Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 5, с. 599-602.

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 578.064
©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОМА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ НА РАННЕЙ СТАДИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Ю.С. Кисриева[1]*, Н.А. Петушкова[1], Н.Ф. Саменкова[1], Г.П. Кузнецова[1], О.В. Ларина[1], М.Г. Завьялова[1], Н.Б. Теряева[2], А.Ю. Беляев[2], И.И. Карузина[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: +7 (499) 246-33-75; факс: +7(499)245-08-57; эл. почта: juliaks@bk.ru
[2]Научно-исследовательский институт нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко,
125047, г. Москва, ул. 4-ая Тверская-Ямская, д. 16

Методом сравнительного протеомного анализа на базе технологии тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии ВЭЖХ-МС/МС исследовали белковый профиль плазмы крови больных хронической церебральной ишемией. Анализ масс-спектрометрических данных, проведенный в автоматизированном режиме с использованием программного обеспечения Progenesis LS-MS, позволил идентифицировать 43 белка. Выявлены различия в исследуемой группе по сравнению с контролем по 7 белкам, относящимся к иммунной системе, системе поддержания гемостаза и метаболизма липидов.

Ключевые слова: ишемия мозга, плазма крови, жидкостная хромато-масс-спектрометрия, протеом

DOI 10.18097/PBMC20166205599

ВВЕДЕНИЕ

Плазма крови человека является доступным и удобным объектом для протеомных исследований [1]. Помимо основных сывороточных белков в ней содержатся в небольших количествах белки различных тканей, попадающие в плазму в результате секреции или разрушения клеток. Ишемия мозга – хроническая болезнь, вызванная нарушением снабжения кислородом клеток мозга, часто приводящая к серьезным нарушениям функций головного мозга – ишемическому инсульту, который является ведущей причиной смерти и инвалидности в промышленно развитых странах [2]. Степень ишемического повреждения находится в зависимости от глубины и длительности снижения церебрального кровотока. Особого внимания заслуживают ранние стадии церебральной ишемии, так как именно на этих стадиях возможно добиться наибольшего лечебного эффекта. В связи с этим исследования ранних стадий церебральной ишемии имеют большую медицинскую и социальную значимость. В настоящее время не существует надёжных биомаркеров плазмы крови для раннего обнаружения церебральной ишемии. В данной работе была предпринята попытка, используя ВЭЖХ-МС/МС, зафиксировать различия белкового состава обедненной плазмы крови больных ишемией мозга и индивидов группы контроля.

МЕТОДИКА

В работе использованы следующие реактивы: трипсин из поджелудочной железы свиньи модифицированный лиофилизированный (“Promega”, США); трифторуксусная кислота (ТФУ, “Fluka”, Германия); ацетонитрил, дитиотреитол (ДТТ) и деинизованная вода (“Acros”, США); метанол, 2,2-бицинхониновая кислота (“Pierce”, США); сегнетова соль, натрия гидрокарбонат, натрия карбонат безводный, натрия гидроксид, сульфат меди, бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Sigma”, США), а также реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.”

Образцы здоровой плазмы крови человека и больных церебральной ишемией (n=4) предоставлены лабораторией клинической биохимии НИИ нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко. От всех больных и здоровых доноров получены информационные согласия на проведение исследований.

Материалом исследования служили пробы плазмы крови с ЭДТА, полученной венопункцией утром натощак. Образцы крови сразу переносили на лёд и центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при температуре 4°C не позднее одного часа после забора крови. Полученную плазму помещали в стерильную пробирку и хранили при -80°C до проведения дальнейших протеомных исследований.

Обеднение плазмы (удаление альбумина и IgG) проводили с помощью микрогранул ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit (“Sigma-Aldrich”, США) согласно протоколу производителя. На афинную колонку наносили 27-30 мкл плазмы (2 мг общего белка).

