
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ ДЛЯ БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

УДК 543.51: 577.1: 66.096.3

© А. В. Протасов, А. С. Тараскин, Я. А. Забродская, Р. А. Бубляев, Л. Н. Новикова,
О. А. Миргородская, 2019**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЯДА МАРКЕРОВ
СЫВОРОТКИ КРОВИ БЕЗ ЕЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРИПСИНА
С АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНОМ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ MALDI-MS**

Концентрация альфа-2-макроглобулина ($\alpha 2$ -MG) в сыворотке может значительно варьироваться при ряде заболеваний, поэтому количественное определение этого белка используется в диагностике. Рутинные иммунологические или ферментативные методы определения концентрации $\alpha 2$ -MG в сыворотке довольно сложны. Методы требуют специфических антител или измерения скорости гидролиза конкретных субстратов и не отличают свободную форму $\alpha 2$ -MG от связанной. Мы предлагаем новый масс-спектрометрический подход для идентификации и количественного определения некоторых биомаркеров сыворотки крови на основе структурно-функциональных характеристик взаимодействия $\alpha 2$ -MG с трипсином, характеризующегося отщеплением пептида VGFYESDVMGR. Была разработана методика изотопного обмена (^{18}O) для приготовления внутреннего стандарта, включая прямой изотопный обмен в сыворотке крови. Количественный потенциал предлагаемой методики превращает масс-спектрометрию (MALDI) в подходящий и эффективный инструмент для диагностики воспалительных процессов. Возможности предложенного подхода были продемонстрированы на примерах определения концентрации активной формы $\alpha 2$ -MG человека в сыворотке крови пациентов с заболеваниями легких. Высокий потенциал предложенного метода позволяет распространять его на белки, которые образуют комплексы с трипсином, но в которых в отличие от человеческого $\alpha 2$ -MG не происходит отщепления свободных пептидов. К ним относятся альфа-1-антитрипсин ($\alpha 1$ -AT), мышинный $\alpha 2$ -MG и ряд других сывороточных белков. Применение метода показано при тестировании противовирусного препарата "Триазид" на модели мышей.

Кл. сл.: альфа-2-макроглобулин, количественная масс-спектрометрия, биомаркеры, сывороточный амилоид А, альфа-1-антитрипсин

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$\alpha 1$ -AT —	альфа-1-антитрипсин
$\alpha 2$ -MG —	альфа-2-макроглобулин
ИФА —	идиопатический фиброзирующий альвеолит
ТФУ —	трифторуксусная кислота
MALDI-MS —	масс-спектрометрия матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)
SAA —	сывороточный амилоид А (serum amyloid A)

ВВЕДЕНИЕ

Альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2$ -MG) является одним из важнейших белков плазмы крови, выпол-

няющий широкий ряд регуляторных и транспортных функций [1–3]. В первую очередь, $\alpha 2$ -MG в плазме крови способен образовывать комплексы с протеазами всех классов. Протеазы в комплексе с $\alpha 2$ -MG изменяют свою каталитическую активность: теряют способность к гидролизу высокомолекулярных белков, но могут сохранять свою активность по отношению к низкомолекулярным субстратам, в том числе к некоторым белкам [4–6]. Так, для трипсина было показано, что в комплексе с $\alpha 2$ -MG он способен к гидролизу сывороточного амилоида А (serum amyloid A, SAA) в сыворотке крови человека, что может быть использовано для диагностики воспалительных процессов [5]. Отмечено, что при ряде заболеваний концентрация $\alpha 2$ -MG в сыворотке крови может существенно меняться [7–9], благодаря чему количественное определение этого белка используется в диагностике.

Традиционно для определения концентрации $\alpha 2$ -МГ используются иммунологические или энзиматические методы [10, 11]. Первые требуют наличия специфических антител, вторые — определения скоростей гидролиза специфических субстратов. К тому же в первом случае тестирование не позволяет различать свободную форму $\alpha 2$ -МГ от продуктов его взаимодействия, в том числе и с другими протеазами.

Нами предлагается использовать для определения концентрации активного $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека инструментальный масс-спектрометрический метод (MALDI-MS) в сочетании с изотопно-меченым внутренним стандартом.

В основе предлагаемого подхода используется способность трипсина образовывать комплекс $\alpha 2$ -МГ с выделением характерного пептида VGFYESDVMGR [1]. Этот пептид гидролитически отщепляется от зоны приманки (bait region) — от двух из четырех гомологичных цепей $\alpha 2$ -МГ, входящих в состав такого комплекса [6]. Благодаря наличию стехиометрического соотношения между количеством выделяющегося пептида и количеством прореагировавшего $\alpha 2$ -МГ, концентрация последнего в сыворотке крови может быть определена на основании измерения концентрации данного пептида методом MALDI-MS с использованием изотопно-меченого стандарта. Этому также способствует тот факт, что в норме средняя концентрация $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека составляет около $2.7 \cdot 10^{-6}$ М, следовательно, образующийся пептид будет уверенно детектироваться масс-спектрометрически. Подходящий для этой цели стандарт может быть приготовлен путем замещения атомов кислорода в составе карбоксильных групп пептида VGFYESDVMGR тяжелым стабильным изотопом ^{18}O [12], причем пептид может быть как искусственно синтезирован, так и получен из сыворотки крови человека после взаимодействия трипсина и $\alpha 2$ -МГ.

Успешность предлагаемого метода позволила распространить его шире: в отношении белков, также связывающих трипсин в виде комплексов, но, в отличие от $\alpha 2$ -МГ человека, не отщепляющих при этом свободных пептидов. К их числу относятся альфа-1-антитрипсин ($\alpha 1$ -АТ), $\alpha 2$ -МГ мыши и ряд других белков сыворотки крови. Белки этого типа взаимодействуют с трипсином гораздо медленнее, чем $\alpha 2$ -МГ, что делает возможным их количественное определение путем титрования остаточного трипсина, взятого в избытке, той же сывороткой крови человека, в которой концентрация $\alpha 2$ -МГ была предварительно определена предлагаемым методом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сыворотки крови человека

Сыворотки крови человека были любезно предоставлены клиникой пульмонологии ФПО ГБОУ ВПО Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова — д.м.н. проф. В.А. Воиновым, заведующим отделением эфферентных методов лечения.

Получение стандарта из синтетического пептида VGFYESDVMGR

Пептид VGFYESDVMGR синтезирован в ООО "НПФ Верта". Навеску 2.1 мг пептида растворяли в 20 мкл 10 % трифторуксусной кислоты, ТФУ ("Sigma-Aldrich") в H_2^{18}O (95–98 % ^{18}O , "Cambridge Isotope Laboratories Andover", MA, USA) и инкубировали в твердотельном термостате при 70°C в течение 90 мин для протекания изотопного обмена, после чего высушивали на вакуумном испарителе SpeedVac ("Eppendorf"). Содержимое пробирки растворяли в воде и использовали в качестве стандарта для определения концентрации пептида VGFYESDVMGR в сыворотке крови. Конечная концентрация стандарта составляла $1.8 \cdot 10^{-5}$ М.

Получение стандарта пептида VGFYESDVMGR из сыворотки крови человека

К 10 мкл неразбавленной сыворотки крови человека добавляли 40 мкл модифицированного свиного трипсина ("Promega", Madison, WI, USA) концентрацией 0.05 мг/мл в 50 мМ бикарбонатном буфере. Через 3 мин реакцию останавливали добавлением 10 мкл 2% ТФУ. Весь раствор высушивали на вакуумном испарителе SpeedVac и перерастворяли в 45 мкл H_2^{18}O , куда добавляли 5 мкл 100 % ТФУ. Выпавший осадок сывороточных белков отделяли центрифугированием в течение 5 мин на настольной центрифуге-вортексе "Microspin FV-2400" ("Biosan"). Отбирали около 40 мкл надосадочной жидкости, выдерживали ее при 70°C в течение 90 мин для протекания изотопного обмена. После изотопного обмена пробу высушивали на вакуумном испарителе "SpeedVac" и перерастворяли в 100 мкл воды.

Определение $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека

Сыворотку крови человека разбавляли в 25 раз и смешивали в равных объемах с модифицированным

свиным трипсином с концентрацией 0.05 мг/мл в 50 mM бикарбонатном буфере. Через 3 мин трипсинолиза при 20°C реакцию останавливали, добавляя равный объем 2 % ТФУ. Концентрацию образовавшегося пептида определяли масс-спектрометрически по изотопному распределению после смешивания анализируемой пробы со стандартом с известной концентрацией, который был получен из синтетического пептида или из сыворотки. Концентрацию $\alpha 2$ -МГ рассчитывали из известного соотношения: 2 моля пептида соответствует 1 молю $\alpha 2$ -МГ.

