

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

Тараскин Александр Сергеевич

**Мультиплексный анализ факторов воспаления в сыворотке крови с
использованием новых масс-спектрометрических подходов**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель:
доцент, доктор биологических наук,
Васин Андрей Владимирович

Санкт Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей инженерной-физической школе Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», а также на базе лаборатории разработки молекулярных диагностических систем, отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Директор ВШ/Зав.каф. :

Журихина Валентина Владимировна,
доктор физико-математических наук,
профессор, Высшая инженерно-
физическая школа

Научный руководитель:

Васин Андрей Владимирович,
доктор биологических наук, доцент,
профессор Высшей школы
биомедицинских систем и технологий

Рецензент:

Егоров Владимир Валерьевич,
кандидат биологических наук,
НИЦ «Курчатовский институт» –
ПИЯФ, старший научный сотрудник

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Отсутствие специфических критериев диагностики синдрома системной воспалительной реакции (ССВР), в том числе сепсиса, обуславливает необходимость разработки подходов дифференциальной диагностики синдромов инфекционного и неинфекционного происхождения. Применяемая в настоящее время стандартная микробиологическая диагностика требует не менее 48 часов для выявления возбудителя, причем во многих случаях временной интервал, требуемый для диагностики, может оказаться значительно больше. Кроме того, на ее результаты может влиять предшествующая антибактериальная терапия и несоблюдение надлежащих требований при заборе биологического материала. Тем не менее, молекулярная диагностика ССВР, сепсиса и их возможных осложнений — трудновыполнимая задача вследствие высокой вариабельности и отсутствия специфических маркеров, характеризующих патогенез заболевания. В современной литературе описано свыше 178 различных биомаркеров ССВР, однако ни один из них не обладает необходимой надежностью, чтобы использовать его в качестве единственного диагностического критерия. Очевидно, что для диагностики воспалительных процессов, а также характеристики патогенеза заболевания, наиболее целесообразным является одновременное измерение нескольких маркеров в одном эксперименте [1, 2].

Наиболее удобным объектом для изучения изменений состава белков при возникновении каких-либо патологических состояний в организме человека является сыворотка крови человека. На сегодняшний день большим диагностическим потенциалом обладает метод масс-спектрометрии, позволяющий, во-первых, достоверно идентифицировать изучаемый объект, во-вторых, при применении некоторых подходов определять концентрацию отдельных компонентов в сложной белковой смеси. Вместе с тем, для идентификации и количественного анализа с помощью масс-спектрометрии, как правило, возникает необходимость выделить интересующий нас белковый объект, что практически исключает использование подобного подхода для серийных методов контроля.

В настоящей работе предлагается альтернативный вышеописанному подход для количественного мультиплексного анализа непосредственно в сыворотке крови человека, в том числе, не прибегая к предварительному фракционированию, с помощью современных масс-спектрометрических методик с применением изотопно-меченых внутренних стандартов на примере ряда белков острой фазы. В основе предлагаемого подхода лежат имеющиеся в литературе данные о функциональных особенностях интересующих нас белков: альфа-2-макроглобулина, фетуина А (α 2-Хереманса-Шмида гликопротеин, alpha 2-HS glycoprotein) и сывороточного амилоида А, а также способности первых двух белков участвовать в реакциях ограниченного протеолиза. Именно ограниченный протеолиз лежит в основе образования множества активных форм белков, которые поступают в биологическую среду в виде своих предшественников. Особенностью разрабатываемого в данной работе метода является применение способности трипсина образовывать комплекс с альфа-2-макроглобулином,

стимулирующего переход последнего в активное состояние за счет процесса ограниченного протеолиза, который бы исключал возможность протеолиза высокомолекулярных белков в сыворотке крови. Сформированный комплекс сохраняет активный центр фермента, ограничивая протеолитическую активность в отношении отдельных субстратов, зарегистрировать которую можно с помощью предлагаемого масс-спектрометрического подхода.

Цель исследования

Цель исследования – разработка метода мультиплексной количественной оценки концентраций таких маркеров воспаления, как альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А, в цельной сыворотке крови методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением изотопно-меченых внутренних стандартов.

Задачи исследования

1. Идентифицировать пептиды в обработанных трипсином сыворотках крови пациентов, определить принадлежность выявленных пептидов к известным маркерам воспаления методом MALDI масс-спектрометрии.
2. Отобрать пептиды-кандидаты, подходящие для применения в качестве изотопно-меченых стандартов и получить изотопно-меченые стандарты путем прямого введения изотопов ^{18}O в аналогичные синтетические пептиды.
3. С помощью метода MALDI масс-спектрометрии изучить особенности протекания реакций взаимодействия трипсина с альфа-2-макроглобулином и альфа-1-антитрипсином – основными ингибиторами, присутствующими в сыворотке крови.
4. Установить кинетические параметры образования используемых пептидов в процессе триптического гидролиза сыворотки крови и определить оптимальное время гидролиза.
5. Верифицировать разработанную методику масс-спектрометрической количественной оценки концентраций альфа-2-макроглобулина, фетуина А и сывороточного амилоида А с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа, путем установления наличия регрессионной зависимости между получаемыми результатами.
6. Проанализировать наличие статистически достоверных различий в значениях измеряемых концентраций маркеров между группами пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, пациентов с гриппом и коронавирусной инфекцией и здоровыми донорами.

Научная новизна

В работе впервые была продемонстрирована возможность мультиплексного количественного определения нескольких воспалительных маркеров (альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А) с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии в сыворотке крови человека без ее предварительного фракционирования. Впервые методы количественной масс-спектрометрии с применением технологии MALDI-TOF, применяемые для измерения маркеров воспаления, были верифицированы иммунологическими методами анализа, в частности иммуноферментным анализом. Впервые показана возможность выявления достоверных различий между группой пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями

мягких тканей и группой пациентов с вирусными инфекциями (грипп и коронавирус) по совокупности предлагаемого набора маркеров воспаления.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный метод единовременной количественной оценки альфа-2-макроглобулина, фетуина А и сывороточного амилоида А в сыворотке крови может быть применен как для оценки тяжести протекания заболевания и контроля лечения при инфекционных болезнях и системном воспалении, так и для независимой количественной оценки концентраций использованных в работе маркеров воспаления. Данный подход позволяет получать результат количественной оценки концентраций факторов быстрее стандартных иммунологических методов, а именно в течение 2,5 часов. Теоретическая значимость исследования состоит в изучении степени совокупного изменения уровней таких факторов воспаления, как фетуин А и сывороточный амилоид А в результате развития системного воспаления и протекания распространенных вирусных инфекций (грипп и коронавирусная инфекция) у человека.

Апробация работы и публикации

Результаты данной работы были представлены на международных и российских конференциях. По материалам исследования были опубликованы 6 печатных работ, среди них в рецензируемых научных журналах – 2, в сборниках тезисов докладов – 4.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением изотопно-меченых внутренних стандартов позволяет количественно оценивать уровень таких биомаркеров воспаления, как альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А в сыворотке крови без ее предварительного фракционирования.
2. С помощью масс-спектрометрии возможно одновременное определение концентраций трех факторов воспаления в одном образце.
3. Используемая совокупность маркеров воспаления позволяет статистически достоверно отличать группу пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей от группы пациентов с вирусными инфекциями (грипп и коронавирус), а также от контрольной группы.

1 Материалы и методы

1.1 Банк сывороток

Банк сывороток пациентов, насчитывающий образцы 87 пациентов, включающих контрольную группу здоровых доноров (30 пациентов), пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса (17 пациентов), пациентов с подтвержденным с помощью сертифицированных ОТ-ПЦР наборов для определения гриппа и ОРВИ (Амплисенс®) вирусом гриппа А (H1N1 и H3N2) (20 пациентов), пациентов с подтвержденной сертифицированным ПЦР набором коронавирусной инфекцией (20 пациентов) был сформирован и любезно предоставлен отделом молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

1.2 Регистрация и обработка масс-спектров

Для анализа как синтетических, так и полученных в результате ферментативного гидролиза трипсином пептидов использовали масс-спектрометрию с ионизацией лазерной десорбции в присутствии матрицы (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry, MALDI) с время-пролетным анализатором (TOF – «time of flight»), реализованную в приборе ultrafleXtreme™ (Bruker, Германия).

Образцы наносили на мишень (MTP 384 target plate ground steel TF, Bruker, Германия) для получения масс-спектров на приборе ultrafleXtreme™ (Bruker, Германия), оснащенном твердотельным лазером 337 нм. Для нанесения образцов использовали матрицу НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота, Bruker). Масс-спектры получали в режиме регистрации положительных ионов при помощи программы Bruker Daltonics flex Control (Bruker, Германия). Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Спектры получали в результате суммирования трех серий по 1000 импульсов лазера для каждой серии. Спектры фрагментации пептидов регистрировали с помощью метода LIFT (Bruker, Германия). Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Bruker Daltonics flex Analysis (Bruker, Германия). Идентификацию соединений осуществляли посредством программы Bruker Daltonics BioTools (Bruker, Германия), взаимодействующей с базами данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и SwissProt (www.uniprot.org) с использованием MASCOT (www.matrixscience.com). Для внутренней калибровки масс в спектрах использовали ионы, соответствующие продуктам автопротеолиза трипсина (842,51 и 2211,01 Да). Точность измерения масс устанавливали не более 50 ppm. В качестве варибельной модификации указывали окисление метионинов.

