

Исследование пептидома образцов мочи беременных женщин при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения.

В.В. Байбакова¹, Н.Л. Стародубцева^{2,3}, А.С. Кононихин^{1,3}, А.Е. Бугрова^{2,4}, В.А. Сергеева², С.И. Пеков¹, И.А. Попов¹, Е.Н. Николаев^{3,4}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова
Минздрава России, Москва

³ФБУН Институт энергетических проблем химической физики РАН, Москва

⁴ФБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Преэклампсия (ПЭ) – это сложное патологическое состояние, проявляющееся во второй половине беременности (после 20 недели), характеризующееся повышенной гипертензией ($\geq 140/90$ мм.рт.ст) в комбинации с протеинурией (≥ 0.3 г/л в день), часто с отеками и проявляющаяся в дисфункции систем и полиорганной недостаточности. По степени тяжести она была разделена на умеренную (уПЭ) и тяжелую (тПЭ) формы. ПЭ возникает в 2-8% случаев при беременности и остается ведущей причиной материнской и перинатальной смертности и заболеваемости. Причины возникновения ПЭ до сих пор не изучены.

В поиске предикторов заболевания применяются системные подходы, такие как протеомные исследования. Целью данной работы было исследовать пептидом мочи беременных женщин при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения.

Пептиды выделялись из образцов посредством гель-фильтрации или эксклюзионной хроматографии (GF; SEC) - это разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (большой молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. Протокол проиллюстрирован на рисунке 1.

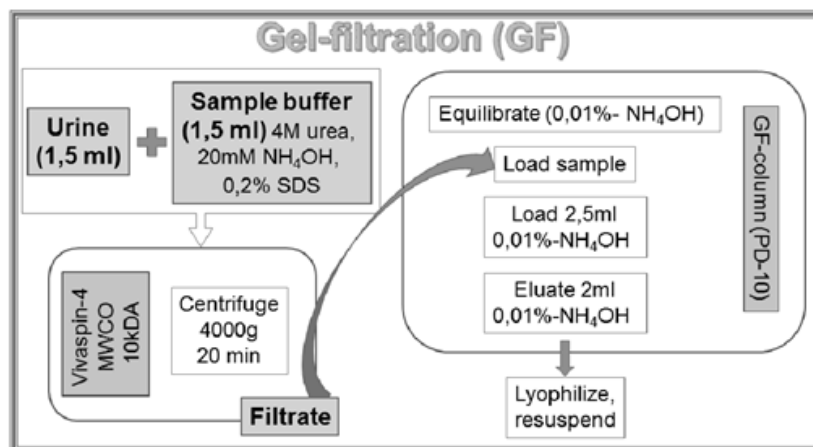


Рис. 1. Протокол гель-фильтрации (SEC)

Выделенные пептиды проходили процесс лиофилизации. Затем анализировались с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (от англ. MALDI, Matrix Assisted Laser Desorbition/Ionization) в сочетании с времяпролетным масс-анализатором. MALDI - это десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Матрица представляет собой материал, свойства которого обуславливают понижение деструктивных свойств лазерного излучения и ионизацию анализируемого вещества. TOF (Time of Flight - времяпролетный) – принцип устройства анализатора масс-спектрометра, в котором частицы с зарядом z разделяются по времени пролета t определенного расстояния L , находясь в ускоряющей разности потенциалов U .

$$zeU = \frac{mv^2}{2} = \frac{m}{2} \cdot \left(\frac{L}{t}\right)^2 \quad (1)$$

$$t = L \sqrt{\frac{m}{z} \cdot \frac{1}{2eU}} \quad (2)$$

Как видно из формулы (2), при этом время пролета частицы пропорционально отношению массы данной частицы к ее заряду.

Пример спектра на рисунке 2.