Определение относительного содержания SAA в сыворотке крови человека

Сыворотку крови человека разбавляли в 25 раз и смешивали в равных объемах с модифицированным свиным трипсином с концентрацией 0.05 мг/мл в 50 mM бикарбонатном буфере. Через 2 часа трипсинолиза при 20 °C реакцию останавливали, добавляя равный объем 2 % ТФУ. Относительную концентрацию SAA оценивали масс-спектрометрически, сравнивая суммарную интенсивность изотопного распределения триптического пептида с $m/z = 1913$ с добавленным стандартом пептида VGFYESDVMGR с известной концентрацией. Относительную концентрацию образовавшегося пептида выражали в единицах концентрации стандарта, полагая, что 1 моль пептида с $m/z = 1913$ соответствует 1 молю SAA.

Масс-спектрометрические измерения и расчеты

Масс-спектры получены с помощью масс-спектрометра Ultraflex II MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics, Германия), оборудованного Nd-лазером. Точность моноизотопных масс-пиков составляла 25 м.д. На каждый спектр при количественных измерениях приходилось по 4000 импульсов лазера. Для каждой пробы было получено как минимум 4 спектра. Масс-спектры фрагментации пептида получены в тандемном режиме прибора. В этом случае точность измерения моноизотопной массы фрагмента составила 0.5 Да.

Образцы для измерения наносили на мишень со следующими матрицами: α -циано-4-гидроксикоричная кислота (HCCA) и 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Для расчета содержания формы ^{18}O в смеси анализируемого образца и полученного изотопомера пептида использовано программное обеспечение, описанное в работе [12]. Концентрация пептида рассчитывалась из соотношения площадей ионов, относящихся к анализируемому пептиду и его стандарту, что стало возможно из-за того,

что изотопные сигналы исходного пептида и стандарта не перекрывались.

Определение $\alpha 1$ -АТ в сыворотке крови человека

К 5 мкл сыворотки крови человека, разбавленной водой в 250 раз, добавляли 5 мкл трипсина с различными концентрациями (0.05, 0.07, 0.125 мг/мл), инкубировали 3 мин при комнатной температуре. После этого к каждому образцу добавляли по 10 мкл неразбавленной сыворотки крови человека и инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали 20 мкл 2% ТФУ.

Концентрацию образовавшегося пептида VGFYESDVMGR определяли масс-спектрометрически по изотопному распределению после смешивания анализируемой пробы и стандарта с известной концентрацией, который был получен из синтетического пептида. Концентрацию анти-трипсина определяли как разницу между добавленным в реакцию трипсином и свободным трипсином, количество которого оценивали по пептиду VGFYESDVMGR из расчета: 1 моль пептида — 1 моль свободного трипсина.

Сыворотки крови мыши

В экспериментах использовали сыворотки крови интактных мышей и мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9), через 48 ч от начала эксперимента.

Определение $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови мыши

Все анализируемые сыворотки крови мышей и сыворотка крови человека с концентрацией $3 \cdot 10^{-6}$ М $\alpha 2$ -МГ предварительно были разбавлены водой в 5 раз. Из них были приготовлены смеси объемом 6 мкл с объемными соотношениями сывороток крови человека и мыши как 2:1, 1:1 и 1:2. В указанные смеси было добавлено по 6 мкл трипсина в концентрации $2.1 \cdot 10^{-7}$ М в 50 mM бикарбонатном буфере. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением равного объема 2%-й ТФУ. Концентрацию образовавшегося пептида определяли масс-спектрометрически по изотопному распределению после смешивания анализируемой пробы и стандарта с концентрацией $1.8 \cdot 10^{-5}$ М, разбавленного в 250 раз, который был получен из синтетического пептида. Расчет проводился с учетом исходного количества пептида без и с добавлением сыворотки мыши из расчета: 2 моля пептида соответствуют 1 молю $\alpha 2$ -МГ.

Концентрация $\alpha 2$ -МГ мыши рассчитывалась из предположения, что связывание трипсина с $\alpha 2$ -МГ

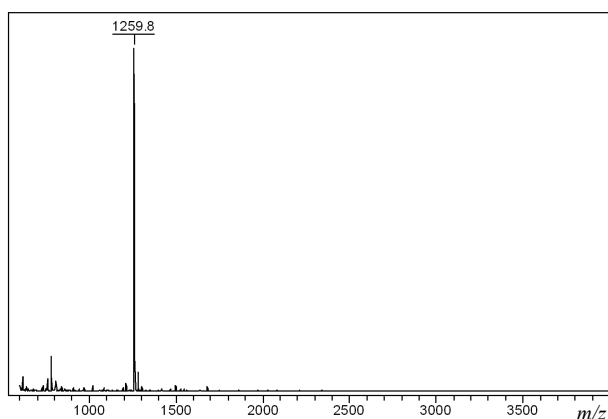


Рис. 1. MALDI-MS сыворотки крови, обработанной трипсином, через 3 мин инкубации

человека и мыши пропорционально их концентрациям в смешанных сыворотках крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация триптического пептида $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека

В основе предлагаемого метода использована особенность взаимодействия трипсина с белками сыворотки крови человека. В зависимости от концентрации вводимого в сыворотку крови трипсина

он может находиться в ней в трех возможных состояниях: в виде комплекса с $\alpha 2$ -МГ, в виде комплекса с $\alpha 1$ -АТ и в свободном виде (в случае, если его концентрация превышает связывающие способности $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ).

Как было отмечено ранее, при введении трипсина в сыворотку крови он прежде всего взаимодействует с $\alpha 2$ -МГ. В результате этого взаимодействия две молекулы трипсина образуют с тетрамером $\alpha 2$ -МГ комплекс, от которого затем отщепляются две молекулы характерного пептида VGFYESDVMGR.

На рис. 1 представлены результаты масс-спектрометрического анализа триптических гидролизатов сыворотки крови человека через 3 мин инкубации.

Как видно из рис. 1, в спектре регистрируется интенсивный квазимолекулярный ион с $m/z = 1259.8$, который соответствует пептиду VGFYESDVMGR. При этом других ионов в указанном диапазоне за этот же период времени зарегистрировано не было. Следует отметить, что в представленном эксперименте анализируемая сыворотка крови до нанесения на мишень была разбавлена в 100 раз.

На рис. 2 представлен спектр фрагментации зарегистрированного иона, который подтверждает аминокислотную последовательность ожидаемого триптического пептида $\alpha 2$ -МГ.