1.3 Получение изотопно-меченого стандарта из синтетических пептидов

Пептиды VGFYESDVMGR ($MH^+=1259,6$), HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR ($MH^+=2081,0$) и FFGHGAEDSLADQAANEWGR ($MH^+=2178,0$) были синтезированы в ООО «НПФ Верта» (г. Санкт-Петербург, Россия). Для получения изотопно-меченого пептида (далее – «стандарта») с требуемой степенью включения изотопов ^{18}O в состав пептидов была проведена оптимизация условий изотопного обмена.

Опираясь на ранее разработанные методики прямого введения изотопов ^{18}O для количественного анализа методом масс-спектрометрии [3, 4], были подобраны следующие условия получения изотопно-меченых пептидов: стандарты были получены путем инкубации 1 мМ водных растворов пептидов в присутствии двукратного объема $H_2^{18}O$ (95–98 % ^{18}O , "Cambridge Isotope Laboratories Andover", USA), 25% ацетонитрила и 10% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в течение 1 часа при 50°C в твердотельном термостате «Гном» (ДНК-технологии, Россия). Затем аликвоты полученных стандартов высушивали в вакуумном концентраторе SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf 5305, Германия) для дальнейшего перерастворения в необходимом объеме воды (LiChrosolv, Merck, Германия) непосредственно перед использованием.

Концентрацию стандартов и степень включения изотопов кислорода ^{18}O характеризовали масс-спектрометрически.

1.4 Обработка трипсином сывороток крови человека

Сыворотки крови разбавляли дистиллированной водой в 25 раз и смешивали в равном соотношении по объему с трипсином (Sequencing Grade Modified Trypsin, Frozen, Promega, США), разведенному до концентрации 50 мкг/мл 50 мМ NH_4HCO_3 . Полученную смесь помещали в твердотельный термостат «Гном» (ДНК-технологии, Россия) для дальнейшей инкубации при 37°C в течении требуемого промежутка времени. Реакцию трипсинолиза останавливали внесением равного объема 2% трифторуксусной кислоты (ТФУ) до объемной концентрации 1%.

1.5 Проведение иммуноферментного анализа

Для количественного измерения альфа-2-макроглобулина использовали коммерческий набор для иммуноферментного анализа (ИФА) $\alpha 2$ -Makroglobulin ELISA (Immundiagnostik, Bensheim, Germany, cat. K6610A.RF). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для количественного измерения фетуина А использовали коммерческий набор для ИФА Human Fetuin A/AHSG DuoSet ELISA (R&D Systems, cat. DY1184). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для количественного измерения сывороточного амилоида А использовали коммерческий набор ИФА Human Serpin A1 DuoSet ELISA (R&D Systems, cat. DY1268). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

1.6 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью метода наименьших квадратов, критериев Вальда-Вольфовица, Лемана-Розенблатта, Стьюдента, Уилкоксона для связанных выборок с поправкой Имана, U -критерия Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 6.0 и MATLAB 8.2 для OS Windows.

2 Результаты и обсуждение

2.1 Поиск и идентификация пептидов, относящихся к основным маркерам воспаления

Для идентификации предполагаемых маркеров воспаления в сыворотке крови в работе был применен наиболее распространенный подход масс-спектрометрического анализа белков – «снизу-вверх» или «bottom-up». В основе данного подхода лежит предварительное ферментативное расщепление белка или сложной смеси белков на более короткие пептиды, с целью дальнейшего анализа полученного профиля. При решении подобных задач, наиболее часто используемым ферментом является трипсин. Согласно литературным данным, при изучении белков большинства видов с известным геномом, подобная предварительная обработка образца трипсином, как правило, позволяет идентифицировать один или несколько белков в смеси [5]. Помимо этого, благодаря конструктивным особенностям ионного источника MALDI-TOF, применяемого в данной работе, есть возможность использовать биологический

материал без предварительной очистки или его фракционирования. В нашем случае, это позволяет работать с цельной сывороткой крови [6].

В результате изучения продуктов ферментативного гидролиза трипсином в различные моменты времени (от 3 до 120 минут) шести сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса, было установлено наличие характерных триптических пептидов в области масс до 3000 Да. Выбор пептидов был обусловлен воспроизводимостью соответствующих им пиков на спектрах от сыворотки к сыворотке и достаточной для регистрации величины интенсивностей этих пиков. На следующем этапе была произведена идентификация предполагаемых кандидатов и их отношение к присутствующим в крови маркерам воспаления с помощью введения полученного массива данных в компьютерную библиотеку белкового поиска Mascot [7].

Дальнейшим критерием отбора служили: отсутствие участков в последовательности с недоразрывами в сайтах трипсинолиза, склонности пептидов к модификации (отсутствие или минимальное количество в последовательности метионина, триптофана, цистеина и N-терминального глутамина, а также аспарагина и аргинина). В результате, качестве пептидов-кандидатов были отобраны три пептида с мономолекулярными значениями $MH^+=1259,6$; $MH^+=2081,0$ и $MH^+=2178,0$, входящих в состав таких белков сыворотки крови как альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А, соответственно. На Рисунке 1 представлен фрагмент масс-спектра через 15 и 120 минут гидролиза сыворотки крови S-32, пациента с гангреной нижних конечностей.

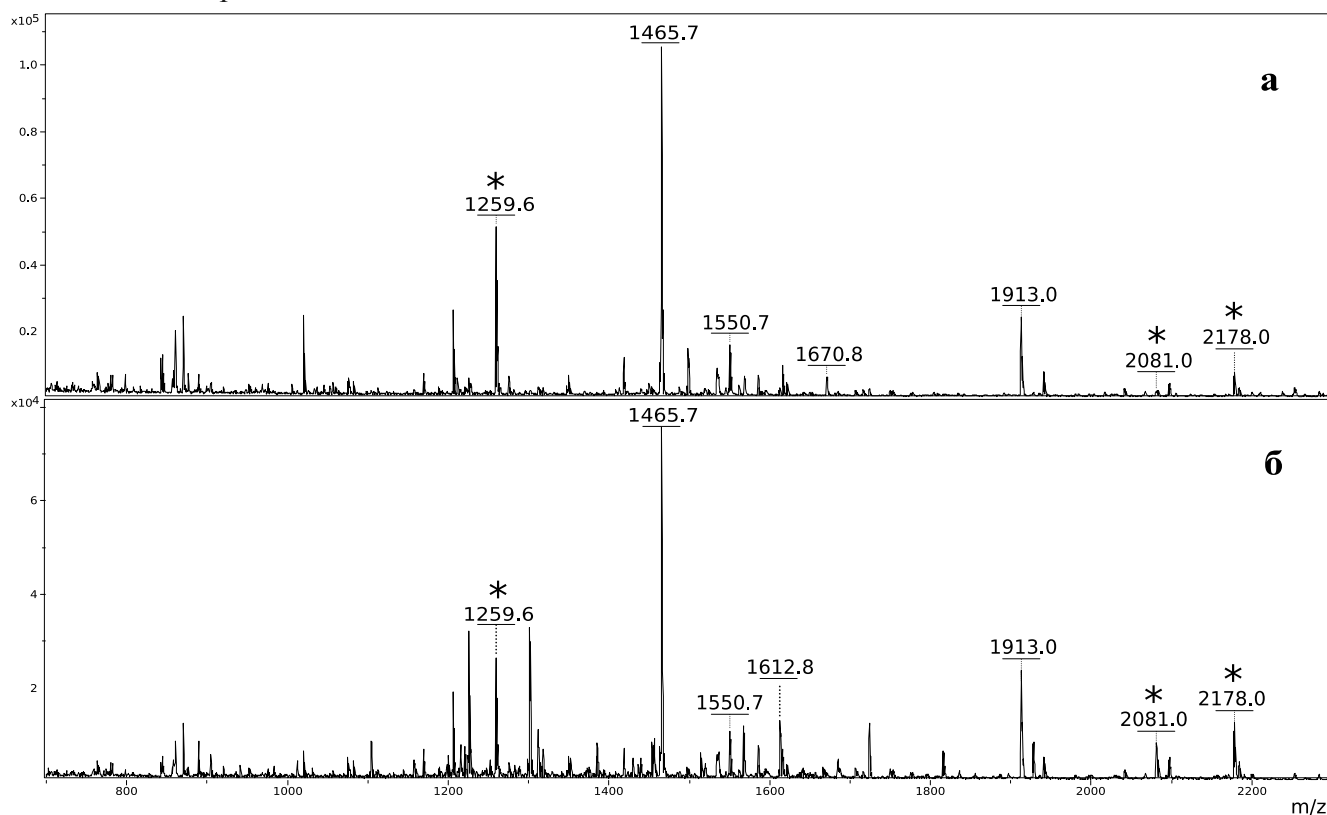


Рисунок 2.1.1 – MALDI-TOF масс-спектр сыворотки крови S-32, обработанной трипсином, А – через 15 минут инкубации, Б – через 120 минут инкубации. Пептиды, обозначенные величинами MH^+ на спектре, относятся к различным маркерам воспаления. Значения MH^+ отобранных пептидов-кандидатов обозначены «*».

Для ионов с $MH^+=1259,6$ (альфа-2-макроглобулин) и $MH^+=2081,0$ (фетуин А) предполагаемая последовательность была подтверждена по спектрам фрагментации.

