

Литература

1. Flagg T. P., Enkvetchakul D., Koster J. C., Nichols C. G. Muscle K_{ATP} Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection // *Physiol Rev.* – 2010. – Vol. 90, № 3. – P. 799-829.
2. Noma A. ATP-regulated K-channels in cardiac muscle // *Nature.* – 1983. – Vol. 305. – P. 147-148.
3. Porsolt R. D et al. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment // *Europ. J. Pharmacol.* – 1978. – Vol. 47. – P. 370-391.

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПРОТЕОМИКИ

Сяхович В. Э.^{1,2}, Рута-Жуковская Е. Я.¹,
Шевчук Д. Д.², Беляев С. А.¹

¹Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Минский район, Беларусь

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

Введение. 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 аутогемотрансфузии, но и использование новых разработок в области стимуляторов гемопоеза, а также разных типов альтернативных кровезаменителей.

Широко известное направление разработок в области альтернативных кровезаменителей – использование в качестве основы природных переносчиков кислорода, в частности гемоглобинов разного происхождения [1, 2]. 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. Упор делается на создание универсальных протеомных методик, которые за счет использования информации о специфических фрагментах разных целевых белков (в том числе модифицированных) позволяют охватить максимально широкий спектр анализируемых молекул.

Цель. Данная работа посвящена формированию аналитических подходов к разработке высокочувствительного метода определения в крови модифицированных форм гемоглобинов с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения.

Методы исследования. Химическую модификацию бычьего гемоглобина (bHb) осуществляли с использованием глутарового альдегида (ГА) в итоговом молярном соотношении 1/20-1/50. Полученный модифицированный гемоглобин был подвергнут фракционированию с использованием ячеек для ультрафильтрации с разными пределами отсечения масс белков.

Ферментативный гидролиз образцов исходного и модифицированного бычьего гемоглобина осуществляли после предварительной обработки трибутилфосфином и алкилирующим реагентом йодацетамидом. Гидролиз проводили с использованием трипсина, а также смеси эндопротеаз Glu-C и Asp-N.

Анализ гидролизатов гемоглобинов, а также «top-down» протеомные исследования проводили с использованием хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity и квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Agilent Technologies, США).

Результаты и их обсуждение. В ходе проведенных исследований изучены характер и сайты модификации α - и β -субъединиц бычьего гемоглобина глутаровым альдегидом.

Для анализа были взяты фракции модифицированного гемоглобина в диапазонах от 100 кДа, 50-100 кДа, 30-50 кДа и немодифицированный бНб. Анализ проводили в денатурирующих условиях, что сопровождалось диссоциацией белка на отдельные субъединицы и высвобождением гема. При хроматографическом разделении методом «top-down» были получены пики отдельных субъединиц гемоглобинов, а также пик, соответствующий диссоциированной от белка гемовой группе. Были моделированы спектры α - и β -субъединиц, однократно модифицированные глутаровым альдегидом, и доказано, что эмпирические и моделированные масс-спектры соответствуют друг другу, что подтверждает наличие в образце субъединиц, модифицированных глутаровым альдегидом.

С использованием программного обеспечения Protein calculator (Thermo) были моделированы пептиды исследуемого белка, образующиеся в результате ферментативного гидролиза. В ходе обработки полученных результатов хромато-масс-спектрометрического анализа проведена идентификация исходных и модифицированных пептидов бНб. Выбраны пептиды с уникальной последовательностью, которые в дальнейшем были проанализированы в режиме целевой тандемной масс-спектрометрии. Результаты исследований показали полную выявляемость и достаточную интенсивность выбранных пептидов в пробах, содержащих целевой гемоглобин.

Выводы. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методики определения кровезаменителей на основе гемоглобина для лабораторного этапа допинг-контроля.

Литература

1. Иваницкий Г. Р. Донорская кровь и ее альтернативы. Перфторорганические соединения в биологии и медицине // Пушино. – 1999. – С. 5-20.
2. Усенко Л. В., Шифрин Г. А. Интенсивная терапия при кровопотере. – 2-е изд., исправ. и доп. – К.: Здоров'я. – 1995. – 235 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСПОРТА ГЛЮКОЗЫ, КИСЛОРОДА И УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Титовец Э. П.

ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии», г. Минск, Беларусь
eptitovets@gmail.com

Глюкоза и кислород – обязательные энергетические субстраты головного мозга (ГМ) и их непрерывная доставка, как и выведение углекислого газа, имеют первостепенное значение для его физиологии и выживания. В настоящее время преобладает мнение о том, что движение этих субстратов между капиллярами и нейронами осуществляется по механизму физико-химической диффузии, согласно модели Крога [1, 2]. В соответствии с концепцией модели Крога, среда переноса, включая жидкость интерстициального пространства, должна оставаться неподвижной.

Интерстициальное пространство ГМ распространяется вокруг клеток слоями шириной 10-40 нм. Трубочатые туннели диаметром 40-80 нм соединяют эти слои в своеобразную сеть трубопроводов [3]. С ортодоксальных позиций наноразмерность интерстициального пространства интерпретируется как доказательство того, что сколько-нибудь существенное конвективное движение жидкости в нем невозможно.

Междисциплинарный подход позволяет рассматривать интерстициальное пространство ГМ как нанофлюидный домен, в котором реализуется быстрое конвективное движение жидкости по закономерностям нанофлюидики [4, 5].