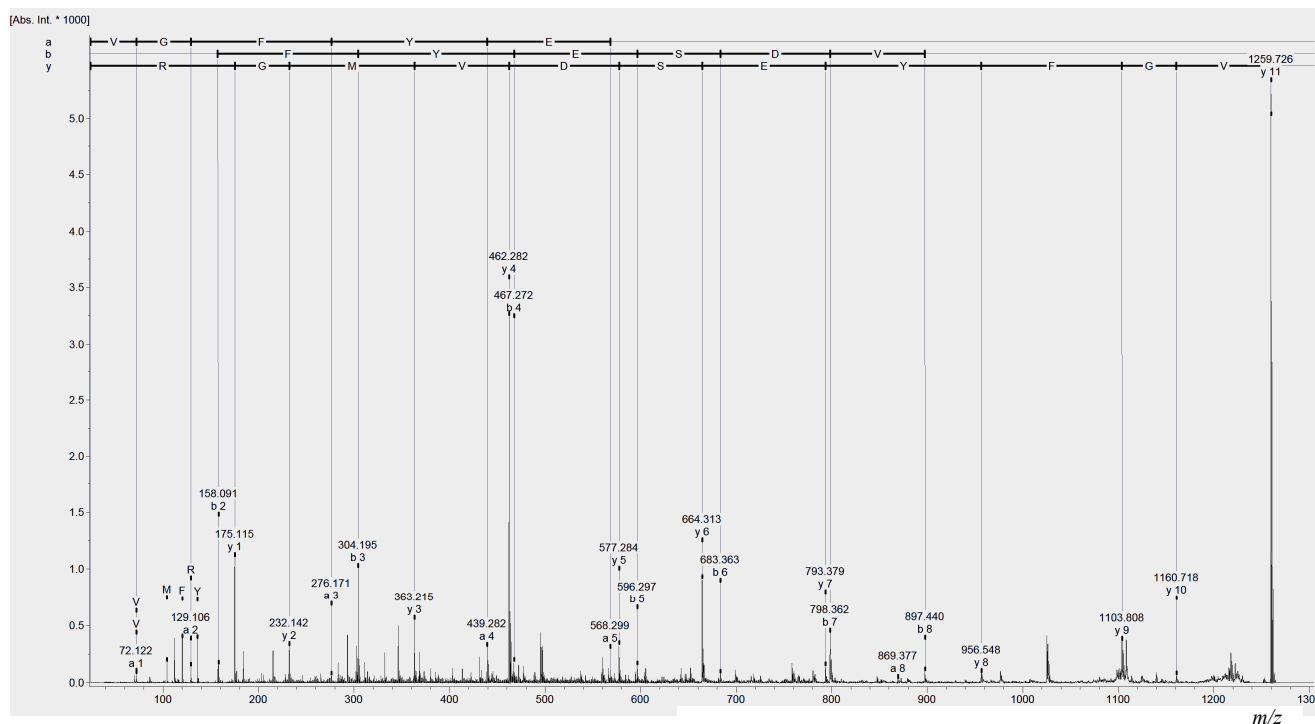


Рис. 2. Спектр фрагментации квазимолекулярного иона с $m/z=1259.6$. Отмечены соответствия с аминокислотной последовательностью пептида VGFYESDVMGR

Получение стандарта пептида VGFYESDVMGR из синтетического пептида

Для количественного определения характеристического пептида VGFYESDVMGR был получен его синтезированный аналог, из которого путем изотопного обмена ^{16}O на ^{18}O в карбоксильных группах, согласно ранее разработанному нами подходу [13, 14], был приготовлен ^{18}O -меченый стандарт. На рис. 3, а, б, в, представлены фрагменты масс-спектров характеристического пептида (а), изотопно-меченого стандарта на его основе (б) и их смеси (в).

Распределение изотопов в полученном стандарте, вычисленное на основании его спектра (рис. 3, б), представлено в табл. 1.

Из полученных данных следует, что в результате изотопного обмена при наличии в пептиде трех карбоксильных групп наблюдается включение от 3 до 6 атомов ^{18}O .

Следует отметить, что при имеющемся широком распределении изотопных форм в стандарте, они не перекрываются с изотопным распределением исходного пептида. Этот факт позволяет определить соотношение концентраций исходного пептида и его стандарта в смеси по соотношению площадей их изотопных распределений. В случае, когда молярная концентрация стандарта в смеси известна, то из соотношения площадей изотопных распределений пептида и стандарта может быть определена концентрация пептида и, следовательно, $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови.

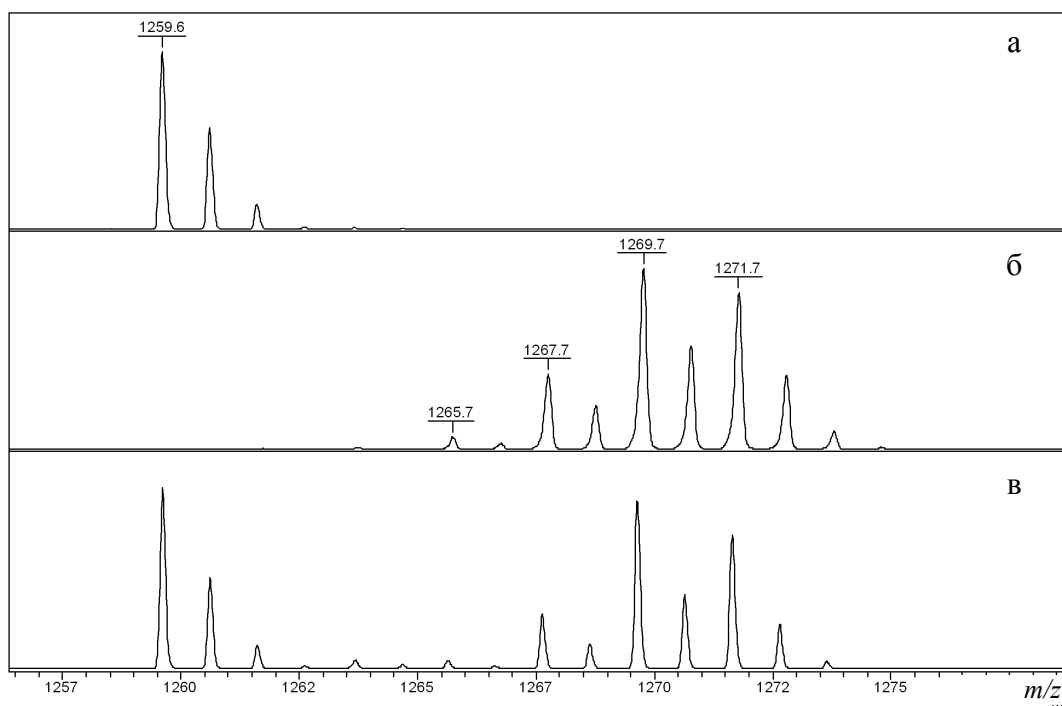


Рис. 3. Фрагменты MALDI-масс-спектров характеристического пептида VGFYESDVMGR (а), стандарта (б) и их смеси (в)

Табл. 1. Распределение изотопов после обмена в пептиде-стандарте

Количество обмененных атомов кислорода, %						Среднее количество включенных атомов ^{18}O
$^{18}\text{O}_0$	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$	$^{18}\text{O}_4$	$^{18}\text{O}_5$	
0	0	0	4	18	45	33
						5.1

**Получение стандарта пептида
VGFYESDVMGR из триптического
гидролизата сыворотки крови человека**

Аналогичным образом в результате изотопного обмена стандарт пептида может быть получен из триптического гидролизата сыворотки крови человека. Масс-спектр пептида из сыворотки крови человека до и после изотопного обмена представлен на рис. 4, а, б, масс-спектры смесей полученного стандарта с двумя разными сыворотками крови человека после обработки трипсином представлены на рис. 4, в, г.

Распределение изотопов в полученном стандарте пептида из сыворотки крови человека, вычисленное на основании его спектра (рис. 4, б), представлено в табл. 2. Обращает на себя внимание,

что обмен произошел достаточно глубоко (в среднем замещается около четырех атомов ^{18}O).

Также как и для стандарта из синтетического пептида, спектры исходного пептида и полученного стандарта из сыворотки крови человека не перекрываются

Из представленных данных по использованию стандарта, полученного из сыворотки, мы также видим, что соотношения интенсивностей образовавшегося пептида и стандарта сильно отличаются для сывороток крови здорового донора и пациента с диагностированным заболеванием (ИФА). Таким образом, стандарт пептида, полученный из обработанной трипсином сыворотки крови человека, может быть использован для оценки относительных концентраций $\alpha 2$ -МГ.

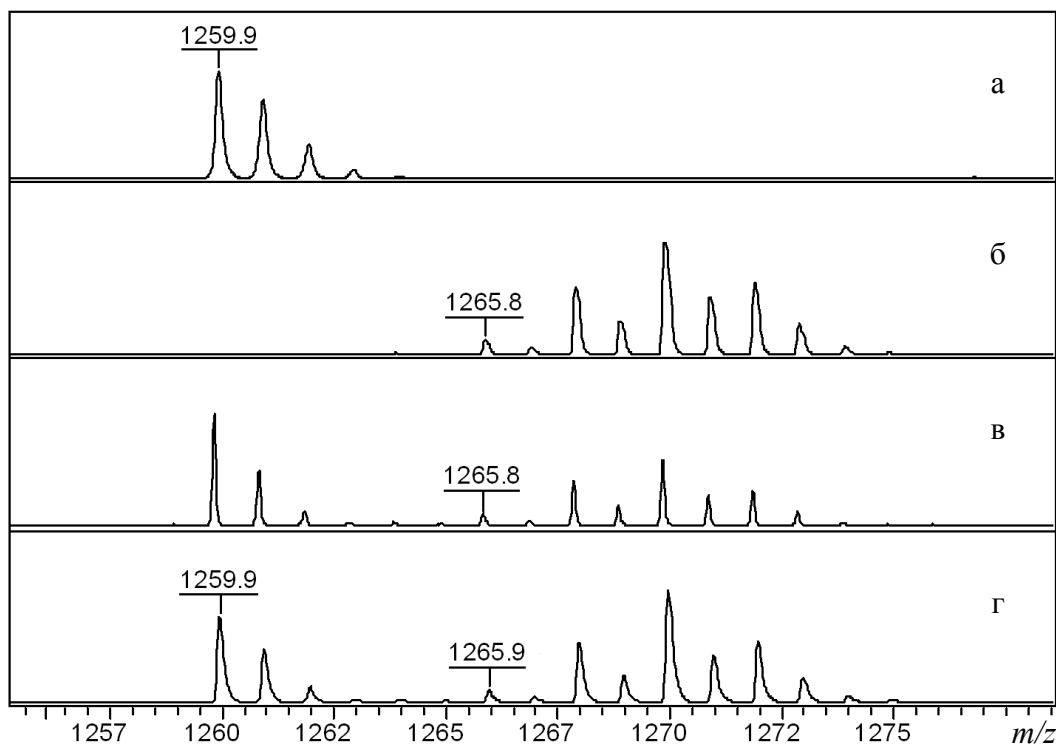


Рис 4. Фрагмент MALDI-масс-спектра пептида $\alpha 2$ -МГ (а), стандарта для данного пептида, полученного после трипсинолиза $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови и последующего изотопного обмена (б), смесей пептида в двух триптических гидролизатах сывороток крови человека и стандарта (в — сыворотка крови здорового донора, г — сыворотка крови пациента с идиопатическим фиброзирующим альвеолитом, ИФА)