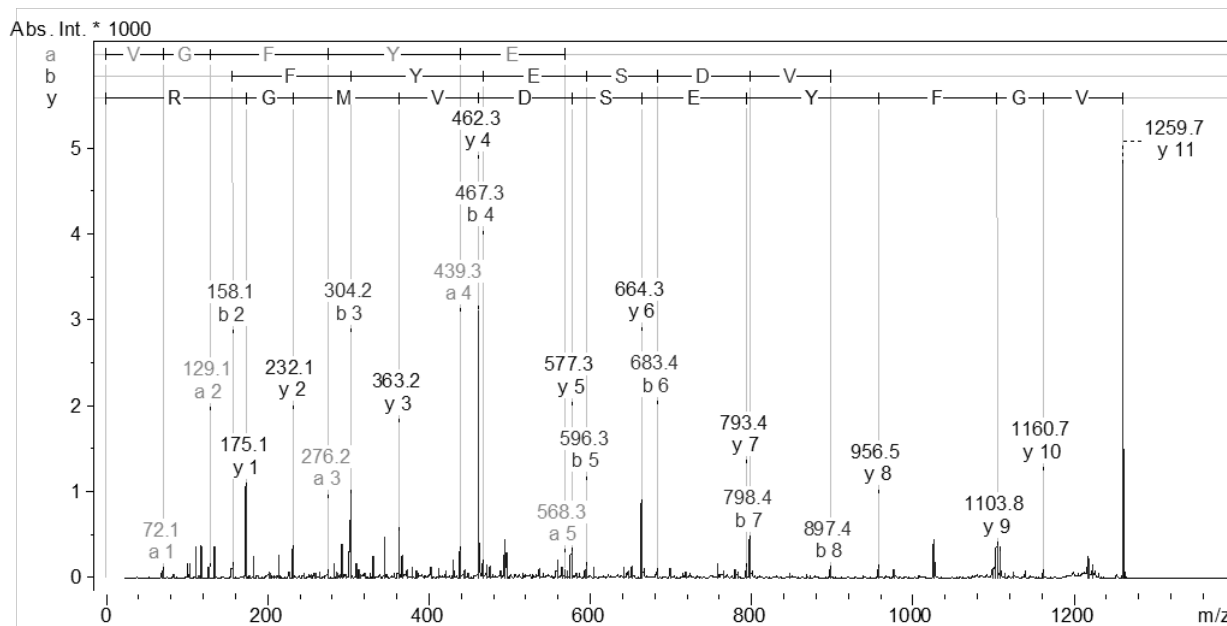


Рисунок 2.1.2 – Спектр фрагментации квазимолекулярного иона с $MH^+=1259,6$. Отмечены соответствия с аминокислотной последовательностью пептида VGFYVESDVMGR, входящего в состав последовательности альфа-2-макроглобулина (UniProtKB:P01023).

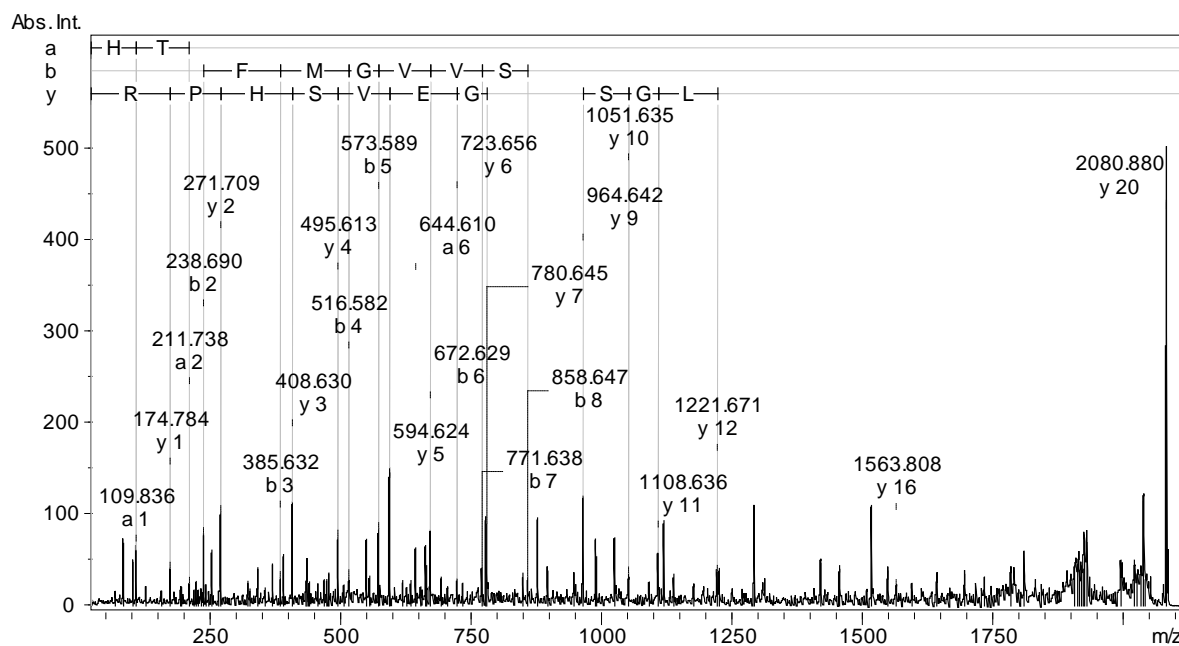


Рисунок 2.1.3 – Спектр фрагментации квазимолекулярного иона с $MH^+=2081,0$. Отмечены соответствия с аминокислотной последовательностью пептида HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR, входящего в состав последовательности фетуина А (Alpha-2-HS-Glycoprotein, UniProtKB:P02765).

Для иона с $MH^+=2178,0$ принадлежность к белку сывороточного амилоида А была установлена в результате обращения к компьютерной библиотеке белкового поиска Mascot при идентификации всех триптических пептидов, представленных на спектре сывороточных

продуктов ферментативного гидролиза, после двух часов гидролиза. Совпадения 7 значений MH^+ ионов экспериментального с теоретическим спектром позволили достоверно идентифицировать в исследуемом образце сывороточный амилоид A1 с величиной Score = 105 (пороговое значение 56), с величиной покрытия исходной последовательности в 68%. В случае, если Score больше порогового значения, то идентификация соединения является достоверной ($p < 0,05$).

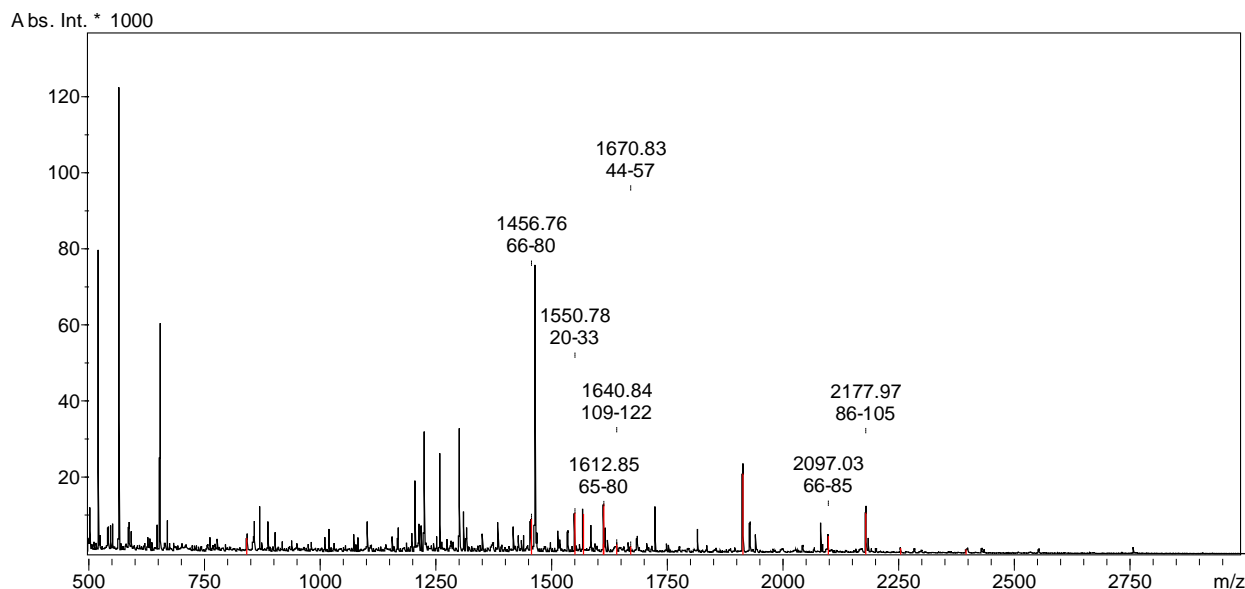


Рисунок 2.1.4 – Результаты идентификации сывороточного амилоида A1 в сыворотке пациента S-32. Красным отмечены ионы, соответствующие пептидам, входящим в состав последовательности сывороточного амилоида A1 (UniProtKB:P0DJ18).

