

становятся неэффективными. Этому способствует как нецелесообразное и бесконтрольное использование антибиотиков в медицинской практике, так и повсеместное увеличение использования антибиотиков в животноводстве и сельском хозяйстве.

В связи с этим, в каждом лечебно-профилактическом учреждении необходимо иметь данные по резистентности. В первую очередь это относится к отделениям с высокой частотой применения антибиотиков: отделения реанимации и интенсивной терапии, ожоговые, урологические, пульмонологические и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Страчунский, Л. С.* Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л. С. Страчунский, Ю. Б. Белоусов. – М.: Амалфея: Мисанта, 2002. – С. 32-39.
2. Стратегия и тактика использования антимикробных средств в ЛПУ России. Российские национальные рекомендации / Под ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда, С. В. Яковлева. – М., 2012. – 94 с.
3. *Bryan, L.* Mechanisms of plasmid mediated drug resistance / L. Bryan // *Plasmids and Transposons*. – N.Y., 1980. – P. 51–81.
4. *Fluit, A. C.* Molecular detection of antimicrobial resistance / A. C. Fluit, M. R. Visser, F. Schmitz // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – V. 14, № 4. – P. 836-871.
5. *Ruiz-Garbajosa, P.* Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. Update in Bacteriology / P. Ruiz-Garbajosa, R. Cantón // *J. of the Intern. Econ. Law*. – 2017. – no. 1.–P. 8-12.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ХАРАКТЕРИСТИКЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ «TOP-DOWN» ПРОТЕОМИКИ

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO THE ANALYSIS OF HUMAN CONFORMATIONAL FUNCTIONS USING TOP-DOWN PROTEOMICS

К. А. Белявская^{1,2}, К. Я. Буланова¹, В. Э. Сяхович^{1,2}
K. Beliauskaya^{1,2}, K. Bulanava¹, V. Syakhovich^{1,2}

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 настоящей работе была проведена химическая и тепловая денатурация инсулина человека. В результате были разработаны методические подходы к комбинированному «top-down» анализу и тандемной масс-спектрометрией инсулина человека. Данные подходы могут быть использованы совместно с методом водородно-дейтериевого обмена для характеристики конформационных изменений молекулы инсулина при воздействии различных факторов, а также при патологических процессах.

In the present work, chemical and thermal denaturation of human insulin was carried out. As a result, methodological approaches to the combined top-down analysis and tandem mass spectrometry of human insulin were developed. The developed approaches can be combined with the hydrogen-deuterium exchange method to characterize the conformational changes of the insulin molecule under the influence of various factors, as well as in pathological processes.

Ключевые слова: метод протеомтики «top-down», тандемная хромато-масс-спектрометрия, инсулин, сахарный диабет 2 типа, структура инсулина.

Keywords: “top-down” proteomics method, tandem chromatography-mass spectrometry, insulin, type 2 diabetes mellitus, insulin structure.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-26-29>

Инъекционный инсулин при действии средовых, термических и механических факторов приобретает структурные изменения, при которых глобулярная его структура трансформируется в белковые тяжи, вследствие преобразования α-цепей в β-складчатые структуры, не обладающие функциональной активностью, но способ-

ные к прогрессирующей самоассоциации. Аналогичные процессы возникают в местах подкожных инъекций растворов рекомбинантного человеческого инсулина, при этом обнаруживается снижение эффективности терапии вплоть до развития полной резистентности. Процессы фибриллообразования инсулина не только снижают терапевтический эффект, но и провоцируют образование антител в организме пациентов с сахарным диабетом. Отложения фибрилл инсулина также возможно и на стенках кровеносных сосудов, что увеличивает риск образования атеросклеротических бляшек.

В растворе инсулин обладает уникальной чертой принятия различных конформационных состояний, обеспечивая образование димеров, тетрамеров и гексамеров. Различные конформационные состояния белка зависят от общего суммарного заряда молекулы и, следовательно, могут определяться рН раствора. Инсулин является гексамерным при физиологическом рН, димерным - в минеральных кислотах, включая HCl, мономерным - в 20% уксусной кислоте. При физиологическом рН структура инсулина проявляет конформационную гибкость, поддерживая определенные соотношения между R- и T-состояниями молекул, в кислых условиях белок приобретает относительную стабильность.

