

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ
В ОПРЕДЕЛЕНИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕМОГЛОБИНОВ**
**HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY
IN THE DETERMINATION OF MODIFIED HEMOGLOBINS**

Д. Д. Ефимович^{1,2}, Е. Я. Рута-Жуковская¹, В. Э. Сяхович^{1,2}, Е.Н.Носевич²
D. Efimovich^{1,2}, E. Ruta-Zhukouskaia¹, V. Syakhovich^{1,2}, E. Nosevich²

¹Национальная антидопинговая лаборатория,
аг. Лесной, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
sv@antidoping.by

¹National Anti-Doping Laboratory,
Lesnoy, Republic of Belarus

²Belarussian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus

В ходе работы были разработаны подходы с использованием tandemной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, использующей процедуру протеомики «bottom-up» для определения характера химической модификации гемоглобина. В настоящей работе была проведена химическая модификация гемоглобина человека глутаровым альдегидом. Полученные данные показали, что модификация в используемых условиях проходит как по поверхностным лизинам α - и β -субъединиц, так и в центральной полости.

During this work, approaches were developed using high-resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry using the bottom-up proteomics procedure to determine the nature of the chemical modification of hemoglobin. In the present work chemical modification of human hemoglobin have been performed. The obtained data have shown that under the used conditions the modification passes not only on the surface lysines of the α - and β -subunits but also in the central cavity.

Ключевые слова: методы протеомики «bottom-up» и «top-down», tandemная хромато-масс-спектрометрия, кровезаменители на основе гемоглобина, глутаровый альдегид.

Keywords: proteomics methods “bottom-up” and “top-down”, tandem chromatography-mass spectrometry, hemoglobin-based oxygen carriers, glutaraldehyde.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-53-56>

В настоящее время одним из основных проблемных направлений допинг-контроля является выявление употребления спортсменами усилителей переноса кислорода разной природы. Это касается не только таких манипуляций, как ауто-гемотрансфузии, но и использование новых разработок в области стимуляторов гемопоэза, а также разных типов альтернативных кровезаменителей. К настоящему моменту известно большое количество кровезаменителей, одними из перспективных являются кровезаменители на основе гемоглобина – важнейшего компонента крови, обеспечивающего снабжение организма человека кислородом.

Для придания необходимых свойств данным субстанциям, а также нивелирования побочных эффектов базовые белки подвергаются химической модификации, полимеризации, сшивке с различными биологически активными молекулами, а также разными вариантами капсулирования. Такое многообразие вариантов структур затрудняет их выявление в биологических жидкостях (в частности в крови) с использованием классических методов биохимии и создание универсальной методики определения.

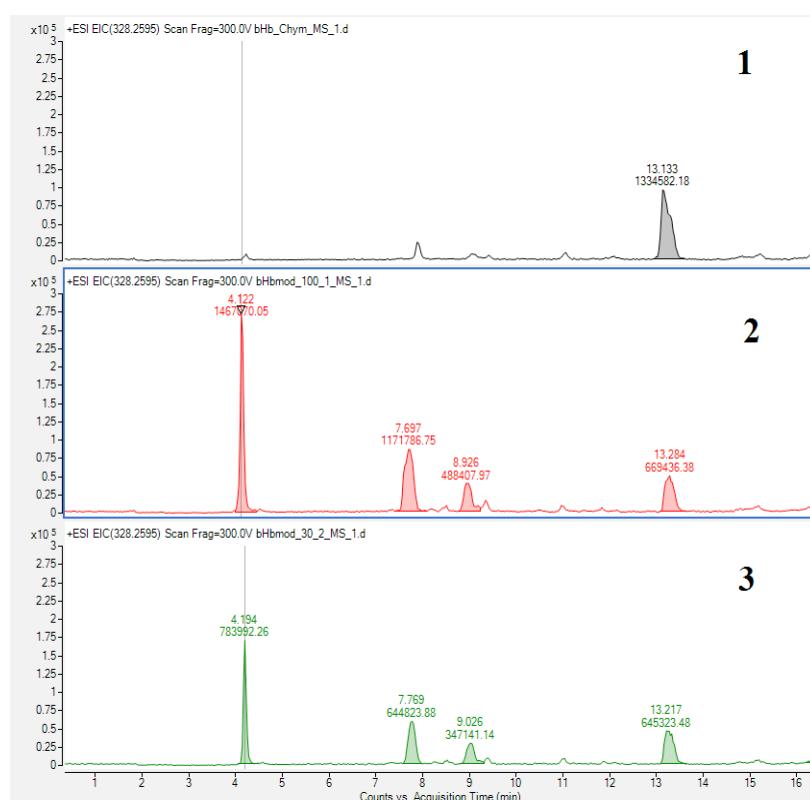
Использование методов протеомики, в частности, базирующихся на применении жидкостной хромато-масс-спектрометрии «bottom-up» и «top-down» анализов, является одним из современных направлений прикладной биохимии. Данные подходы позволяют не только определять качественный и количественный белковый состав сложных биологических матриц, но и выявлять характер и сайты модификаций биомолекул, возникших как за счет пост-трансляционной, так и искусственной химической модификации. В связи с этим методы протеомики рекомендуются Всемирным антидопинговым агентством как основные для определения запрещенных в спорте веществ белковой и пептидной природы, а также манипуляций, связанных с их применением.