Protein sequence coverage: 68%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MKLLTGLVFC SLVLGVSSRS **FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS**
 51 **DKYFHARGNY DAAKRGPGGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHG AEDSLADQAA**
 101 **NEWGRSGKDP NHFRPAGLPE KY**

Start – End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
20 – 33	1550.7777	1549.7704	1549.7202	32.5	0	R.SFFSFLGEAFDGAR.D
44 – 57	1670.8335	1669.8262	1669.7848	24.8	1	R.EANYIGSDKYFHAR.G
65 – 80	1612.8477	1611.8405	1611.8117	17.8	1	K.RGPGGVWAAEAISDAR.E
66 – 80	1456.7616	1455.7543	1455.7106	30.0	0	R.GPGGVWAAEAISDAR.E
66 – 85	2097.0335	2096.0262	2096.0399	-6.52	1	R.GPGGVWAAEAISDARENIQR.F
86 – 105	2177.9720	2176.9647	2176.9562	3.90	0	R.FFGHGAEDSLADQAANEWGR.S
109 – 122	1640.8415	1639.8342	1639.8107	14.4	1	K.DPNHFRPAGLPEKY.-

Рисунок 2.1.5 – Таблица совпадений последовательностей аминокислот, обнаруженных в сыворотке S-32, с последовательностью белка сывороточного амилоида A1 (UniProtKB:P0DJ18)

Таким образом, иону с $MH^+=2178,0$ соответствует последовательность FFGHGAEDSLADQAANEWGR, пептид с указанной последовательностью входит в состав сывороточного амилоида A1 (UniProtKB:P0DJ18).

2.2 Получение изотопно-меченого стандарта из синтетических пептидов

Для каждого из 3 исследуемых маркеров воспаления был получен изотопно-меченый стандарт, концентрация которого была определена по спектрам смеси пептида и стандарта с учетом известного изотопного распределения, полученного из спектров пептида и стандарта по отдельности. Соотношение суммарной площади под пиками пептида и суммарной площади под пиками стандарта в смеси равно отношению концентраций данных соединений. На Рисунке 2.2.1 приведен пример фрагмента MALDI масс-спектров характеристического пептида VGFYESDVMGR ($MH^+=1259,6$) (а), стандарта (б) и их смеси (в).

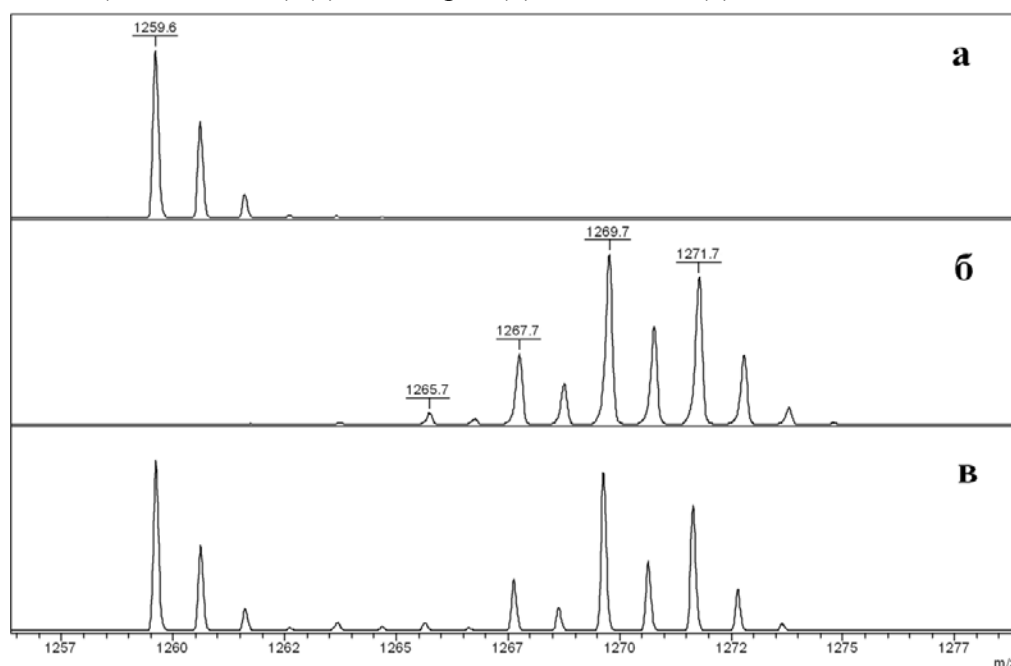


Рисунок 2.2.1 – Фрагменты MALDI масс-спектров характеристического пептида VGFYESDVMGR ($MH^+=1259,6$) (а), стандарта (б) и их смеси.

2.3 Получение кинетических кривых накопления продуктов триптического гидролиза альфа-2-макроглобулина в сыворотке крови

Одним из наиболее интересных измеряемых маркеров воспаления в данной работе выступает альфа-2-макроглобулин ($\alpha 2$ -МГ). Помимо участия в целом ряде регуляторных и транспортных функций, $\alpha 2$ -МГ способен формировать комплексы с протеазами всех классов, в том числе с трипсином. Это особенно важно при разработке количественного масс-спектрометрического подхода для определения как самого $\alpha 2$ -МГ, так и остальных исследуемых маркеров (фетуина А и сывороточного амилоида А). Хорошо известно, что в сыворотке присутствуют и прочие ингибиторы протеаз, однако, основными считают $\alpha 2$ -МГ и альфа-1-антитрипсин ($\alpha 1$ -АТ), который способен ингибировать не только трипсин, но и многие другие протеолитические ферменты[8]. Уровни альфа-1-антитрипсина также связывают с процессами воспаления и развития сепсиса в организме [9].

Таким образом, в зависимости от количества добавляемого в сыворотку человека трипсина, он может находиться в трех возможных состояниях: прежде всего, происходит связывание трипсина с $\alpha 2$ -МГ (комплекс трипсина с $\alpha 2$ -МГ), затем оставшееся количество

связывается с $\alpha 1$ -АТ (комплекс трипсина с $\alpha 1$ -АТ), и, при наличии избытка трипсина он присутствует в сыворотке в свободном виде.

В основе разрабатываемого подхода использовалась способность трипсина формировать комплекс с $\alpha 2$ -МГ с получением характерного пептида VGFYESDVMGR [8]. Из литературных данных [10, 11] известно, что процесс взаимодействия трипсина с $\alpha 2$ -МГ протекает в несколько стадий, которые включают не только образование самого комплекса, но и как ряд других процессов, связанных с конформационными переходами, а также гидролизом в каждой цепи двух пептидных связей ($\text{Arg}_{681}\text{-Val}_{682}$ и $\text{Arg}_{696}\text{-Leu}_{697}$) протекающим уже после комплексообразования. При этом, этим использованный для получения стандарта в данной работе пептид VGFYESDVMGR ($\text{MH}^+=1259,6$) гидролитически отщепляется от зоны приманки (bait region), представляющей собой две из четырех гомологичных цепей $\alpha 2$ -МГ, входящих в состав такого тетрамера [11]. Благодаря наличию стехиометрического соотношения между количеством получаемого пептида и количеством $\alpha 2$ -МГ, связавшегося с трипсином, мы можем определять концентрацию $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови на основании измерения концентрации данного пептида методом MALDI масс-спектрометрии с использованием полученного изотопно-меченого стандарта для видимого на спектре пептида VGFYESDVMGR ($\text{MH}^+=1259,6$).

Для подтверждения возможности измерять $\alpha 2$ -МГ в сыворотке на основании вышеописанных принципов, на первом этапе необходимо было установить оптимальное время триптического гидролиза, соответствующее максимально возможной концентрации детектируемого пептида. Для этого был осуществлен триптический гидролиз трех сывороток здоровых доноров с внесением избытка трипсина по сравнению с присутствующими в сыворотке основными протеазами. Сыворотку разбавляли дистиллированной водой в 25 раз и вносили равный объем трипсина в концентрации 50 мкг/мл (2,12 мкМ) в буфере 50 мМ NH_4HCO_3 . Согласно литературным данным, референсные значения $\alpha 2$ -МГ (725 кДа) и $\alpha 1$ -АТ (55 кДа) в сыворотке составляют до 4 и 2 г/л соответственно для лиц старше 18 лет [12–14]. С учетом разведений сыворотки водой и молярной массы ингибиторов, предполагаемые значения должны были составлять до 0,22 мкМ $\alpha 2$ -МГ, способного связывать по две молекулы трипсина и 1,5 мкМ $\alpha 1$ -АТ, связывающего трипсин в эквимолярной концентрации. Реакцию гидролиза осуществляли в твердотельном термостате «Гном» (ДНК-технологии, Россия) при 37°C, останавливая реакцию равным объемом 2% ТФУ через 0, 3, 7, 15, 30, 60, 120, 240 минут.

На Рисунке 2.3.1 изображена кривая накопления продукта триптического гидролиза с $\text{MH}^+=1259,6$ во времени.