Предполагается, что агрегация инсулина реализуется в несколько стадий: изначально олигомеры диссоциируют до мономеров, которые затем претерпевают конформационные изменения, и, наконец, реассоциируются в стабильные волокнистые амилоидные агрегаты, обогащенные β -складчатыми структурами. Считается, что слияние частично свернутых мономеров и появление фибриллярного инсулина обусловлено, прежде всего, межмолекулярными гидрофобными взаимодействиями в областях, сформированных β -складчатыми структурами. Глубокое знание ключевых шагов и факторов, способствующих агрегации белка, имеет решающее значение для разработки терапевтических средств, позволяющих обойти конформационные расстройства молекул, провоцирующие патологические состояния, обеспечить стабильность физической и химической целостности организма, а также стать основой для разработки систем контроля качества белковых продуктов при их промышленном производстве, переработке, транспортировке и хранении.

Важно отметить, что при сахарном диабете 2 типа (далее—СД2) в крови имеется собственный инсулин, при наличии которого глюкоза не усваивается клетками, что изначально связывалось с изменением состояния инсулиновых рецепторов. Но поскольку терапия рекомбинантным инсулином приводила к снижению уровня глюкозы в крови пациентов, это наводит на мысль, что рецептор остается функционально активным у больных диабетом 2 типа. Поскольку в последние годы была обнаружена связь между СД2 и болезнью Альцгеймера и Паркинсона, патология которых определяется трансформацией в глобулярных формах белков α -спиралей в β -складчатые тяжи, это привело к предположению, что в условиях *in vivo* в молекулах инсулина также происходят структурные преобразования, способствующие самоассоциации их в фибриллярные тяжи, определяющие развитие ряд симптомов диабета. Эти же процессы наблюдаются в экспериментах *in vitro* при действии химических или физических факторов, что предоставляет возможность создания экспериментальной модели для исследований механизмов фибриллообразования.

Стабильность белка определяется множеством сложных и взаимосвязанных химических и физических процессов. Любой из этих процессов может проявить себя негативно не только во время доставки и хранения фармацевтических белков, но также при их производстве, выделении, очистке. Понимание механизмов агрегации белков имеет решающее значение для широкого круга биомедицинских ситуаций, начиная от конформационных расстройств молекул, приводящих к формированию патологических состояний организма, вплоть до проблем, связанных с производством и доставкой фармацевтических белковых препаратов, когда важнейшим требованием является сохранение их стабильности и функциональной активности. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе самоагрегации белка, до сих пор полностью не изучены, что затрудняет поиск веществ, стабилизирующих нативную структуру протеинов.

Целью настоящей работы являлась разработка подходов к использованию комбинации «top-down» анализа и тандемной масс-спектрометрии для анализа особенностей структуры инсулина человека. Химическую денатурацию образца инсулина проводили с использованием раствора 8М мочевины. Тепловую денатурацию инсулина вызывали нагреванием до 95°C и 60°C. Восстановление и алкилирование белка, содержащегося в анализируемых образцах, проводили с использованием специального набора для восстановления и алкилирования белков, в котором восстановителем является трибутилфосфин, а алкилирующий агентом – йодацетамид. Анализ инсулина проводили методом ВЭЖХ на обращенно-фазной колонке. Масс-спектрометрическая детекция осуществлялась на высокочувствительном масс-спектрометре Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies, Inc., США). Детекцию пептидов проводили масс-спектрометрически в режиме полного сканирования в диапазоне 100-3200 m/z. Программное обеспечение Protein Calculator («Thermo») использовалось для расчетов теоретических значений m/z для фрагментов А- и В-цепей инсулина человека при степенях протонирования +1, +2, образующихся при проведении МС/МС-анализа. Расчёт молекулярных масс фрагментов инсулина производили с учётом модификации цистеинов данного белка йодацетамидом.

Исследование проводилось для тестирования эффективности масс-детекции данного белка в буферных системах и выявления денатурированных участков молекулы инсулина.