Концентрацию белка в образцах обеднённой фракции плазмы крови определяли бицинхониновым методом [3] при длине волны 562 нм, с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Восстановление, алкилирование, триптический гидролиз белков плазмы и очистку раствора пептидов проводили по протоколу PlasmaDeepDive™

* - адресат для переписки

(Швейцария, версия 1.02). Элюаты объединяли и высушивали при 30°С на центрифужном испарителе EppendorfConcentrator 5301 (Германия).

В данной работе образцы пептидов были проанализированы с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 nano-flow HPLC (“Dionex”, США), интегрированной с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive (“Thermo Scientific”, США) с источником электростатической ионизации Nanospray Flex NG ion source (“Thermo Scientific”). Разделение пептидов проводили на аналитической колонке Zorbax 300SB-C18 (“Agilent Technologies”, США), носитель C18 3,5 мкм, внутренний диаметр 75 мкм, длина 150 мм, размер пор 300 Å) в линейном градиенте подвижных фаз растворителя А (вода, 0,1% муравьиная кислота) и растворителя В (вода, 0,1% муравьиная кислота и 80% ацетонитрил) от 5% до 60% растворителя В в течение 95 мин при скорости потока 0,3 мкл/мин. Спектры снимали в режиме детекции положительно заряженных ионов с разрешением R=70K (нормировано для *m/z* 400) для фронтального сканирования и R=15K (нормировано для *m/z* 400) для тандемного сканирования. Для регистрации тандемных спектров использовали высокоэнергетическую диссоциацию, индуцированную столкновением HCD (Higher energy collisional dissociation). Энергию активации соударений устанавливали 35 эВ. Однозарядные ионы и ионы с недеконволюированным зарядным состоянием исключали при МС-сканировании.

Масс-спектры в формате “raw”, полученные методом ВЭЖХ-МС/МС, обрабатывали с использованием программного обеспечения Progenesis LS-MS (“Nonlinear Dynamics”, США), далее файл в формате “.mgf” загружали в программу Mascot (“MatrixScience”, США) (www.matrixscience.com) и проводили идентификацию белков. Выходные данные Mascot в формате “.xml” импортировали в Progenesis LC-MS для статистической обработки списка идентифицированных белков. Параметры поиска белков в программе Mascot были следующие: база данных – Swiss-Prot (версия 2012_11), для таксономической группы Homo Sapiens; расщепляющий фермент – трипсин; возможные модификации – окисление метионина (в качестве переменной модификации) и карбамидометилирование цистеина (фиксированная модификация); точность определения масс прекурсорных ионов ± 15 м.д.; заряд пептидов: 2+,3+,4+; точность определения масс фрагментных ионов ±0,05 Да; допускается не более одного внутрипептидного участка расщепления. Большинство белков идентифицировано по ≥3 пептидам. Протеомный анализ проводили в трёх технических повторах. Достоверным считали идентификацию белка по двум и более пептидам с индексом достоверности идентификации Score ≤13.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка протеома плазмы крови является сложной задачей из-за высокой концентрации альбумина и иммуноглобулинов, которые мешают детектировать белки, присутствующие в более низких концентрациях [1, 4]. Нам удалось снизить концентрацию альбумина (на 95%) и иммуноглобулина G (на 85%) в плазме крови с помощью микрогранул ProteoPrep Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit. Гидролизованные трипсином белки обедненной плазмы анализировали безгелевым методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). При идентификации пептидов и определении интенсивности в программе Progenesis LS-MS в качестве меры интенсивности пика использовали величину “Average Normalized abundance” (средняя интенсивность сигнала).