Химическую модификацию образцов гемоглобина человека (далее – hHb) и бычьего гемоглобина (далее – bHb) осуществляли с использованием глутарового альдегида (далее – ГА). Одним из ключевых моментов успешного прохождения модификации гемоглобинов является дезоксигенация образцов гемоглобинов, буферных растворов и приготовленных реагентов, используемых в методике. После восстановления дитионитом натрия hHb и bHb были де-

зоксигенированы посредством пропускания увлажненного тока азота над образцами. Далее к дезоксигенированному раствору hHb и bHb добавляли глутаровый альдегид до итогового молярного соотношения 10:1 (ГА / Hb). Для прекращения реакции использовали цианоборгидрид натрия в финальном мольном соотношении 10:1 (цианоборгидрид натрия / ГА). Удаление низкомолекулярных соединений из образцов hHb и bHb было осуществлено путём диализа [4]. Полученный модифицированный гемоглобин был подвергнут фракционированию с использованием ячеек для ультрафильтрации с порогом отсечения на 100К (фракция 100) и 30К (фракция 30).

Для выявления сайтов модификации гемоглобинов, с использованием программного обеспечения Protein calculator (Thermo) были моделированы пептиды исследуемого белка, образующиеся в результате ферментативного гидролиза химотрипсином. Данная эндопротеаза катализирует гидролиз пептидных связей, в частности аминокислот тирозина, фенилаланина, триптофана и лейцина на их С-концевой стороне. Выбор химотрипсина обусловлен тем, что в отличие от широкоизвестного трипсина, разрезание не затрагивает лизины, а случае модификации лизинов глутаровым альдегидом не провоцирует появление пептидов с неполным разрезанием и облегчает их идентификацию.

Разделение полученных в результате химотриптического гидролиза пептидов проводили методом ВЭЖХ на обращенно-фазной колонке с помощью сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, Inc., США). В ходе обработки полученных результатов хромато-масс-спектрометрического анализа проведена идентификация исходных и модифицированных пептидов bHb. На рисунке 1 представлены хроматограммы и на рисунке 2 масс-спектры пептида KL однократно модифицированного глутаровым альдегидом в пробах интактного гемоглобина, а также во фракциях 30 и 100 модифицированного бычьего гемоглобина.



*Рисунок 1 – Хроматограммы пептида KL однократно модифицированного глутаровым альдегидом:
1) немодифицированный bHb, 2) фракция 100, 3) фракция 30*

Как видно из представленного выше рисунка в пробе интактного гемоглобина отсутствует пик принадлежащий модифицированному пептиду, что подтверждает его специфичность. Данный тип модификации говорит о том, что отдельные модифицированные лизины не образуют внутри- и межмолекулярных сшивок, а лишь присоединяют неполимеризованные молекулы глутарового альдегида.

Для визуализации и интерпретации полученных данных было использовано программное обеспечение CCP4 (Collaborative Computational Project No. 4 Software for Macromolecular X-Ray Crystallography Oxon, UK), с помощью которой было определено пространственное расположение модифицированного лизина в анализируемом пептиде KL, что отражено на рисунке 3.