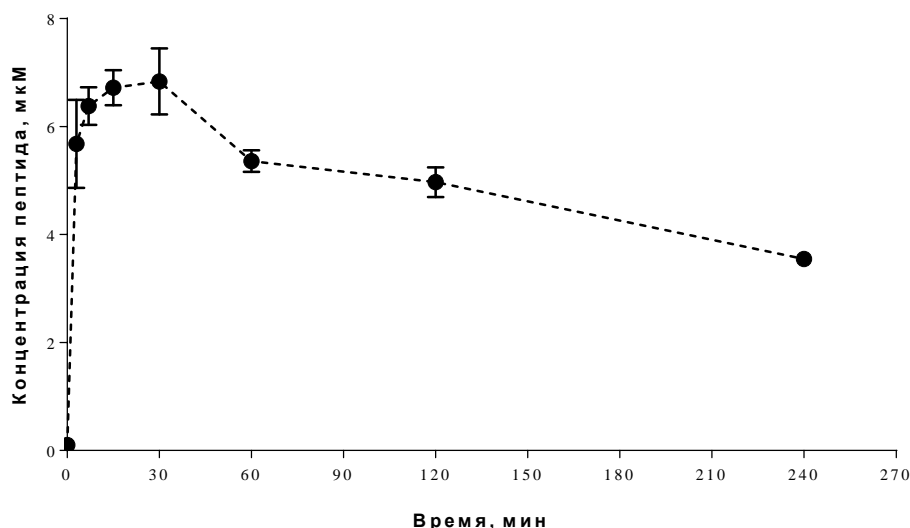


Рисунок 2.3.1 – Кривая накопления продукта триптического гидролиза с $MH^+=1259,6$ во времени. Точками на графике отмечены средние значения, планки погрешности отражают величину стандартного отклонения

По полученным результатам максимум измеряемой концентрации пептида $MH^+=1259,6$ достигался через 15 минут инкубации сыворотки с трипсином.

2.4 Установление особенностей протекания реакции взаимодействия трипсина с основными ингибиторами протеаз в сыворотке крови

Здесь и в дальнейшем все измерения концентраций $\alpha 2$ -МГ осуществляли в образцах, подвергнутых ферментативному гидролизу трипсином в результате остановки данной реакции равным объемом 2% ТФУ через 15 минут инкубации в твердотельном термостате при 37°C.

Для установления корректности получаемых результатов необходимо было выяснить пропорциональность концентраций $\alpha 2$ -МГ и детектируемого пептида. Для этого в образец сыворотки здорового донора вносили разные количества хроматографически очищенного $\alpha 2$ -МГ в известной концентрации. Уровень $\alpha 2$ -МГ измеряли масс-спектрометрически по образуемому пептиду $MH^+=1259,6$. Получали среднее значение в сыворотке без добавления очищенного препарата и находили разницу расчетных значений $\alpha 2$ -МГ в зависимости от вносимой концентрации. Результаты представлены в Таблице 2.4.1.

Таблица 2.4.1 – Результаты измерения $\alpha 2$ -МГ в сыворотке с добавлением очищенного $\alpha 2$ -МГ в известной концентрации.

№ пробы	Добавлено $\alpha 2$ -МГ, нМ	Добавляемый $\alpha 2$ М	Сыворотка	Смесь	Разница значений в смеси и среднего значения в сыворотке без добавления, нМ
		Измерено $\alpha 2$ -МГ, нМ	Измерено $\alpha 2$ -МГ, нМ	Измерено $\alpha 2$ -МГ, нМ	
1	30,6	26,0	43,2	72,3	28,4
2	22,9	21,7	43,0	63,4	19,5
3	15,3	13,0	47,4	57,2	13,3
4	7,6	8,4	43,0	50,3	6,4
5	0,0	0,0	42,9	43,7	0,0

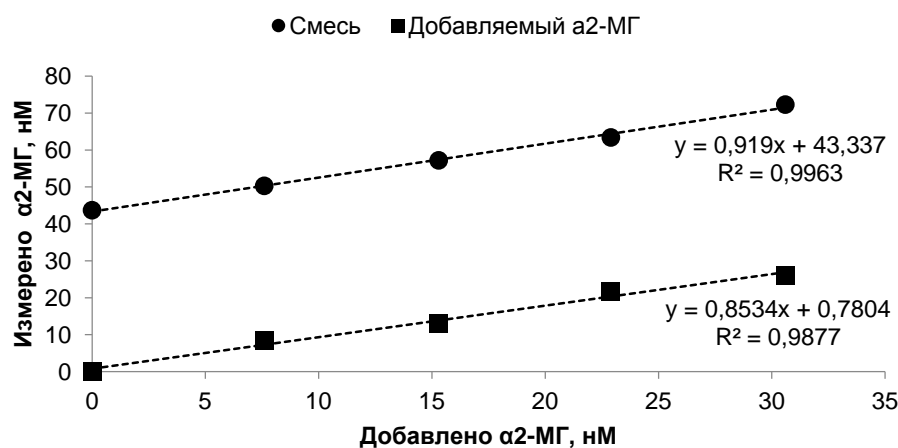


Рисунок 2.4.1 – Калибровочная кривая для установления пропорциональности концентраций α2-МГ и детектируемого пептида.

Таким образом, была установлена линейная зависимость измеряемой концентрации α2-МГ в сыворотке от внесения известной концентрации очищенного α2-МГ.

Поскольку α1-АТ является вторым по значимости ингибитором протеаз в сыворотке, а также его концентрация может существенно варьироваться, необходимо было установить возможное влияние присутствия различного количества α1-АТ на результаты измерений α2-МГ по $MN^+ = 1259,6$ в образцах. Для этого к сыворотке здорового донора добавляли очищенный α1-АТ в концентрациях 18,2 мкМ; 36,4 мкМ и 72,8 мкМ. Результаты представлены в Таблице 2.4.2

Таблица 2.4.2 – Результаты измерения α2-МГ в сыворотке с добавлением очищенного α1-АТ в известной концентрации.

Время, мин	Без добавления α1-АТ	Внесение α1-АТ, мкМ		
		18,2	36,4	72,8
Расчетные значения α2-МГ в образцах, нМ				
2	34,0	34,2	33,8	28,2
5	40,6	40,4	39,3	36,5
10	44,1	43,1	43,1	40,2
15	48,8	48,8	51,1	46,9
30	47,0	48,2	46,8	45,5
60	45,7	45,2	46,3	44,2

В результате проведения анализа не было обнаружено существенных отклонений в измерениях уровней α2-МГ, таким образом, добавление α1-АТ не оказывает влияния на кинетику накопления пептида и определение концентрации α2-МГ в сыворотке крови.

Еще одним варьируемым параметром выступает концентрация трипсина, которая могла бы изменять скорость реакции, если бы реакция взаимодействия трипсина с α2-МГ была бы межмолекулярной, протекающей по классическому ферментативному механизму. Однако согласно литературным данным [10, 15] реакция является внутримолекулярной, при обычных условиях молекулы трипсина образуют устойчивый комплекс с α2-МГ с высокой константой связывания. При наличии достаточного количества трипсина в расчете на сайты связывания α2-

МГ дальнейшее избыточное добавление трипсина не должно влиять на кинетику образования пептида.

Для проверки данного предположения к образцу сыворотки здорового донора добавляли различные концентрации трипсина и получали кинетические кривые накопления пептида в данных условиях. На Рисунке 2.4.2 приведена кривая накопления продукта гидролиза $MH^+=1259,6$ в зависимости от концентрации трипсина.

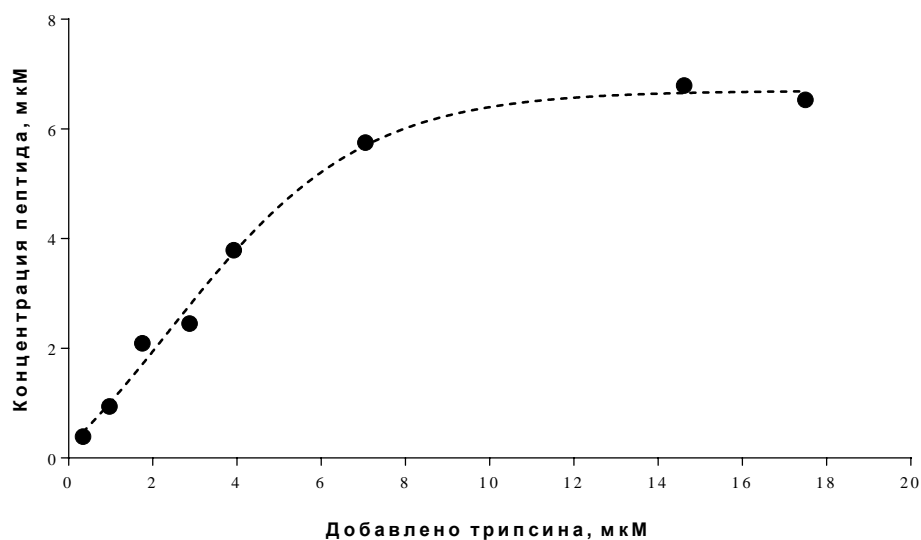


Рисунок 2.4.2 – Кривая накопления продукта гидролиза $MH^+=1259,6$ в зависимости от концентрации трипсина.

Как можно заметить, при концентрации трипсина более 7 мкМ (с учетом разведения сыворотки в 25 раз – 0,28 мкМ) значения концентрации измеряемого пептида перестают зависеть от количества вносимого трипсина. Таким образом, добавление трипсина в избытке по отношению к количеству сайтов связывания трипсина $\alpha 2$ -МГ не меняет кинетику накопления исследуемого продукта ферментативного гидролиза $MH^+=1259,6$.