Всего идентифицировано 43 белка (таблица). Выявлены различия содержания в 1,5-2 раза по сравнению с контролем ограниченного числа белков. Не менее 3 белков присутствуют в плазме больных ишемией в повышенном и не менее 4 – в пониженном количестве по сравнению с контролем. Идентифицированные белки могут быть интересны для раннего обнаружения признаков ишемии мозга по анализу протеома плазмы крови. Как видно из таблицы, в плазме крови больных церебральной ишемией наблюдалось увеличение уровня аполипопротеинов Е и С-3 по сравнению с контролем. Повышение уровня APOE и APOC3 может указывать на изменения в системе липидного транспорта. Известно, что повышенные уровни APOC3 связаны с первичной и вторичной гипертриглицеридемией – повышенным содержанием в крови глицеридов при патологических изменениях внутренних органов и связаны с риском развития инсульта [5].

Зафиксированное увеличение уровня фибриногенов бета и гамма, необходимых для поддержания гемостаза может быть следствием снижения мозгового кровотока [6-9]. Среди белков с неизменным уровнем мы идентифицировали такие, интересные с точки зрения ишемического инсульта белки, как Haptoglobin, Apolipoprotein A-I , Apolipoprotein A-II, Apolipoprotein B-100, Apolipoprotein C-I, Ceruloplasmin, Ig lambda-3 chain C regions, Complement factor B, Antithrombin-III, Vitamin D-binding protein, Vitronectin. Известно, что уровень этих белков изменяется в плазме крови пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями и инсультом [10, 11]. Так, концентрация аполипопротеина А1 напрямую связана с наличием или отсутствием воспалительного процесса в очаге ишемического повреждения [12]. Несмотря на высокую вариабельность протеома плазмы крови, концентрация в контрольной плазме крови аполипопротеина А1 практически не отличается от таковой в опытной группе, что можно расценивать как свидетельство незначительных цереброваскулярных повреждений у обследованных пациентов.

Наблюдаемое снижение содержания по сравнению с контролем таких белков как Ig kappa chain C region и Protein AMBP может быть интересно для дальнейшего исследования терапии иммуноглобулинами больных церебральной ишемией. Например, белок AMBP участвует в негативной регуляции иммунного

Таблица. Белки плазмы крови здоровых доноров и больных на ранней стадии хронической церебральной ишемии