Как видно из представленного рисунка, целевые аминокислоты локализованы в центральной полости гемоглобина. По-видимому, такое расположение лизинов и обуславливает присоединение только одной молекулы сивающего агента даже в условиях мощной полимеризации белка. В результате формируется специфический пептид, присутствие которого в анализируемой пробе позволяет подтвердить факт манипуляций, проводимых с белком и направленных на полимеризацию его глутаровым альдегидом.

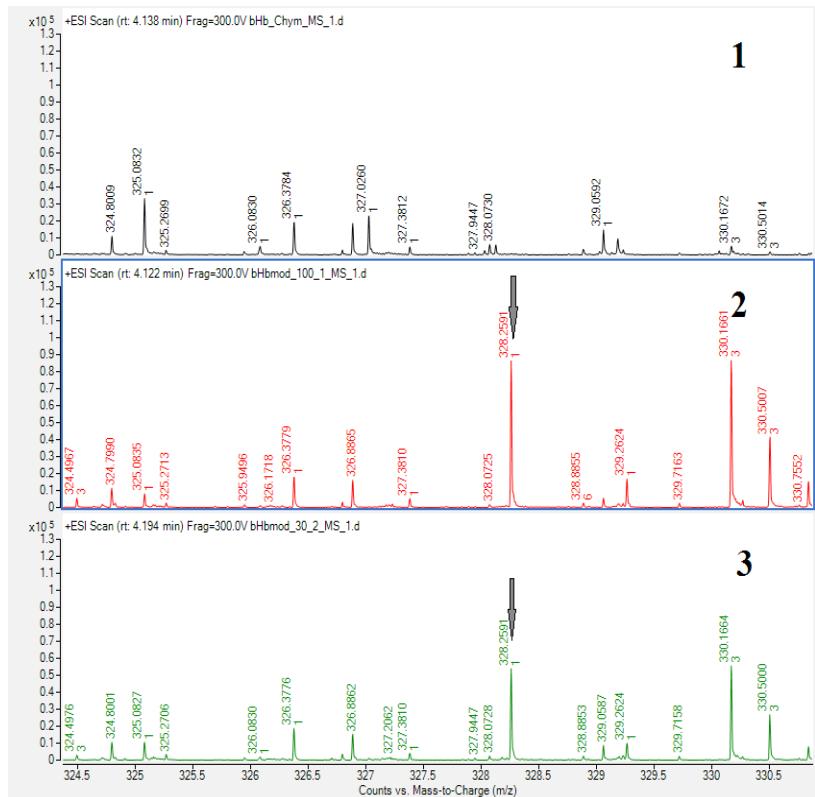


Рисунок 2 – Mass-спектр материнского иона $[M+H]^+$ m/z 328,2595 пептида KL однократно модифицированного глутаровым альдегидом: 1) немодифицированный bHb, 2) фракция 100, 3) фракция 30

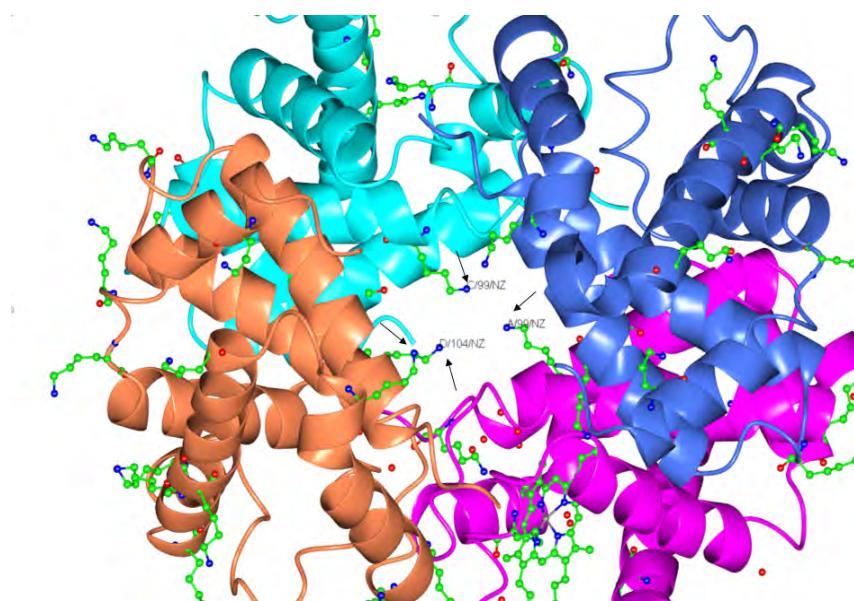


Рисунок 3 – Четвертичная форма модифицированного bHb. Стрелками обозначены лизины, входящие в пептиды KL α - и β -цепей