Табл. 2. Распределение изотопов после обмена в пептиде-стандарте, полученном из сыворотки крови человека

Количество обмененных атомов кислорода, %							Среднее количество включенных атомов ^{18}O
$^{18}\text{O}_0$	$^{18}\text{O}_1$	$^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_3$	$^{18}\text{O}_4$	$^{18}\text{O}_5$	$^{18}\text{O}_6$	
0	1	4	17	39	39	0	4.1

Количество образующегося пептида VGFYESDVMGR в зависимости от концентрации вносимого в сыворотку трипсина

Из серии экспериментов для одной из сывороток крови человека были получены количественные данные по накоплению пептида VGFYESDVMGR в зависимости от концентрации трипсина вплоть до предельных значений. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 5.

В целом вид кривой соответствует имеющимся представлениям о насыщающем характере взаимодействия $\alpha 2$ -МГ и трипсина, из которого может быть определена концентрация активной формы $\alpha 2$ -МГ.

Полученные данные могут быть использованы в трех направлениях. Во-первых, появляется возможность определить абсолютную концентрацию изотопно-меченого стандарта пептида VGFYESDVMGR, полученного из сыворотки крови человека, обработанной трипсином. Для этого достаточно использовать трипсин в ненасыщающей и известной концентрации, которая приведет к соответствующей концентрации пептида.

Из соотношения площадей изотопных распределений этого пептида, концентрация которого соответствует концентрации добавленного трипсина, и стандарта, можно будет определить абсолютную концентрацию изотопно-меченого стандарта пептида VGFYESDVMGR, полученного из сыворотки крови человека.

Во-вторых, при наличии изотопно-меченого

стандарта пептида с известной концентрацией, можно определить качество трипсина по его способности взаимодействовать с $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека. Известно, что трипсин склонен к инактивации из-за автолиза или при его неправильной транспортировке, или хранении. В этом случае также следует обрабатывать сыворотку крови человека трипсином в ненасыщающих концентрациях для определения активных молекул трипсина.

В-третьих, данный подход может быть использован для определения концентрации $\alpha 1$ -АТ в сыворотке крови человека. Он основывается на определении концентрации свободного трипсина, добавленного в сыворотку крови в избытке, по сравнению с суммарной ингибиторной активностью $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ.

Количественное определение $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека

То обстоятельство, что связывание трипсина в его реакции с $\alpha 2$ -МГ протекает со значительно более высокой скоростью, чем его связывание с $\alpha 1$ -АТ, позволило разработать простую методику для определения концентрации $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека. В начале титрования, когда концентрация трипсина еще мала, протекает его связывание исключительно с $\alpha 2$ -МГ, в процессе которого выделяется характеристический пептид VGFYESDVMGR. При этом концентрация этого пептида нарастает приблизительно пропорционально количеству добавленного трипсина.

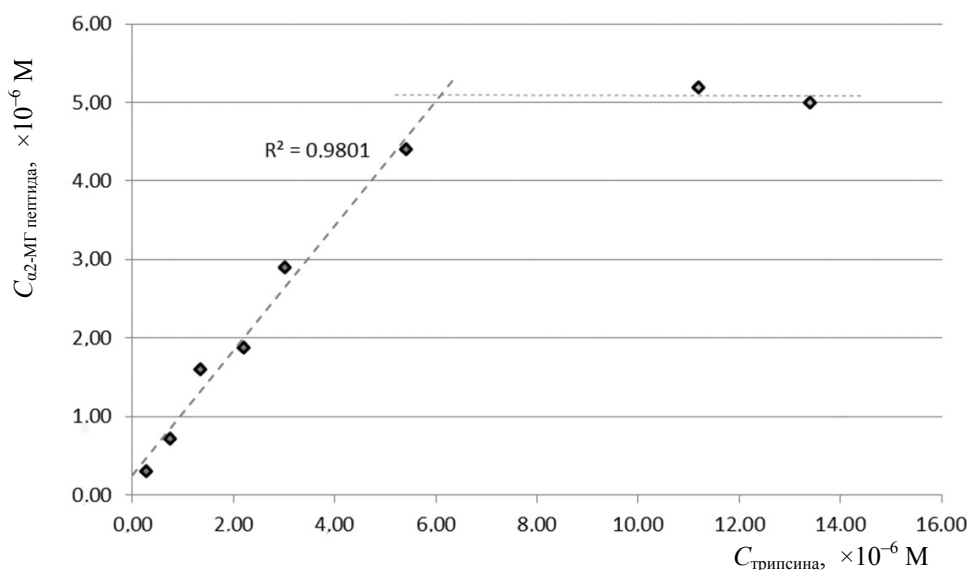


Рис. 5. Концентрация пептида VGFYESDVMGR в сыворотке крови здорового донора в зависимости от концентрации добавленного трипсина

После того как свободный $\alpha 2$ -МГ в сыворотке будет исчерпан, нарастание концентрации образующегося характеристического пептида прекратится, и в дальнейшем его концентрация будет оставаться неизменной (см. рис. 5). Момент времени, когда нарастание концентрации характеристического пептида прекращается, соответствует мольному соотношению трипсина к $\alpha 2$ -МГ (в пересчете на тетрамер), как 2:1. Тем самым, концентрация $\alpha 2$ -МГ может быть определена по точке перелома кривой титрования трипсином.

Измерение концентрации характеристического пептида производится масс-спектрометрически, с использованием в качестве внутреннего стандарта синтетического образца пептида VGFYESDVMGR, обогащенного изотопом ^{18}O . Благодаря этому для титрования могут быть пригодны растворы трипсина, точная концентрация которых заранее неизвестна. Более того, концентрация трипсина в растворе также может быть легко вычислена на основании все той же кривой титрования, т.к. в момент ее перелома мольное соотношение трипсина к $\alpha 2$ -МГ известно и составляет 2:1.

Поскольку построение кривой титрования для каждой сыворотки крови человека является весьма трудоемким процессом, то определение концентрации $\alpha 2$ -МГ по точке перелома в кривой титрования не может быть широко применено. Однако, при концентрациях трипсина, в 2 раза превышающих концентрацию $\alpha 2$ -МГ, фермент будет необратимо и с полной потерей активности ингибироваться $\alpha 1$ -АТ. В норме концентрация этого ингибитора в сыворотке крови примерно на порядок превышает концентрацию $\alpha 2$ -МГ. Таким образом, концентрация вводимого трипсина, необходимая для его полного взаимодействия с $\alpha 2$ -МГ, должна составлять примерно трех-, пятикратный избыток, включая возможность возрастания концентрации $\alpha 2$ -МГ при наличии воспалительного процесса. Добавление трипсина в сыворотку крови в таком избытке позволяет точно и за один раз определить концентрацию $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови и освобождает от необходимости в построении кривой титрования сыворотки крови трипсином.

Количественное определение $\alpha 1$ -АТ в сыворотке крови человека титрованием раствором трипсина

Метод основан на введении в сыворотку избытка трипсина в количестве, достаточном для полного связывания не только $\alpha 2$ -МГ, но $\alpha 1$ -АТ с последующим определением оставшегося свободного трипсина его взаимодействием с $\alpha 2$ -МГ из второй порции сыворотки. При этом концентрация свободного трипсина определяется по при-

ращению количества характеристического пептида VGFYESDVMGR между первой и второй инкубациями.