2.5 Получение кинетических кривых накопления продуктов триптического гидролиза фетуина А в сыворотке крови

Согласно литературным данным, протеазы, образующие комплекс с $\alpha 2$ -МГ изменяют свою каталитическую активность, однако не теряют способность к гидролизу по отношению к низкомолекулярным субстратам, а также к некоторым белкам [6, 10–12, 15–17]. Это особенно важно, учитывая тот факт, что при внесении трипсина в сыворотку существенная его часть находится в комплексе с $\alpha 2$ -МГ. Несмотря на избыток трипсина по отношению к $\alpha 2$ -МГ, присутствующий в сыворотке $\alpha 1$ -АТ должен полностью ингибировать в эквимольном соотношении количество оставшегося свободного трипсина. Тем не менее, особенности строения фетуина А, местонахождения детектируемого пептида в последовательности, а также чувствительности к протеазам позволяют детектировать продукт гидролиза с $MH^+=2081,0$.

Фетуин А представляет собой белок плазмы крови, состоящий из двух полипептидных цепей, связанных дисульфидной связью, обе из которых образуются путем расщепления пре-белка, синтезированного из единственной матричной РНК. Зрелая форма образуется из пре-протеина после протеолитического процессинга и посттрансляционных модификаций:

гликозилирования, фосфорилирования и сульфатирования. Подобные посттрансляционные модификации, вероятно, регулируют экспрессию фетуина А, его биологическую стабильность и активность [18–20].

Детектируемый в сыворотке пептид HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR с $MH^+=2081,0$ входит в состав линкерного пептида, соединяющего две полипептидные цепи искомого фетуина А (Рисунок 2.5.1).

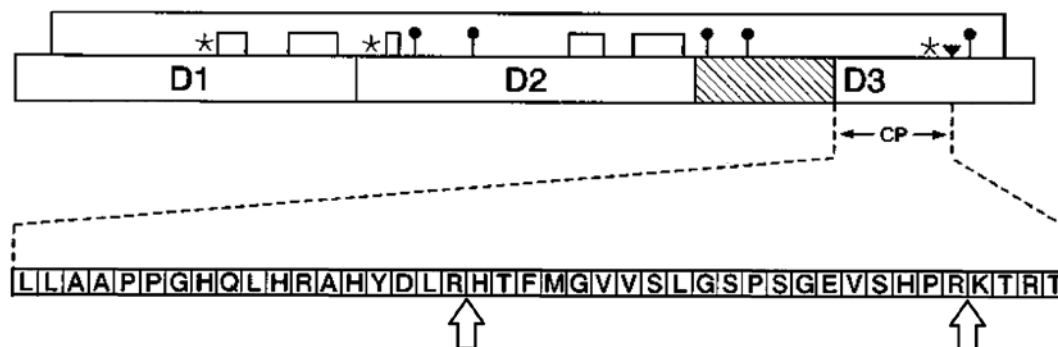


Рисунок 2.5.1 – Структура и строение фетуина А. D1, D2 – цистатин-подобные домены. D3 – специфический домен фетуинов, содержащий линкерный пептид (connecting peptide, CP); дисульфидные связи (□), сайты гликозилирования (↑), фосфорилирования (*), а также сайт протеолитического расщепления на легкую и тяжелую цепи (▼). В нижней части Рисунка приведена последовательность линкерного пептида [19]. Стрелками на последовательности обозначены начало и конец детектируемого пептида HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR с $MH^+=2081,0$.

На данный момент известно, что протеолитическое отщепление линкерного пептида происходит в результате дальнейших посттрансляционных модификаций фетуина А или в результате ограниченного протеолиза, который может быть осуществлен под действием трипсина, химотрипсина, эластазы, калликреина, тромбина и ренина, а также, вероятно, некоторых других протеаз, активность которых проявляется в результате развития воспалительного процесса в организме человека [18–20].

В данной работе, для установления оптимального времени триптического гидролиза сыворотки крови, соответствующего минимальному времени, необходимому для достижения максимума накопления пептида HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR с $MH^+=2081,0$ были получены кинетические кривые в трех повторах для сыворотки пациента S-15 с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей (Рисунок 2.5.2).

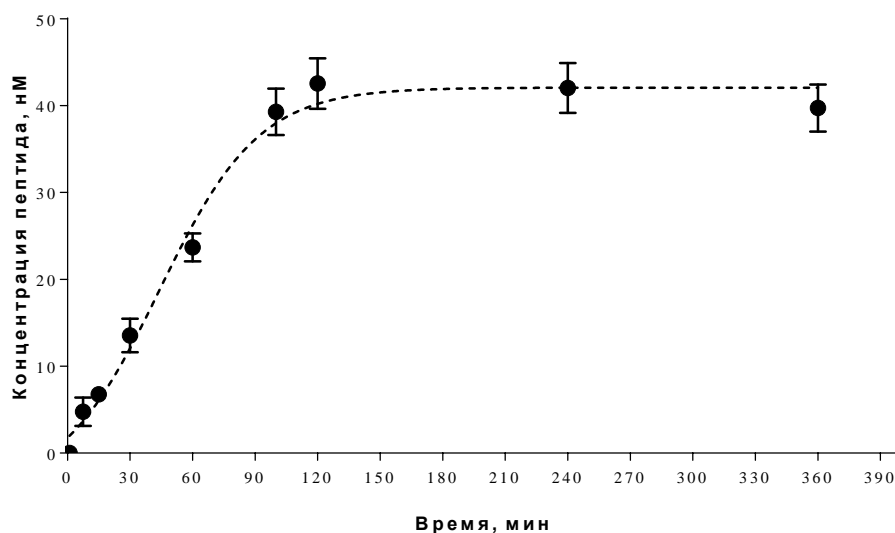


Рисунок 2.5.2 – Кривая накопления продукта триптического гидролиза с $MH^+=2081,0$ во времени. Точками на графике отмечены средние значения, планки погрешности отражают величину стандартного отклонения.

Таким образом, во всех исследуемых образцах максимальное количество продукта с $MH^+=2081,0$ в результате триптического гидролиза достигалось приблизительно к 120 минутам при инкубации в твердотельном термостате при $37^{\circ}C$.

2.6 Получение кинетических кривых накопления продуктов триптического гидролиза сывороточного амилоида A1 в сыворотке крови

Для сывороточного амилоида A1 (CAA1, serum amyloid A, SAA1) уже была продемонстрирована возможность его гидролиза в случае образования трипсином комплекса с $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови человека, что может быть использовано для диагностики воспалительных процессов [6].

Белки подсемейства сывороточного амилоида A входят в семейство аполипопротеинов. В крови они, как правило, входят в состав липопротеинов высокой плотности (ЛВП), а также считаются циркулирующими предшественниками амилоида A. Некоторые варианты белков САА (формы САА1 и САА2) подобно С-реактивному белку, представляет собой белки острой фазы, уровни которых в ответ на воспаление различного генеза повышаются на несколько порядков (10-1000 раз) [21].

Основными белковыми продуктами генов, отвечающих за синтез различных форм САА у человека являются САА1, САА2 и САА4. Зрелые формы САА1 и САА2 представляют собой белки длиной 104 а.о., отличающиеся несколькими аминокислотными заменами (порядка 7-8 замен в последовательностях для различных вариантов). Помимо этого, для форм САА1 и САА2 было заявлено о наличии прочих минорных вариантов с различными единичными аминокислотными заменами [21]. По причине высокой гомологии между изоформами САА1 и САА2 интерпретация литературных данных о соотношении этих белковых продуктов между собой затруднена, однако, на уровне мРНК известно о более высокой экспрессии (в десятки и сотни раз) гена САА1 по сравнению с САА2 у человека [21, 22]. В отличие САА1 и САА2, белок САА4 является конститутивным и не относится к белками острой фазы [21].

Используемый в данной работе пептид FFGHGAEDSLADQAANEWGR ($MH^+=2178,0$) входит в состав основной формы острофазных белков САА – САА1.

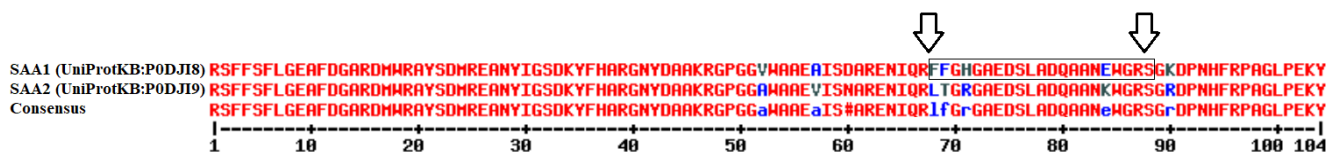


Рисунок 2.6.1 – Выравнивание последовательностей САА1(SAA1 UniProtKB: P0DJL8) и САА2 (SAA2 UniProtKB: P0DJL9). Стрелками на последовательности отмечены границы пептида FFGHGAEDSLADQAANEWGR ($MH^+=2178,0$).

В данной работе, для установления оптимального времени триптического гидролиза сыворотки крови, соответствующего минимальному времени, необходимому для достижения максимума накопления пептида FFGHGAEDSLADQAANEWGR ($MH^+=2178,0$) были получены кинетические кривые в трех повторах для сыворотки пациента Т-412 подтвержденной молекулярно-генетическими методами гриппозной инфекцией (вирус гриппа А) (Рисунок 2.6.2).

