белка.

Оценку молекулярной массы полученного модифицированного  $\text{hHbA}_1$  проводили методом гель-фильтрации на Agilent 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, США) с использованием гель-фильтрационной колонки ProSEC 300S 4.6×250 мм «Agilent» (США). Для построения калибровочной кривой использовалась смесь белков с известной молекулярной массой. На хроматограмме рис. 4 представлены пики, принадлежащие  $\text{hHbA}_1$ ,  $\text{hHbA}_1$  модифицированному и калибровочным белкам.

Разработанные методические подходы химической модификации гемоглобина с использованием в качестве сшивающего агента глутарового альдегида и оценкой характера модификации методами протеомики «top-down» и гель-фильтрации демонстрируют возможность контроля условий химической реакции получения как фракций гемоглобина модифицированных по поверхностным лизинам, так и содержащих внутри- и межмолекулярные сшивки. Полученные результаты будут использованы для разработки методики определения кровезаменителей на основе гемоглобина для лабораторного этапа допинг-контроля.

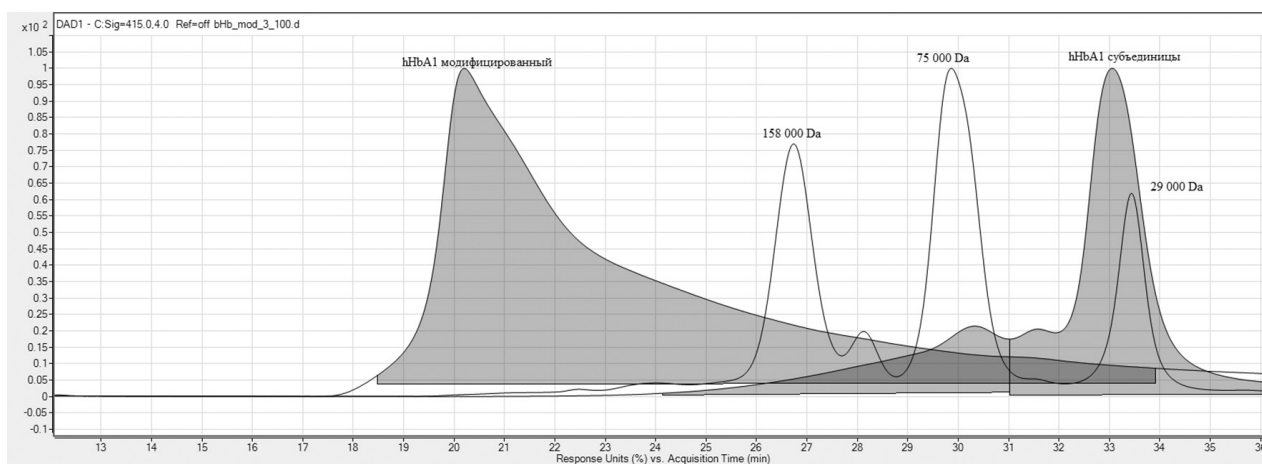


Рисунок 4 – Результаты гель-фильтрационного анализа модифицированного гемоглобина человека, демонстрирующие наличие полимеризованной фракции белка с массой более 1 000 кДа

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ness, P. M. Transfusion Medicine: An Overview and Update / Ness P. M. // Clinical Chemistry. – 2000. – Vol. 46, № 8. – P. 1270–1276.
2. Scott, M. G. Blood substitutes: evolution and future applications / Scott M. G., Kucik D. F., Goodnough // Clinical Chemistry. – 1997. – Vol. 43, № 9. – P. 1724–1731.
3. Winslow R. M. New transfusion strategies: red cell substitutes // Annual review of medicine. – 1999. – № 50. – P. 337–353.
4. Nilsson, C. L. New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry/ Nilsson C.L., Davidsson P. // Mass Spectrom. Rev. – 2000. – Vol. 19. – № 6. – P. 390–397.
5. Rachmilewitz, E. A. Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives / E. A. Rachmilewitz, J. Peisach, E. A. Rachmilewitz // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol. 246. – P. 3356–3366.

## АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ СИСТЕМЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ ПО ДАННЫМ БЕЛОРУССКОГО РЕГИСТРА ANALYSIS OF THE STRUCTURE OF CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE DIGESTIVE SYSTEM ACCORDING TO THE BELARUSIAN REGISTER

**Я. Н. Скородёнок, А. А. Ершова-Павлова, Н. В. Кокорина**  
**Y. Skorodenok, A. Ershova-Pavlova, N. Kokorina**

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
yanaskorodenok333@gmail.com  
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

Анализ данных о заболеваемости детей с врожденными пороками развития (ВПР) органов пищеварения в Республике Беларусь за период 2013–2017 гг. составил в среднем 152 случая с частотой 4,06 %. Установлено, что наиболее распространенной патологией является атрезия заднего прохода (32,7 %) и атрезия пищевода (22,4 %). Частота встречаемости составила 0,49 случая и 0,33 случая на 10 000 новорожденных, соответственно. Эффективность пренатальной диагностики за исследуемый период составила в среднем 56,0 %.

The analysis of data on morbidity of children with congenital malformations (CDF) of the digestive system in the Republic of Belarus for the period of 2013–2017 was, on average, 152 cases with a frequency of 4.06 %. It was found that the most common pathology is atresia of the anus (32.7 %) and atresia of the esophagus (22.4 %). The frequency of occurrence was 0.49 cases and 0.33 cases per 10,000 newborns, respectively. The effectiveness of prenatal diagnosis for the same period was on average 56.0 %

*Ключевые слова:* врожденные пороки развития, пищеварительная система, новорожденные, атрезия, Белорусский регистр.

*Keywords:* congenital malformations, digestive system, newborns, atresia, Belarusian register.