Тактически эксперимент проводится с использованием сыворотки крови с разными разведениями (см. Экспериментальную часть). Первая порция сыворотки имеет в 10 раз более сильное разведение, чем вторая, чтобы трипсин после взаимодействия с $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ оказался в избытке и частично остался в свободном виде. После 3 мин инкубации в эту смесь добавляют дополнительное количество сыворотки с меньшим разведением. Количество добавленной сыворотки рассчитывается с учетом того, чтобы количество присутствующего в ней $\alpha 2$ -МГ было заведомо выше возможной концентрации свободного трипсина в смеси. При этом важно, чтобы в этом соотношении концентрация вновь образованного характеристического пептида находилась на возрастающем линейном участке кривой титрования (см. рис. 5). В таком случае весь свободный трипсин, оставшийся после взаимодействия с $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ в первой, более разбавленной порции сыворотки крови, прореагирует с $\alpha 2$ -МГ из второй, более концентрированной, порции сыворотки крови человека с образованием характеристического пептида VGFYESDVMGR. Измерение концентрации пептида также производится масс-спектрометрически, с использованием в качестве внутреннего стандарта синтетического образца пептида VGFYESDVMGR, обогащенного изотопом ^{18}O .

Примеры анализа сывороток человека: результаты анализа сывороток крови пациентов с диагностированными заболеваниями легких

С использованием разработанных подходов проведен анализ серии сывороток пациентки с диагнозом "экзогенный токсический альвеолит, подострое течение" в период от госпитализации до выписки. Была проанализирована сыворотка в острой фазе заболевания (MOA1), в процессе лечения, включающего системные глюкокортикостероиды (начальная доза 20 мг в перерасчете на преднизолон) и три процедуры плазмафереза (MOA2–MOA4), а также при выписке (MOA5).

В каждом образце прежде всего была определена концентрация $\alpha 2$ -МГ. Результаты определения представлены на рис. 6. На этой же диаграмме дополнительно представлены результаты по определению относительной концентрации SAA. Это стало возможным при MALDI-MS-анализе тех же гидролизатов сывороток крови, но с увеличенным до 2 ч временем инкубации. При наличии в сыворотке крови этого фактора, указывающего

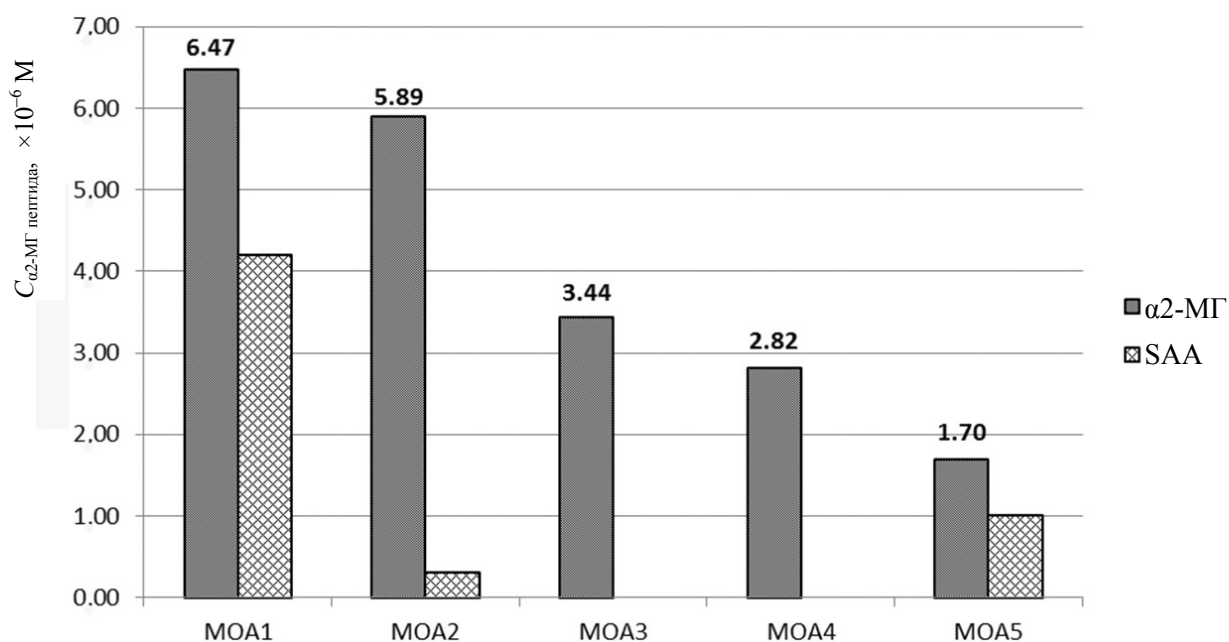


Рис. 6. Результаты масс-спектрометрического анализа сывороток крови пациента в процессе лечения токсического экзогенного альвеолита от острой фазы (MOA1) в течение трех сеансов плазмафереза и приема глюкокортикостероидов (MOA2–MOA4) до выписки (MOA5)

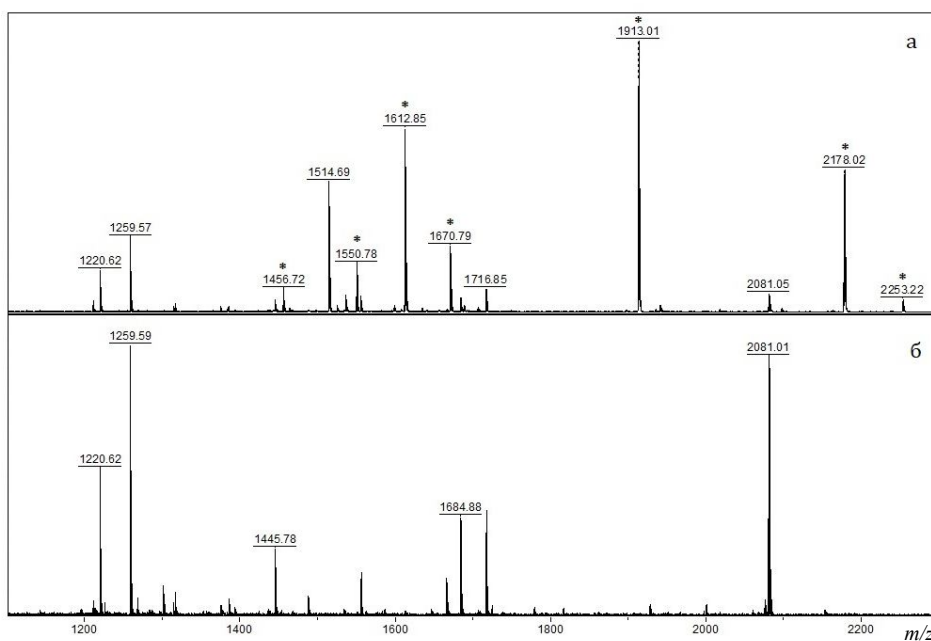


Рис. 7. Фрагмент MALDI-масс-спектра сывороток крови MOA1 (а) и MOA4 (б), обработанных трипсином, через 2 ч инкубации

на воспалительный процесс, регистрируются триптические пептиды SAA, наиболее интенсивным из которых является пептид с $m/z = 1913$ [5]. На рис. 7 представлены MALDI-масс-спектры сывороток крови MOA1 и MOA4 после обработки трипсином в течение 2 ч.

В спектре сыворотки крови, отобранной в острой фазе заболевания (рис. 7, а) присутствует серия ионов, соответствующих триптическим пептидам SAA (отмечены символом *), в то время как эти ионы отсутствуют в сыворотке MOA4 после двухчасового гидролиза (рис. 7, б). Аналогичным

образом были проанализированы остальные сыворотки крови (МОА2, МОА3 и МОА5). Содержание SAA в тех сыворотках крови, где он был зарегистрирован, оценивали по относительной интенсивности иона с $m/z=1913$, используя в качестве стандарта пептид VGFYESDVMGR, меченный ^{18}O (рис. 6).

Для двух сывороток крови (МОА1 и МОА3) был также определен уровень $\alpha 1$ -АТ способом, описанным выше. В табл. 3 представлены результаты данного эксперимента. Трипсин в разбавленную сыворотку крови был добавлен в трех концентрациях (0.05, 0.07, 0.125 мг/мл), однако в первом случае его оказалось недостаточно для преодоления суммарной ингибиторной активности $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ, поэтому в расчетах использовались только концентрации 0.07 и 0.125 мг/мл, что соответствует $3.0 \cdot 10^{-6}$ и $5.2 \cdot 10^{-6}$ М.