В ходе обработки полученных результатов хромато-масс-спектрометрического анализа проведена идентификация пептидов инсулина. Инсулин подвергался базовой денатурации и дальнейшему хроматографическому разделению с масс-детекцией. На рисунке 1 показаны результаты хромато-масс-спектрометрического анализа данного белка.

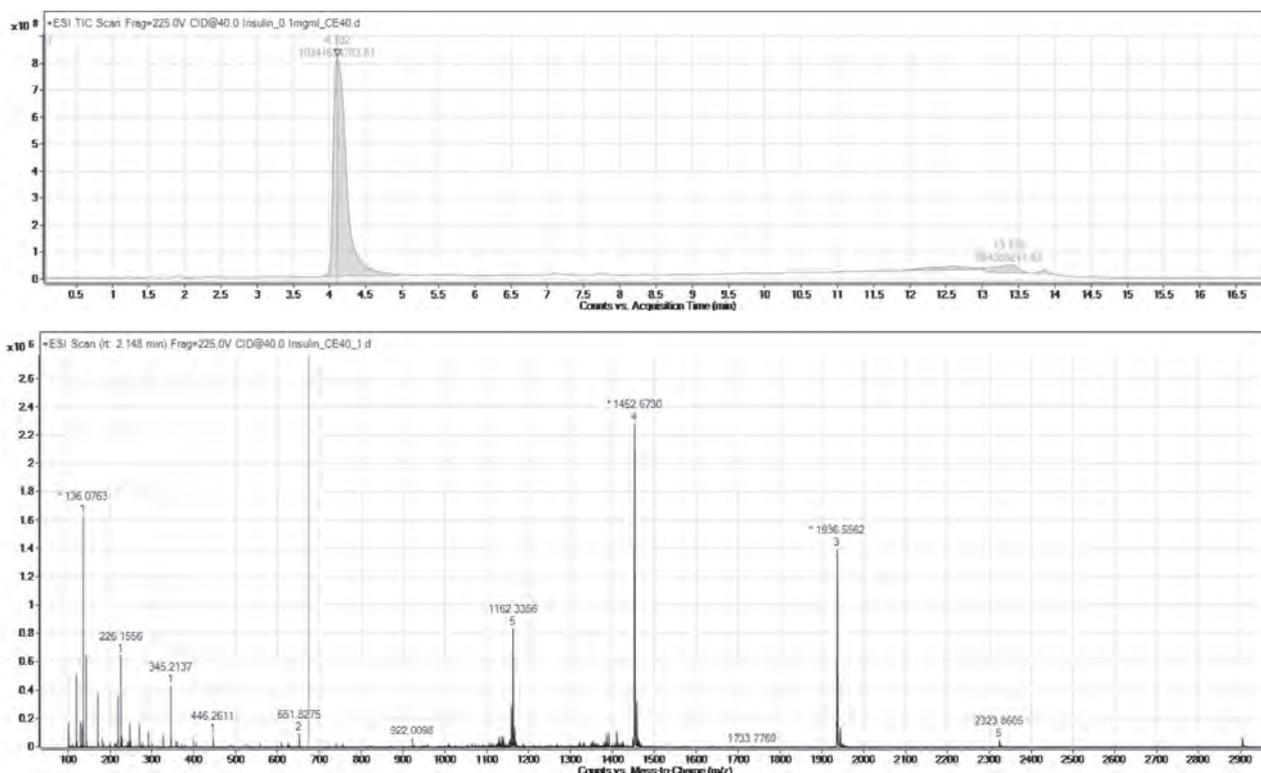


Рисунок 1 – Хроматограмма и масс-спектр инсулина, растворенного в смеси АСN:H₂O 50:50, содержащей 0.1% НСООН

Установлено, что в вышеуказанных условиях происходит частичная денатурация инсулина без разрыва дисульфидных связей. Это проявляется присутствием на хроматограмме одного пика, соответствующего целостной молекуле инсулина. Это свидетельствует о том, что мы можем получить лишь частичную информацию о функционально-значимых участках инсулина.