Таким образом, в настоящей работе с использованием метода протеомики «bottom-up» продемонстрирована возможность выявления гемоглобина, подвергшегося химической модификации глутаровым альдегидом в качестве сшивющего агента.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.

2. Kumar, S, Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human // Toxicology letters. – 2005. – № 157. – P. 175-188.
3. Nilsson, C.L New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry/ Nilsson C.L., Davidsson P. // Mass Spectrom. Rev. 2000. V. 19, N 6. P. 390–397.
4. 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.
5. Doyle, M.P. Glutaraldehyde Modification of Recombinant Human Hemoglobin Alters Its Hemodynamic Properties / M.P.Doyle, I. Apostol, B.A Kerwin // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, № 4. – P. 2583-2591.

АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПРОЦЕССА И ВОЗРАСТА

ANALYSIS OF SURVIVAL OF PANCREATIC CANCER PATIENS, DEPENDING ON THE PREVALENCE OF THE PROCESS AND AGE

Л. А. Жук^{1,2}, Г. Е. Тур²
L. Zhuk^{1,2}, G. Tur²

¹*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»,
г. Минск, Республика Беларусь
lutik25021984@gmail.com*

¹*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*
²*HI «Minsk city clinical oncologic dispensary», Minsk, Republic of Belarus*

Представлены показатели заболеваемости и выживаемости больных раком поджелудочной железы (далее – РПЖ) с учетом возраста и распространенности процесса: локальные стадии, либо при наличии регионарного или отдаленного метастазирования. Преимуществом данного популяционного анализа выживаемости является тот факт, что все пациенты с РПЖ проживают на одной территории, т.е. в г.Минске.

The morbidity and survival rates of patients with pancreatic cancer in Minsk are presented taking into account the age and prevalence of the process: local stages, or in the presence of regional or distant metastasis. The advantage of this population-based survival analysis is the fact that all patients with prostate cancer live in the same territory, i.e. in Minsk.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, анализ заболеваемости, анализ выживаемости.

Keywords: pancreatic cancer, analysis of the incidence, survival analysis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-56-59>

Рак поджелудочной железы к началу третьего тысячелетия остается самой фатальной опухолью, т.к. индекс агрессивности заболевания составляет 1:0.85. Это относительно редко возникающее заболевание, но количество пациентов с этой патологией растет. Отдаленные результаты лечения рака поджелудочной железы до настоящего времени остаются крайне неудовлетворительными.

Большинство больных (около 90 %) умирают в течение года после установления диагноза, т.к. при первичном обращении пациентов к врачу распространенные формы рака (III-IV стадии) диагностируют более чем у 70% пациентов [2]. Ранние формы РПЖ (2-4 см в диаметре) диагностируются всего в 3,8% случаев [1]. Злокачественное новообразование поджелудочной железы склонно к метастазированию в региональные лимфоузлы, легкие и печень. Непосредственное разрастание опухоли может привести к проникновению ее в двенадцатиперстную кишку, желудок, прилегающие отделы толстого кишечника [4].

Исследование охватывает период с 2000 по 2017 г. (18 лет). Материалом исследования служили данные обо всех случаях рака поджелудочной железы в г. Минске по материалам канцер-регистра Республики Беларусь. Для расчета онкологической заболеваемости сведения о численности населения получены из Главного статистического управления г. Минска. Общая наблюдаемая выживаемость рассчитывалась по методу Каплана-Майера с использованием теста «Comparing multiple samples» для сравнения нескольких групп, «Survival Analysis». Также была проведена оценка согласия теоретического и эмпирического распределений с представлением графиков функции выживания для семейства распределений Weibull, подогнанные на основе трех алгоритмов (Weight1, Weight2, Weight3). Для графического представления показателей заболеваемости и выживаемости использовалась программа TIBCO Statistica Version 13.