На первом этапе масс-спектрометрически была определена концентрация избыточного трипсина, соответствующая концентрации регистрируемого характеристического пептида VGFYESDVMGR. Зная концентрацию добавленного и избыточного трипсина с учетом всех разбавлений, можно вычислить суммарную ингибиторную активность $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ или их суммарную концентрацию в сыворотке крови. Поскольку концентрация $\alpha 2$ -МГ была измерена в предыдущем эксперименте для двух данных сывороток крови, то легко получить концентрацию $\alpha 1$ -АТ, соответствующую $(3.3 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ М для МОА1 и $(4.9 \pm 0.4) \times 10^{-5}$ М для МОА3. Принимая во внимание, что нормальный уровень $\alpha 1$ -АТ составляет 1.5–3.5 г/л или порядка $(2.7\text{--}7.0) \times 10^{-5}$ М, то уровень этого белка в сыворотках крови МОА1 и МОА3 находится в норме.

Из представленных результатов можно заключить, что в процессе лечения уровень $\alpha 2$ -МГ от повышенного значения, указывающего на наличие воспалительного процесса, приблизился к нормальному, что свидетельствует об успехе проводимых лечебных мероприятий. Одновременно с повышением $\alpha 2$ -МГ в острой фазе (МОА1) зафиксировано появление фактора воспаления SAA, от-

носительный уровень которого существенно снизился в процессе лечения вплоть до полного исчезновения после третьего плазмафереза, однако был зарегистрирован на следующий день после выписки (возможно, это объясняется присоединением госпитальной инфекции).

Следует отметить, что стандартным масс-спектрометрическим методом, применяемым в данной работе, пептиды SAA при нормальном уровне не регистрируются, поскольку его концентрация оказывается ниже порога чувствительности метода. Таким образом, присутствие в спектрах триптических гидролизатов сывороток крови характерных пептидов SAA указывает на наличие воспалительного процесса. Чем выше в спектре относительная интенсивность ионов, относящихся к SAA, тем больше его концентрация.

На рис. 8 представлены результаты масс-спектрометрического анализа сывороток крови пяти пациентов с интерстициальным заболеванием легких — идиопатическим фиброзирующим альвеолитом (ИФА) с прогрессирующим течением. Как и в предыдущем случае, у этих пациентов был определен уровень $\alpha 2$ -МГ, а также была оценена относительная концентрация SAA (при его наличии).

Как следует из представленных данных, у всех пациентов повышен уровень $\alpha 2$ -МГ, причем в наиболее тяжелом случае уровень $\alpha 2$ -МГ превышает норму более, чем в 5 раз (пациент #4). У двух пациентов (пациенты #1 и #5) регистрируется повышенный уровень SAA, который при ИФА является маркером АА-амилоидоза, развивающегося как осложнение ряда неспецифических заболеваний легких. Известно, что в случае длительно существующего воспалительного процесса макрофаги не в состоянии осуществить полную деградацию SAA, и из его фрагментов в инвагинатах плазматической мембраны амилоидобласта (макрофаги, плазматические и миеломные клетки, фибробласты, эндотелиоциты и др.) происходит сборка фибрилл амилоида, что является серьезным осложнением.

Табл. 3. Определение уровня $\alpha 1$ -АТ в сыворотках крови пациента с диагнозом "экзогенный токсический альвеолит"

Характеристики сыворотки крови и концентрации добавленного трипсина	Наименование сыворотки			
	МОА1		МОА3	
Концентрация трипсина, $\times 10^{-6}$ М	3.0	5.2	3.0	5.2
Концентрация избыточного трипсина, $\times 10^{-6}$ М	1.5	3.7	1.0	3.0
Суммарная концентрация $\alpha 2$ -МГ и $\alpha 1$ -АТ, $\times 10^{-6}$ М	38.54	39.66	50.20	55.34
Концентрация $\alpha 2$ -МГ, $\times 10^{-6}$ М	6.47	6.47	3.44	3.44
Концентрация $\alpha 1$ -АТ, $\times 10^{-6}$ М	32.6 ± 0.8	32.6 ± 0.8	49.3 ± 3.6	49.3 ± 3.6

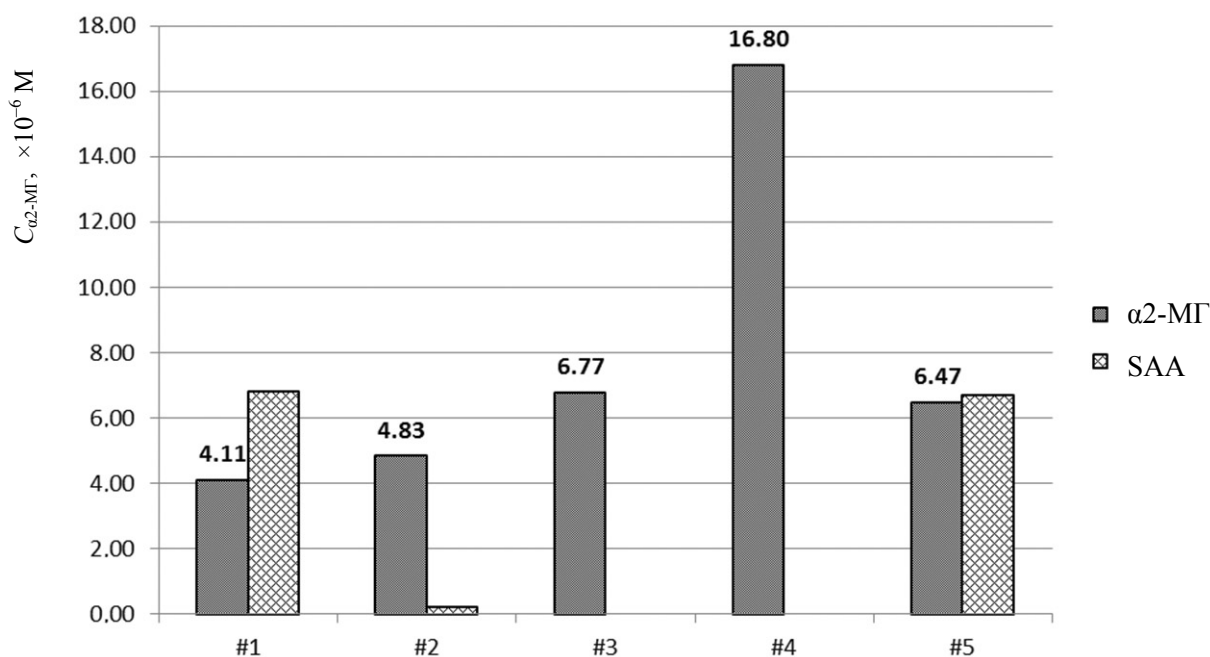


Рис. 8. Результаты масс-спектрометрического анализа сывороток крови пяти пациентов с ИФА

Очевидно, что полученные параметры (уровни $\alpha 2\text{-МГ}$ и SAA) могут быть использованы при выборе последующего лечения, а их дальнейший контроль позволит корректировать процесс лечения.

Определение концентрации $\alpha 2\text{-МГ}$ в сыворотке крови мышей

Определение нашим методом концентрации $\alpha 2\text{-МГ}$ в сыворотке крови мышей представляет собой более сложную задачу, чем определение $\alpha 2\text{-МГ}$ в сыворотке крови человека, поскольку имеет место существенная разница между продуктами взаимодействия трипсина с обоими видами $\alpha 2\text{-МГ}$. В то время как трипсин при взаимодействии с $\alpha 2\text{-МГ}$ человека отщепляет в эквимолярном соотношении характеристический пептид, концентрацию которого можно измерить методом MALDI-MS с изотопно-меченым стандартом, то при взаимодействии с $\alpha 2\text{-МГ}$ мыши такого пептида не отщепляется. Это обстоятельство мешает применить в отношении $\alpha 2\text{-МГ}$ мыши ту же методику определения, что и для $\alpha 2\text{-МГ}$ человека, тогда как необходимость такого определения весьма велика, поскольку большинство экспериментов, в частности доклинические испытания препаратов, проводятся именно на мышах.