С целью получения отдельных цепей инсулина для дальнейшего тандемного анализа, нами было апробировано несколько вариантов денатурации: химическая с использованием раствора 8М мочевины и тепловая при температурах 95°C и 60°C. Полученные данные тепловой денатурации свидетельствуют о наличии в образцах отдельных цепей инсулина человека и отсутствие целой молекулы. Что представлено на рисунке 2.

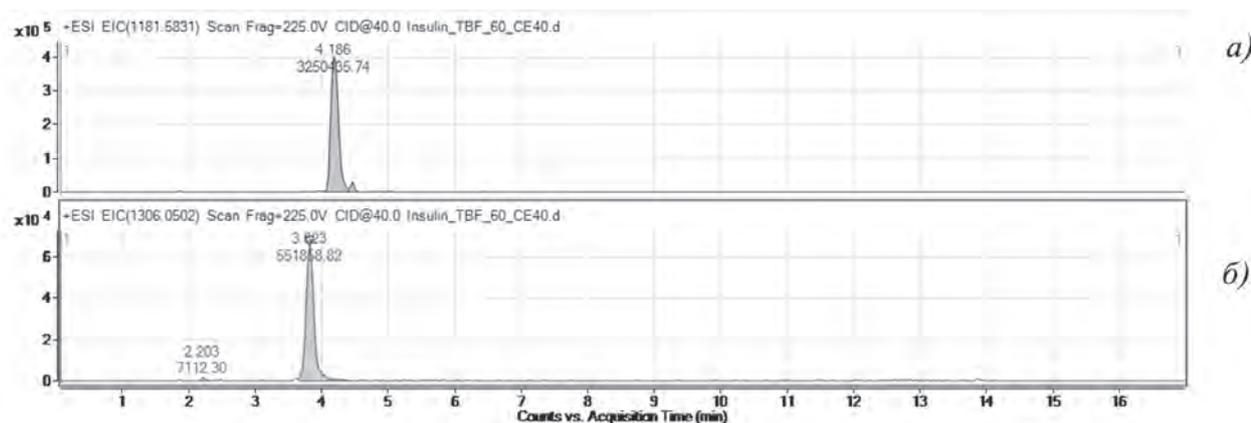


Рисунок 2 – Хроматограммы а) В-цепи и б) А-цепи инсулина человека после тепловой денатурации при 60°C в присутствии восстановительного агента

Таким образом, использование тепловой денатурации позволило достичь разрыва дисульфидных мостиков и, соответственно более детального анализа фрагментов, что важно для дальнейшего анализа молекулы инсулина с помощью метода водородно-дейтериевого обмена для характеристики конформационных изменений молекулы.

Для дальнейших манипуляций с молекулой инсулина, нами был опробован метод прямого ввода.

Образцы инсулина во время прямого ввода в прибор были подвергнуты тандемному масс-спектрометрическому анализу, при котором молекула инсулина фрагментировалась в коллизионной ячейке прибора. Что позволяет определить отдельные участки молекулы инсулина для возможного дальнейшего анализа особенностей структуры

данного белка. Полученные данные были проанализированы с учетом теоретически возможных дочерних ионов данного белка. Исследования показали, что интерпретируемой фрагментации подверглись только концевые участки белка (рис. 3).

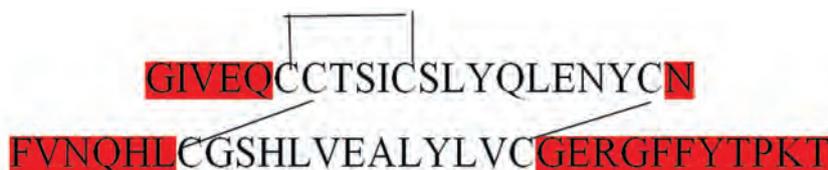


Рисунок 3 – Участки молекулы инсулина, определяемые при тандемной масс-спектрометрии целостной молекулы

Как свидетельствуют полученные данные, хорошо детектируются многозарядные ионы, соответствующие коровой части белка после отщепления концевых фрагментов с различным количеством аминокислот.