№ п/п	SwissProt идентификатор	Название белка	Молекулярная Масса, Da	Степень различия между содержанием белков	Score	Число пептидов, пошедших на идентификацию	Средняя интенсивность сигнала	
							Контроль	Ишемия
1	TRFE	Serotransferrin	81216	1,19	2426,69	34 (32)	1,25e+007	1,05e+007
2	IGHA1	Ig alpha-1 chain C region	39207	1,44	1819,18	19 (7)	3,33e+006	2,31e+006
3	HPT	Haptoglobin	46437	1,14	1554,53	25 (16)	7,05e+006	8,07e+006
4	APOA1	Apolipoprotein A-I	30759	1,12	1505,84	23 (21)	1,66e+007	1,48e+007
5	A2MG	Alpha-2-macroglobulin	165814	1,22	1422,47	30 (23)	3,10e+006	3,79e+006
6	A1AT	Alpha-1-antitrypsin	47022	1,16	1226,33	17 (16)	1,18e+007	1,37e+007
7	FIBA	Fibrinogen alpha chain	96280	1,15	1217,64	26	4,23e+006	4,89e+006
8	FIBG	Fibrinogen gamma chain	52634	1,35	1049,16	17	2,67e+006	3,62e+006
9	HEMO	Hemopexin	53009	1,44	915,95	12 (11)	3,75e+006	5,40e+006
10	**FIBB**	**Fibrinogen beta chain**	57153	1,51	630,82	16 (15)	1,50e+006	2,26e+006
11	A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23917	1,45	565,15	3	2,05e+006	1,41e+006
12	**HBB**	**Hemoglobin subunit beta**	16198	1,79	557,21	10	3,82e+006	2,13e+006
13	VTDB	Vitamin D-binding protein	55871	1,06	520,57	11	4,18e+006	4,45e+006
14	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	55270	1,2	515,22	13	1,82e+006	2,18e+006
15	IGHM	Ig mu chain C region	50536	1,33	455,69	10 (3)	6,84e+005	5,13e+005
16	**IGKC**	**Ig kappa chain C region**	11917	1,92	454,01	7	5,80e+006	3,03e+006
17	ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	107237	1,32	309,96	14 (13)	2,38e+006	1,80e+006
18	**HBA**	**Hemoglobin subunit alpha**	15353	1,84	281,16	6	1,28e+006	6,95e+005
19	**APOC3**	**Apolipoprotein C-III**	10846	1,97	275,95	2	6,83e+004	1,34e+005
20	CERU	Ceruloplasmin	123703	1,02	272,54	10	1,40e+006	1,43e+006
21	THRB	Prothrombin	70037	1,18	228,18	5	2,50e+005	2,13e+005
22	APOB	Apolipoprotein B-100	517804	1,04	220,93	13 (11)	1,61e+006	1,55e+006
23	ALBU	Serum albumin	72999	1,21	209,39	8	8,14e+005	9,85e+005
24	APOA2	Apolipoprotein A-II	11378	1,06	208,58	6 (5)	1,82e+006	1,71e+006
25	APOH	Beta-2-glycoprotein 1	38298	1,04	203,2	5	1,60e+006	1,54e+006
26	VTNC	Vitronectin	55742	1,19	178,31	5 (4)	6,57e+005	7,80e+005
27	AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	47650	1,1	148,76	8 (7)	1,13e+006	1,02e+006
28	ANT3	Antithrombin-III	53409	1,08	133,42	6	7,23e+005	6,70e+005
29	KNG1	Kininogen-1	71957	1,08	125,86	6	4,32e+005	4,01e+005
30	LAC3	Ig lambda-3 chain C regions	11546	1,04	111,26	6 (4)	2,20e+005	2,29e+005
31	HV305	Ig heavy chain V-III region BRO	13227	1,23	107,76	2	3,40e+005	2,76e+005
32	APOC1	Apolipoprotein C-I	9326	1,01	94,89	3	5,41e+005	5,34e+005
33	CFAB	Complement factor B	85533	1,01	91,59	5	8,85e+005	8,97e+005
34	FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	39325	1,38	86,64	3	5,50e+005	3,99e+005
35	AFAM	Afamin	72596	1,17	67,74	4 (3)	8,98e+005	7,66e+005
36	ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	101389	1,43	67,13	2	3,90e+005	2,73e+005
37	CLUS	Clusterin	53512	1,26	63,81	4	2,09e+005	2,64e+005
38	**APOE**	**Apolipoprotein E**	36342	1,75	62,34	2	7555,52	1,32e+004
39	**AMBP**	**Protein AMBP**	38999	1,56	43,22	3 (2)	2,68e+005	1,72e+005
40	PON1	Serum paraoxonase/aryl-esterase 1	39731	1,1	39,53	3 (2)	1,57e+005	1,73e+005
41	ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103357	1,2	38,92	5	3,71e+005	3,09e+005
42	PLMN	Plasminogen	90569	1,03	36,01	3 (2)	7,31e+004	7,10e+004
43	CFAI	Complement factor I	65750	1,06	17,65	3 (2)	1,67e+005	1,78e+005

Примечание: Жирным шрифтом выделены белки, содержание которых в контроле и у пациентов с церебральной ишемией различалось не менее 1,5-2 раз.

ответа и является противовоспалительным агентом, ингибитором протеаз. На мышиной модели церебрального инсульта обнаружено значительное снижение уровня этого белка в плазме [13]. Содержание Ig alpha-1 chain C region, Ig mu chain C region, Alpha-1-acid glycoprotein 1 и Alpha-HS-glycoprotein снижено по сравнению с контролем не так значительно.

Таким образом, протеом плазмы крови больных церебральной ишемией на ранней стадии мало отличается от протеома плазмы контрольной группы. Тем не менее, полученные нами данные свидетельствуют о том, что на ранней стадии хронической ишемии мозга происходят изменения протеома плазмы, затрагивающие белки иммунной системы, системы поддержания гемостаза, а также метаболизма липидов. Для подтверждения и уточнения полученных результатов на более репрезентативном количестве образцов необходимы дальнейшие исследования.