Для этой цели нами предложен метод, основанный на конкуренции взаимодействия трипсина со смесью сывороток крови мыши и человека в условиях недостатка трипсина. Скорость связывания трипсина с $\alpha 2\text{-МГ}$ на порядок выше скоростей свя-

зывания с другими белками плазмы крови. Поскольку тирозинные участки в структуре $\alpha 2\text{-МГ}$ человека и мыши высоко гомологичны, за исключением участка приманки [13], можно ожидать, что в этой ситуации скорость взаимодействия трипсина с $\alpha 2\text{-МГ}$ обоих видов будет близкой или равной. Здесь мы предлагаем использовать подход, основанный на известном в формальной кинетике методе конкурентных реакций [14]. Для этого трипсин в количестве, меньшем чем $\alpha 2\text{-МГ}$ человека и мыши, вносится в смесь сывороток крови, и измеряется количество образовавшегося характеристического пептида. Используя разные соотношения сывороток и применяя математический аппарат формальной кинетики, вычисляются отношения констант скоростей и абсолютные концентрации продуктов обеих реакций.

Продemonстрируем предлагаемый подход на примере определения $\alpha 2\text{-МГ}$ в сыворотке крови мышей в практически важном эксперименте по оценке изменения уровня $\alpha 2\text{-МГ}$ при инфицировании мышей вирусом гриппа H7N9 и влияния на этот процесс антивирусного препарата "Триазид".

В эксперименте принимали участие четыре группы мышей:

M1 — контрольная группа;

M2 — группа, инфицированная вирусом гриппа;

M3 — контрольная группа, получающая противовирусный препарат;

M4 — группа, инфицированная вирусом гриппа и получающая противовирусный препарат.

Табл. 4. Содержание $\alpha 2$ -МГ в сыворотках крови мышей М1–М4

Соотношение сывороток крови (мышь : человек)	Концентрация $\alpha 2$ -МГ в сыворотках крови мышей, $\times 10^{-6}$ М			
	М1	М2	М3	М4
1:1	3.52	1 . 8 8	2.01	2.02
1:2	4.59	2.54	1.99	3.41
2:1	4.38	2.14	2.52	2.56
	Средняя величина			
	4.2 ± 0.6	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.7 ± 0.7

Время инкубации от начала инфицирования составляло 48 ч.

Все анализируемые сыворотки крови мышей и сыворотка крови человека с концентрацией $3 \cdot 10^{-6}$ М $\alpha 2$ -МГ предварительно были разбавлены водой в 5 раз. Из них были приготовлены смеси объемом по 6 мкл, с объемными соотношениями сывороток крови человека и мыши как 2:1, 1:1 и 1:2. К смесям был добавлен трипсин с концентрацией $2.1 \cdot 10^{-7}$ М в 50 мМ бикарбонатном буфере. Через 5 мин реакцию останавливали добавлением равного объема 2% ТФУ. Для определения концентрации пептида 5 мкл пробы смешивали со стандартом пептида с концентрацией $1.8 \cdot 10^{-5}$ М, разбавленного в 250 раз. Концентрация трипсина была выбрана таким образом, чтобы, с одной стороны, она была меньше известной концентрации $\alpha 2$ -МГ человека, с другой стороны, чтобы концентрацию образовавшегося пептида возможно было зарегистрировать масс-спектрометрически.

Следует отметить, что номинальная концентрация трипсина и концентрация активного трипсина не всегда совпадают из-за автолиза фермента в процессе хранения. В связи с этим предварительно была оценена концентрация активного трипсина: к сыворотке крови человека с известной концентрацией $\alpha 2$ -МГ (был в недостатке) добавлен трипсин (на линейном участке кривой титрования, рис. 5). По количеству образовавшегося характеристического пептида была определена концентрация активного трипсина в стоковом растворе, которая составила 0.15 мг/мл (или $6.4 \cdot 10^{-6}$ М).

Концентрация $\alpha 2$ -МГ мыши рассчитывалась из предположения, что связывание трипсина с $\alpha 2$ -МГ человека и мыши пропорционально их концентрациям в смешанных сыворотках крови. Количество трипсина, связавшегося в каждом образце с $\alpha 2$ -МГ мыши, вычислялось вычитанием трипсина, связавшегося с $\alpha 2$ -МГ человека, из добавленного активного трипсина. Доля трипсина, связавшегося

с $\alpha 2$ -МГ человека, определялась непосредственно из спектров по количеству образовавшегося характеристического пептида VGFYESDVMGR.

Вычисленные значения из масс-спектрометрических данных для каждого типа сыворотки М1–М4 представлены в табл. 4.

Необходимо отметить, что результаты определения (при разных соотношениях сывороток) $\alpha 2$ -МГ в смесях подтверждают предположение о том, что взаимодействие трипсина с $\alpha 2$ -МГ пропорционально соотношениям $\alpha 2$ -МГ человека и мыши. Таким образом, предлагаемый подход пригоден для определения $\alpha 2$ -МГ мыши.

Анализируя полученные данные о концентрации $\alpha 2$ -МГ в четырех группах мышей, можно полагать, что инфицирование вирусом гриппа приводило к снижению концентрации $\alpha 2$ -МГ, также как и введение самого препарата. Таким образом, поставленная перед нами цель — продемонстрировать возможность применения нашего метода для измерения концентрации $\alpha 2$ -МГ у мышей — была достигнута. В дальнейшем полученные данные должны быть проверены на большем количестве животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложено два подхода, которые делают MALDI масс-спектрометрию подходящим инструментом для идентификации и количественного определения белков острой фазы воспаления. Во-первых, была показана возможность использования структурно-функциональных свойств анализируемых соединений при определении их концентрации, что позволяет исключить необходимость предварительного фракционирования образцов, т.е. работать с цельной сывороткой крови. Во-вторых, была использована методика изотопного обмена для получения необходимого внутреннего стандарта, в том числе полученного

непосредственно в сыворотке крови. Привлекательным в предлагаемом подходе является возможность получения одновременно нескольких параметров (уровней $\alpha 2$ -МГ, $\alpha 1$ -АТ и SAA) в едином технологическом решении. Является существенным также и то, что количество материала, требуемого для анализа (например, для определения $\alpha 2$ -МГ и SAA), весьма мало: необходимый объем сыворотки крови составляет всего порядка 1 мкл. Такое количество материала можно получить, заменив отбор крови из локтевой вены, на отбор крови из пальца.

Следует отметить, что при инкубации трипсина с сывороткой крови человека воспроизводимо появляется ряд других пептидов. Была проведена предварительная идентификация некоторых из этих пептидов. Оказалось, что они также принадлежат к важным маркерным белкам сыворотки крови человека, служащим, в частности, для оценки риска развития сахарного диабета, аллергических реакций и прочее. Данные по идентификации и изучению выявленных пептидов, оценка их диагностического потенциала будут приведены в одной из последующих публикаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sottrup-Jensen L.* Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation // *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, no. 20. P. 11539–11542.
2. *Borth W.* Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics // *FASEB Journal*. 1992. Vol. 6, no. 15. P. 3345–3353.
3. *Barrett A.J., Starkey P.M.* $\alpha 2$ -Macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism // *Biochemical Journal*. 1973. Vol. 133. P. 709–724.
4. *Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И.* Протеолиз в норме и при патологии. Киев: Здоровье, 1988. 200 с.
5. *Toropygin I.Yu., Mirgorodskaya O.A., Moshkovskii S.A., Serebryakova M.V., Archakov A.I.* Controlled trypsinolysis of human cancer and non cancer sera for direct matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry // *International Journal of Mass Spectrometry*. 2012. Vol. 325–327. P. 121–129.
6. *Rehman A.A., Ahsan H., Khan F.H.* $\alpha 2$ -Macroglobulin: a physiological guardian // *Journal of Cellular Physiology*. 2013. Vol. 228, no. 8. P.1665–1675. DOI: 10.1002/jcp.24266
7. *Веремеенко К.Н., Кизим А.И., Досенко В.Е.* $\alpha 2$ -Макроглобулин: структура, физиологическая роль и

клиническое значение // *Лаб. диагностика*. 2000. № 2. С. 3–9.