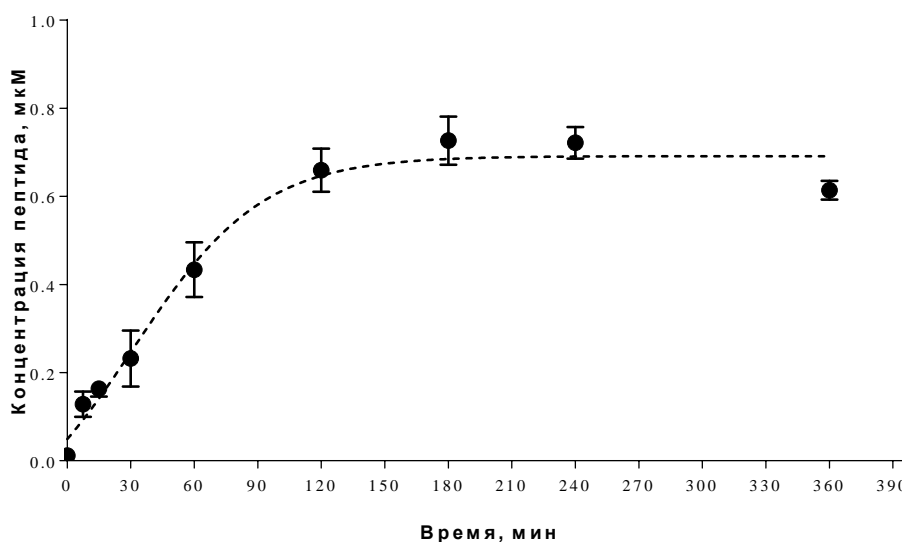


Рисунок 2.6.2 – Кривая накопления продукта триптического гидролиза с $MH^+=2178,0$ во времени. Точками на графике отмечены средние значения, планки погрешности отражают величину стандартного отклонения.

Таким образом, во всех исследуемых образцах максимальное количество продукта с $MH^+=2178,0$ в результате триптического гидролиза достигалось приблизительно к 120 минутам при инкубации в твердотельном термостате при 37°C.

2.7 Верификация разработанной масс-спектрометрической методики количественного определения альфа-2-макроглобулина в сыворотке крови с помощью коммерческого набора для проведения иммуноферментного анализа

Для верификации разрабатываемого масс-спектрометрического подхода для количественного определения α 2-МГ в сыворотке крови были отобраны образцы 20 пациентов, включающих контрольную группу здоровых доноров (5 пациентов), пациентов с гнойно-

воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса (5 пациентов), пациентов с подтвержденным с помощью сертифицированных ОТ-ПЦР наборов для определения гриппа и ОРВИ (Амплисенс®) вирусом гриппа А (H1N1 и H3N2) (5 пациентов), пациентов с подтвержденной сертифицированным ПЦР набором коронавирусной инфекцией COVID-19 (5 пациентов).

Концентрации $\alpha 2$ -МГ, полученные с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода, выраженные в г/л, при получении уравнения регрессионной кривой обозначены как y , а концентрации $\alpha 2$ -МГ, полученные в результате иммуноферментного анализа, выраженные в г/л, обозначены как значения переменной x .

Используя метод наименьших квадратов, была построена аппроксимирующая зависимость $y(x)$. Проверка статистической гипотезы о степени аппроксимирующего полинома показала, что для проведения полинома степени выше первой нет оснований (уровень значимости принятого решения равен 0,05).

Полученная зависимость:

$$y(x) = 2.064 \cdot x - 0.4683.$$

Границы 95%-ых доверительных интервалов для значений коэффициентов составили: (2.064 ± 0.381) и (-0.4683 ± 0.7023) (95% доверительные интервалы).

Таким образом, нет оснований считать, что значение коэффициента при x отличается от двух, а свободного коэффициента – от нуля.

Также нет оснований считать, что регрессионные остатки (разности между точками (x, y) и значениями регрессионной кривой $y(x)$) ведут себя неслучайным образом (критерий Вальда-Вольфовица).

Значение коэффициента корреляции между значениями с вероятностью 0,95 лежит в интервале $[0.84; 0.98]$ (двусторонний доверительный интервал) или в интервале $[0.86; 1.00]$ (односторонний доверительный интервал, правая граница зафиксирована на значении, равном +1).

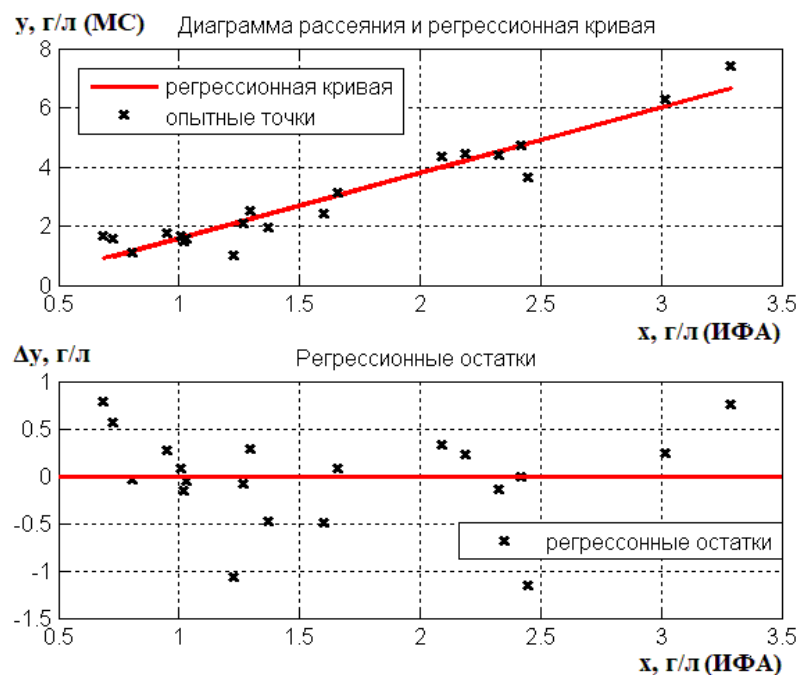


Рисунок 2.7.1 – Диаграмма рассеяния и регрессионная кривая. Δy - значения регрессионных остатков; y – значения концентраций, полученных с помощью иммуноферментного анализа(ИФА); x – значения, полученный с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода (МС).

Таким образом, выполненные измерения с вероятностью не менее 95% не позволяют утверждать, что данные двух сравниваемых методов измерения расходятся.

Для регрессионной кривой $y(x) = 2 \cdot x$ – была осуществлена проверка равенства средних в выборках ($2 \cdot x$) и y (критерий Стьюдента для связанных выборок). Согласно критерию нет оснований считать средние различными (значение статистики $t = 0,40$, критическое значение $t_{crit} = 2,08$, уровень значимости $\alpha = 0,05$). При проверке равенства медиан в выборках ($2 \cdot x$) и y : $P((2 \cdot x) < y) = 0,5$ (критерий Уилкоксона для связанных выборок с поправкой Имана), оснований считать медианы различными найдено не было (значение статистики $t = 0,11$, критическое значение $t_{crit} = 1,68$, уровень значимости $\alpha = 0,05$). При проверке адекватности регрессионной кривой критерием Вальда-Вольфовица (проверка регрессионных остатков на случайный характер) не было найдено оснований считать регрессионную кривую $y(x)$ неадекватной исходным данным (значение статистики $W = 0,39$, критическое значение $W_{crit} = 1,88$, уровень значимости $\alpha = 0,05$).

Оценка дисперсии случайной погрешности исследуемого масс-спектрометрического подхода составила $0,407 \text{ мг}^2/\text{мл}^2$, действительное значение ограничено сверху величиной $0,982 \text{ мг}^2/\text{мл}^2$.

Таким образом, результаты двух сравниваемых методов имеют высокую степень корреляции, однако значения, получаемые в результате масс-спектрометрического анализа превышают концентрации, полученные по ИФА примерно в два раза. Одной из возможных причин данного явления может выступать разный принцип анализа, который в случае ИФА основан на реакции антиген-антитело с обязательным наличием калибровочной кривой и рекомбинантного стандарта. Для проверки данной гипотезы был проведен сравнительный

эксперимент в котором с помощью двух методов была измерена концентрация очищенного $\alpha 2$ -МГ в известной концентрации, определенной спектрофотометрически.

Таблица 2.7.1 – Результаты измерения $\alpha 2$ -МГ методами ИФА и МС с добавлением очищенного $\alpha 2$ -МГ в известной концентрации.

Образец №	Внесенная концентрация очищенного $\alpha 2$ -МГ, г/л	Измеренная концентрация $\alpha 2$ -МГ по МС, г/л	Измеренная концентрация $\alpha 2$ -МГ по ИФА, г/л
1	0,8	0,76	0,41
2	0,4	0,42	0,22

По всей вероятности, более низкие значения, получаемые по ИФА, могут быть связаны со строением калибровочных стандартов, прилагаемых в комплекте, однако в связи с чрезвычайно низкими концентрациями (единицы нг/мл) измерить их концентрацию с помощью разрабатываемого подхода не представляется возможным.

Таким образом, значения получаемы с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода, по всей видимости, более точно отражают оцениваемую концентрацию полноразмерного $\alpha 2$ -МГ, чем оценка концентрации по рекомбинантному белку в ходе ИФА.