Масс-спектрометрические измерения выполнены в рамках программы фундаментальных научных исследований и поддержаны грантом РНФ №14-25-00132.

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson N.L., Anderson N.G.* (2002) Mol. Cel. Proteomics, **1**, 845-867.
2. *Minino A.M., Arias E., Kochanek K.D., Murphy S.L., Smith B.L.* (2002) Natl. Vital. Stat. Rep., **50**, 1-119.
3. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* (1985) Anal Biochem., **150**(1), 76-85.
4. *Dardé V.M., Barderas M.G., Vivanco F.* (2007) Cardiovascular Proteomics, series Methods in Molecular Biology, **357**, 351-364.
5. *Allard L., Lescuyer P., Burgess J., Leung K., Ward M., Walter N., Burkhard P.R., Corthals G., Hochstrasser D.F., Sanchez J.-C.* (2004) Proteomics, **4**, 2242-2251.
6. *D'Uva M., Di Micco P., Strina I., Ranieri A., Alviggi C., Mollo A., Fabozzi F., Cacciapuoti L., Scotto di Frega M.T., Iannuzzo M., De Placido G.* (2008) Biologics, **2**(4), 897-902.
7. *Ntaios G., Gurer O., Faouzi M., Aubert C., Michel P.* (2010) Cerebrovasc Dis., **29**(5), 484-489.
8. *Jood K., Danielson J., Ladenvall C., Blomstrand C., Jern C.* (2008) J Thromb Haemost., **6**, 897-904.
9. *del Zoppo G.J., Levy D.E., Wasiewski W.W., Pancioli A.M., Demchuk A.M., Trammel J., Demaerschalk B.M., Kaste M., Albers G.W., Ringelstein E.B.* (2009) Stroke, **40**(5), 1687-1691.
10. *Anderson L.* (2005) J. Physiol., Feb 15, **563**(Pt 1), 23-60.
11. *Hepponstall M., Ignjatovic V., Binos S., Monagle P., Jones B., Cheung M.H., d'Udekem Y., Konstantinov I.E.* (2012) PLoS One, **7**(11), doi: 10.1371/journal.pone.0048284.
12. *Chait A., Han C.Y., Oram J.F., Heinecke J.W.* (2005) J. Lipid Res., **46**, 389-403.
13. *Chaung W.W., Wu R., Ji Y., Wang Z., Dong W., Cheyuo C., Qi L., Qiang X., Wang H., Wang P.* (2011) Mol Med., **17**(9-10), 1075-1083.

Поступила: 10. 03. 2016.
Принята к печати: 27. 09. 2016.

COMPARATIVE PROTEOME ANALYSIS OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH EARLY-STAGE CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA

Y.S. Kisrieva[1], N.A. Petushkova[1], N.F. Samenkova[1], G.P. Kuznetsova[1], O.B. Larina[1], M.G. Zavialova[1], N.B. Teryaeva[2], A.Y. Belyaev[2], I.I. Karuzina[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)246-33-75; fax: +7(499)245-08-57; e-mail: juliaks@bk.ru
[2]Burdenko Institute of Neurosurgery, 16, 4th Tverskaya-d. str., Moscow, 125047 Russi

In the present study, we explored the technology of liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for the proteome analysis of blood plasma of patients with early chronic cerebral ischemia. Analysis of mass-spectrometer data carried out in automatic mode using the software Progenesis LS-MS. As a result of this study identified 43 proteins. The differences identified in the study group compared with the control in 7 proteins. It was found that in the early stages of chronic cerebral ischemia proteome changes in blood plasma affect proteins related to the immune system, the system for the maintenance of hemostasis and lipid metabolism.

Key words: cerebral ischemia, blood plasma proteome, Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, Orbitrap