8. *Barrett A.J.* $\alpha 2$ -Macroglobulin // *Methods in Enzymology* / *Lorand L.*, ed. Academic, New York, 1981. Vol. 80, P. 737–754.
9. *Swenson R.P., Howard J.B.* Structural characterization of human $\alpha 2$ -macroglobulin subunits // *Journal of Biological Chemistry*. 1979. Vol. 254, no. 11. P. 4452–4456.
10. *Ho A.S., Cheng C.C., Lee S.C., Liu M.L., Lee J.Y., Wang W.M., Wang C.C.* Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: $\alpha 2$ macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI // *Journal of Biomedical Science*. 2010. 17:58. DOI: 10.1186/1423-0127-17-58
11. *Sampsonas F., Karkoulas K., Kaparianos A., Spiropoulos K.* Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency // *Current Medical Chemistry*. 2006. Vol. 13, no. 24. P. 2857–2873.
12. *Козьмин Ю.П., Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Миргородская О.А.* Прямое введение изотопов O^{18} в пептиды и белки для количественного анализа методом масс-спектрометрии // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37, № 6. С. 793–806.
13. *van Leuven F., Torrekens S., Overbergh L., Lorent K., de Strooper B., van den Berghe H.* The primary sequence and the subunit structure of mouse $\alpha 2$ -macroglobulin, deduced from protein sequencing of the isolated subunits and from molecular cloning of the cDNA // *European Journal of Biochemistry*. 1992. Vol. 210, no. 1. P. 319–327.
14. *Пурмаль А.П.* Эмпирическая кинетика (формальная феноменологическая кинетика). Учебное пособие. Москва: МФТИ, 2000. 80 с.

ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России, Санкт-Петербург (Протасов А.В., Тараскин А.С., Забродская Я.А., Миргородская О.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Бубляев Р.А.)

Кафедра пульмонологии ФПО ГБОУ ВПО Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург (Новикова Л.Н.)

Контакты: *Миргородская Ольга Александровна*,
oa.mir@mail.ru

Материал поступил в редакцию 18.12.2018

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SERIES OF BLOOD SERUM MARKERS WITHOUT ITS PRELIMINARY FRACTIONATION USING THE SPECIAL FEATURES OF TRIPSINE INTERACTION WITH ALPHA-2-MACROGLOBULIN USING MALDI-MS

A. V. Protasov¹, A. S. Taraskin¹, Ya. A. Zabrodskaya¹, R. A. Bublyayev²,
L. N. Novikova³, O. A. Mirgorodskaya¹

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

²Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia

³Department of Pneumology, academician Pavlov First Saint-Petersburg Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Concentration of alpha-2-macroglobulin (α 2-MG) in serum may vary considerably in a number of diseases, and thus quantification of this protein is used in diagnostics. Routine immunological or enzymatic methods for determination of α 2-MG concentration in serum are rather complicated. The methods require specific antibodies or the measurements of specific substrates hydrolysis rates. These tests do not distinguish the α 2-MG free form from its bound form. We propose a new mass-spectrometric approach to identify and quantify some blood serum biomarkers. The method is based on structural-functional characteristic properties of α 2-MG interaction with trypsin, characterized by the cleavage of VGFYESDVMGR peptide. Technique of isotope exchange (¹⁸O) was developed for the preparation of internal standard, including direct isotope exchange in blood serum. The quantitative potential of the proposed technique turns mass-spectrometry (MALDI) into a suitable and efficient tool for diagnostics of inflammatory processes. The potential of the proposed approach proposed was demonstrated on the examples of highly sensitivity determination of human α 2-MG active form concentration in blood serum of patients with lung diseases. The high potential of the proposed method allows it to be propagated on proteins, the last form complexes with trypsin, but unlike human α 2-MG do not cleave free peptides. These include alpha-1-antitrypsin (α 1-AT), mouse α 2-MG and a number of other serum proteins. Application of the method is shown in testing the "Triazid" antiviral drug in mice model.

Keywords: alpha-2-macroglobulin, quantitative mass-spectrometry, biomarkers, serum amyloid A, alpha-1-antitrypsin

Fig. 1. MALDI-MS of trypsin-treated blood serum after 3 min incubation

Fig. 2. The fragmentation spectrum of a quasimolecular ion with $m/z = 1259.6$. Correspondences with the amino acid sequence of the peptide VGFYESDVMGR noted

Fig. 3. Fragments of the MALDI-mass spectra of the intrinsic peptide VGFYESDVMGR (a) standard (б) and their mixtures (в)

Fig. 4. Fragment of the MALDI mass spectrum of α 2-MG peptide (a), the standard for this peptide obtained after α 2-MG trypsinolysis in blood serum and subsequent isotope exchange (б), peptide mixtures in two tryptic hydrolysates of human serum and standard (в — blood serum of a healthy donor, г — blood serum of a patient with idiopathic fibrosing alveolitis)

Fig. 5. Concentration of VGFYESDVMGR peptide in the blood serum of a healthy donor depending on the concentration of the added trypsin

Fig. 6. The results of mass spectrometric analysis of the patient's blood serum in the course of the treatment of toxic exogenous alveolitis from the acute phase (MOA1) within three sessions of plasmapheresis and taking glucocorticosteroids (MOA2 – MOA4) before discharge (MOA5)

Fig. 7. A fragment of the MALDI-mass spectrum of serum MOA1 (a) and MOA4 (b), both treated with trypsin, after 2 h of incubation

Fig. 8. The results of mass spectrometric analysis of blood serum of five patients with idiopathic fibrosing alveolitis

Table 1. The distribution of isotopes after the exchange in the standard peptide

Table 2. The distribution of isotopes the exchange in standard peptide obtained from human serum

Table 3. Determining the level of α 1-AT in the blood serum of a patient with a diagnosis of "exogenous toxic alveolitis"

Table 4. The content of α 2-MG in the blood serum of mice M1–M4

REFERENCES

1. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 20, pp. 11539–11542.
2. Borth W. Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB Journal*, 1992, vol. 6, no. 15, pp. 3345–3353. DOI: 10.1096/fasebj.6.15.1281457
3. Barrett A.J., Starkey P.M. α 2-Macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochemical Journal*, 1973, vol. 133, pp. 709–724. DOI: 10.1042/bj1330709
4. Veremeenko K.N., Goloborodko O.P., Kizim A.I. *Proteoliz v norme i pri patologii* [The proteolysis is normal also at pathology]. Kiev, Zdorov'e Publ., 1988. 200 p. (In Russ.).
5. Toropygin I.Yu., Mirgorodskaya O.A., Moshkovskii S.A., Serebryakova M.V., Archakov A.I. Controlled trypsinolysis of human cancer and non cancer sera for direct matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2012, vol. 325–327, pp. 121–129. DOI: 10.1016/j.ijms.2012.08.011
6. Rehman A.A., Ahsan H., Khan F.H. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian. *Journal of Cellular Physiology*, 2013, vol. 228, no. 8, pp. 1665–1675. DOI: 10.1002/jcp.24266
7. Veremeenko K.N., Kizim A.I., Dosenko V.E. [α 2-Macroglobulin: structure, physiological role and clinical value]. *Laboratornaya diagnostika* [Laboratory diagnostics], 2000, no. 2, pp. 3–9. (In Russ.).
8. Barrett A.J., Lorand L., ed. α 2-Macroglobulin. *Methods in Enzymology*, New York, Academic, 1981, vol. 80, pp. 737–754.
9. Swenson R.P., Howard J.B. Structural characterization of human alpha2-macroglobulin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, vol. 254, no. 11, pp. 4452–4456.
10. Ho A.S., Cheng C.C., Lee S.C., Liu M.L., Lee J.Y., Wang W.M., Wang C.C. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein A1. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17:58. DOI: 10.1186/1423-0127-17-58
11. Sampsonas F., Karkoulas K., Kaparianos A., Spiropoulos K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond α 1-antitrypsin deficiency. *Current Medical Chemistry*, 2006, vol. 13, no. 24, pp. 2857–2873. DOI: 10.2174/092986706778521922
12. Koz'min Yu.P., Manoylov A.V., Serebryakova M.V., Mirgorodskaya O.A. [Direct introduction of O^{18} isotopes to peptides and proteins for the quantitative analysis by a mass spectrometry method]. *Bioorganicheskaya Khimiya* [The Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 2011, vol. 37, no. 6, pp. 793–806. (In Russ.).
13. van Leuven F., Torrekens S., Overbergh L., Lorent K., de Strooper B., van den Berghe H. The primary sequence and the subunit structure of mouse alpha-2-macroglobulin, deduced from protein sequencing of the isolated subunits and from molecular cloning of the cDNA. *European Journal of Biochemistry*, 1992, vol. 210, no. 1, pp. 319–327. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17424.x
14. Purnal A.P. *Empiricheskaya kinetika (formal'naya fenomenologicheskaya kinetika)*. *Uchebnoe posobie* [Empirical kinetics (formal phenomenological kinetics). Education book]. Moscow, MFTI Publ., 2000. 80 p. (In Russ.).

Contacts: *Mirgorodskaya Olga Aleksandrovna*,
oa.mir@mail.ru

Article received by editing board on 18.12.2018