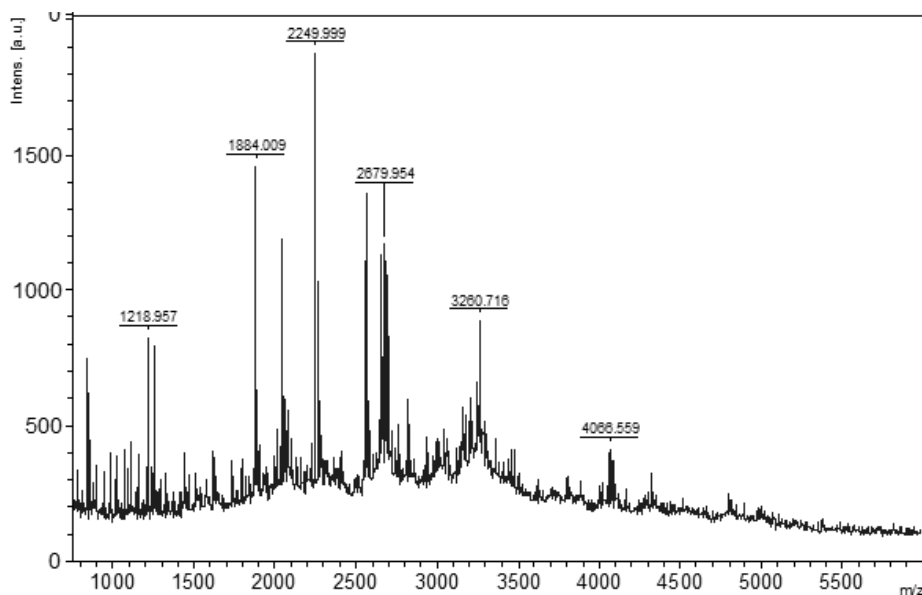


Рис. 2. MALDI-TOF спектр пептидов, выделенных методом SEC, ранняя тяжелая степень ПЭ

Для сравнения, образцы исследованы с помощью MALDI-TOF /TOF – метода, основанного на том же принципе, но с дополнительной возможностью последующего MS/MS анализа для секвенирования интересующего пептида.

Также пептиды анализировались методом жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (LC-MSMS). Основой хроматографического разделения является участие компонентов разделяемой смеси в сложной системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (преимущественно межмолекулярных) на границе раздела фаз. Пример спектра приведен на рисунке 3.

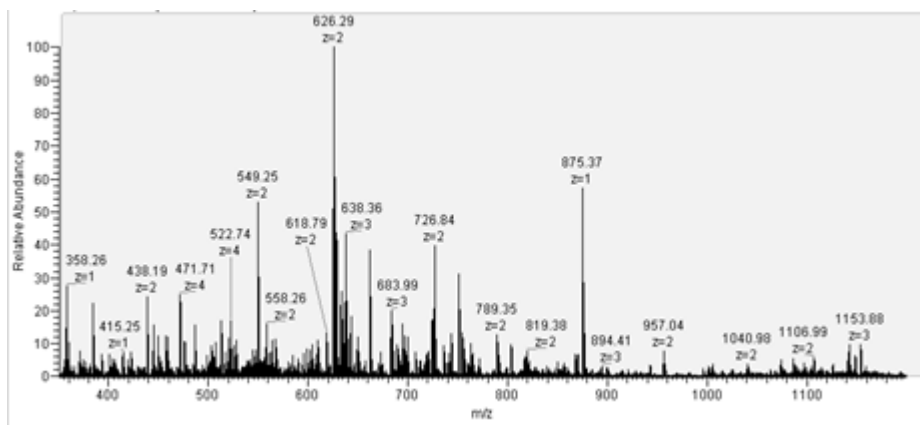


Рис. 3. LC-MSMS спектр пептидов, выделенных методом SEC, контроль

С помощью описанных выше методов проанализированы образцы, взятые у беременных женщин с разной степенью ПЭ, и сравнены полученные спектры.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 16-54-21011 SNF а, № 14-08-01236 А.

Литература

1. A.S. Kononikhin, N.L. Starodubtseva, A.E. Bugrova, V.A. Shirokova, V.V. Chagovets, M.I. Indeykina, I.A. Popov, Y.I. Kostyukovich, O.V. Vavina, K. Muminova, Z.S. Khodzhaeva, N.E. Kan, V.E. Frankevich, E.N. Nikolaev, G.T. Sukhikh. An untargeted approach for the analysis of the urine peptidome of women with preeclampsia // Journal of Proteomics. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.024