Центральная часть молекулы также подвергается фрагментации (рис.4), однако однозначной интерпретации данных препятствуют присутствующие в данном участке белка цистеиновые мостики.

Сравнительный анализ полученных результатов свидетельствует о том, что МС/МС-фрагментация целостной молекулы инсулина дает только частичную информацию о функционально важных сайтах данного белка, и для оценки изменений в других участках необходим анализ отдельных цепей инсулина.

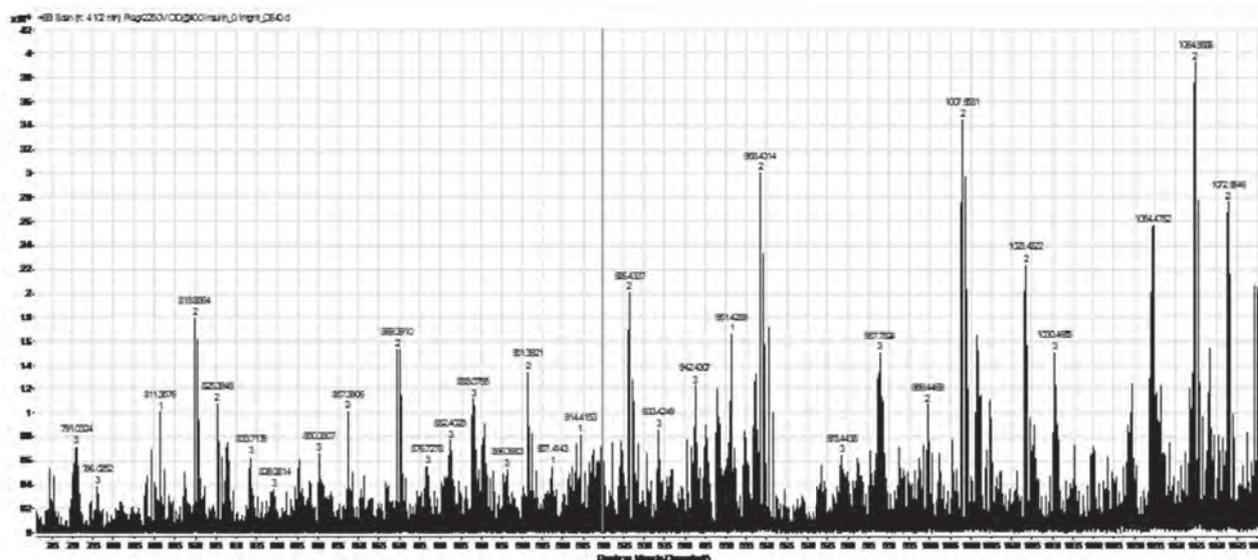


Рисунок 4 – Масс-спектр инсулина человека в области ионов, соответствующих частично фрагментированному коровому участку молекулы белка

Таким образом, в настоящей работе разработаны методические подходы к комбинированному «top-down» анализу и тандемной масс-спектрометрией инсулина человека. Разработанные подходы могут быть использованы совместно с методом водородно-дейтериевого обмена для характеристики конформационных изменений молекулы инсулина при воздействии различных факторов, а также при патологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Islet amyloid polypeptide: structure, function, and pathophysiology./ R. Acter [et al]. // J Diabetes Res 2016: 2798269. DOI:10.1155/2016/2798269 Oh.
2. Bogdanov, B.,Smith, R. // Mass Spectrom Rev, 2005. 24.–168 p.
3. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance./ Chang J. [et al]. //Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America. 2008; 105: 1739-1744.
4. Cody, Jr. R.B., Peptide mixture sequencing by tandem Fourier-transform mass spectrometry/ Jr. R.B. Cody, I.J. Amster, F.W. McLafferty // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985.–V. 82.–N 19.–P. 6367–6370.
5. Dunn, M. F. Zinc-ligand interactions modulate the Assembly and stability of the insulin hexamer - overview." *Bimetal.* 18 (4): 295-303.
6. Kinter, M., Sherman, N. Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry./ M. Kinter, N. Sherman //Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. N.Y, 2000.–320 p.