2.8 Верификация разработанной масс-спектрометрической методики количественного определения фетуина А в сыворотке крови с помощью коммерческого набора для проведения иммуноферментного анализа

Для верификации разрабатываемого масс-спектрометрического подхода для количественного определения фетуина А в сыворотке крови были отобраны образцы 87 пациентов, включающих контрольную группу здоровых доноров (30 пациентов, группа «контроль»), пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса (17 пациентов, группа «сепсис»), пациентов с подтвержденным с помощью сертифицированных ОТ-ПЦР наборов для определения гриппа и ОРВИ (Амплисенс®) вирусом гриппа А (H1N1 и H3N2) (20 пациентов, группа «грипп»), пациентов с подтвержденной сертифицированным ПЦР набором коронавирусной инфекцией COVID-19 (20 пациентов, группа «коронавирус»).

Концентрации фетуина А, полученные с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода, выраженные в г/л, при получении уравнения регрессионной кривой обозначены как y , а концентрации фетуина А, полученные в результате иммуноферментного анализа, выраженные в г/л, обозначены как значения переменной x .

Используя метод наименьших квадратов, была построена аппроксимирующая зависимость $y(x)$. Проверка статистической гипотезы о степени аппроксимирующего полинома показала, что для проведения полинома степени выше первой нет оснований (уровень значимости принятого решения равен 0,05).

Таблица 2.8.1 – Значения регрессионной зависимости и величины доверительных интервалов для метода наименьших квадратов.

Регрессионная зависимость $y(x)$ методом наименьших квадратов	Доверительные интервалы для коэффициентов регрессионной зависимости (доверительная вероятность равна 95% или 99%)
$y(x) = 0,9301 x + 10,83$	$a \in [0,8515; 1,0087], b \in [-18,87; 40,52]$.

В Таблице 2.8.1 зеленым цветом представлен доверительный интервал для коэффициента b , построенный для доверительной вероятности 0,95, а красным – доверительный интервал для коэффициента a , построенный для доверительной вероятности 0,99.

Полученная зависимость и построенные доверительные интервалы позволяют полагать, что общая зависимость $y(x)$ может иметь следующий вид

$$y(x) = x.$$

Значения коэффициента корреляции по всем результатам парных измерений концентрации фетуина А, полученным с применением ИФА и масс-спектрометрического подхода, приведены в Таблице 2.8.2.

Таблица 2.8.2 – Значения коэффициента корреляции по всем результатам парных измерений концентрации фетуина А, полученным с применением ИФА и масс-спектрометрического подхода.

Двусторонний доверительный интервал для коэффициента корреляции между x и y	Односторонний доверительный интервал для коэффициента корреляции между x и y (правая граница зафиксирована на значении, равном +1)
Доверительная вероятность равна $P = 0,95$	
[0,930; 0,969]	[0,935; 1,00]

Видно, что коэффициент корреляции достаточно близок к единице, что указывает на сильную линейную составляющую в зависимости $y(x)$. Регрессионная кривая $y(x) = x - 10$ получена при анализе общей корреляции между результатами измерений, выполненных методом ИФА и масс-спектрометрическим методом. Наличие свободного коэффициента в регрессионной зависимости отражает тот факт, что имеет место систематическая разность в показаниях между сравниваемыми методами.

Для регрессионной кривой $y(x) = x - 10$ – была осуществлена проверка равенства средних в выборках $(x - 10)$ и y (критерий Стьюдента для связанных выборок). Согласно критерию нет оснований считать средние различными (значение статистики $t=1,391$, критическое значение $t_{crit}=1,986$, уровень значимости $\alpha=0,05$). При проверке равенства медиан в выборках $(x - 10)$ и y : $P((x - 10) < y) = 0,5$ (критерий Уилкоксона для связанных выборок с поправкой Имана), оснований считать медианы различными найдено не было (значение статистики $T = 0,684$, критическое значение $T_{crit} = 1,659$, уровень значимости $\alpha=0,05$). В связи с некоторыми особенностями обрабатываемой совокупности данных – а именно в связи с неравномерностью их распределения вдоль оси значений x – проверка регрессионных кривых на адекватность обрабатываемым данным критерием Вальда-Вольфовица не проводилась (поскольку результат проверки достаточно чувствителен к «группированию» данных).

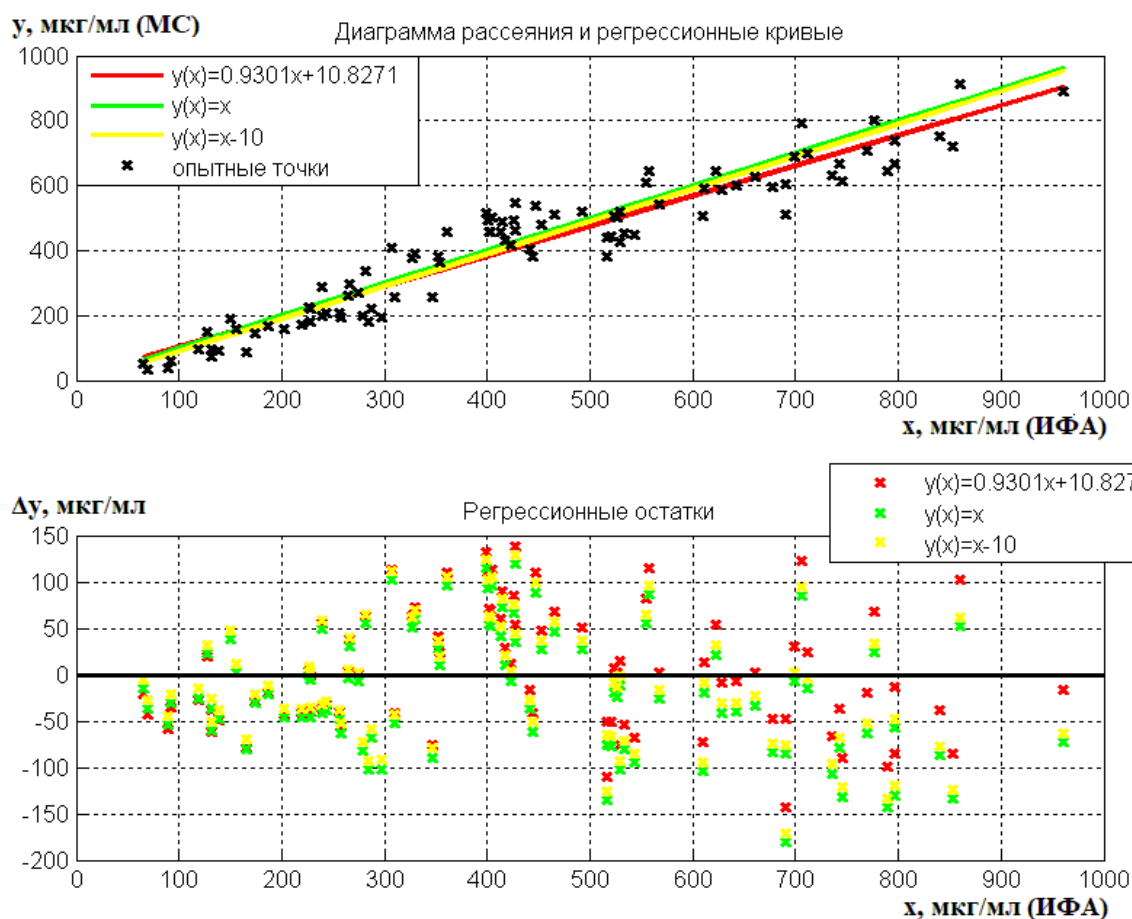


Рисунок 2.8.1 – Диаграмма рассеяния и регрессионные кривые. В качестве основной регрессионной кривой в результате статистического анализа была выбрана регрессионная кривая с уравнением $y(x) = x - 10$. Δy - значения регрессионных остатков; x – значения концентраций, полученных с помощью иммуноферментного анализа (ИФА); y – значения, полученный с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода (МС).

Выполненные измерения с вероятностью не менее 95% не дают оснований утверждать, что данные двух сравниваемых методов измерения расходятся.

2.9 Верификация разработанной масс-спектрометрической методики количественного определения Сывороточного амилоида А в сыворотке крови с помощью коммерческого набора для проведения иммуноферментного анализа

Для верификации разрабатываемого масс-спектрометрического подхода для количественного определения САА в сыворотке крови были отобраны образцы 87 пациентов, включающих контрольную группу здоровых доноров (30 пациентов, группа «контроль»), пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса (17 пациентов, группа «сепсис»), пациентов с подтвержденным с помощью сертифицированных ОТ-ПЦР наборов для определения гриппа и ОРВИ (Амплисенс®) вирусом гриппа А (H1N1 и H3N2) (20 пациентов, группа «грипп»), пациентов с подтвержденной сертифицированным ПЦР набором коронавирусной инфекцией COVID-19 (20 пациентов, группа «коронавирус»).

Концентрации САА1, полученные с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода, выраженные в г/л, при получении уравнения регрессионной кривой обозначены как -

у, а концентрации САА1, полученные в результате иммуноферментного анализа, выраженные в г/л, обозначены как значения переменной x .

Используя метод наименьших квадратов, была построена аппроксимирующая зависимость $y(x)$. Проверка статистической гипотезы о степени аппроксимирующего полинома показала, что для проведения полинома степени выше первой нет оснований (уровень значимости принятого решения равен 0,05). Соответственно уравнение регрессии равно $y(x) = a \cdot x + b$.

Таблица 2.9.1 – Значения регрессионной зависимости и величины доверительных интервалов для метода наименьших квадратов.

Регрессионная зависимость $y(x)$ методом наименьших квадратов	Доверительные интервалы для коэффициентов регрессионной зависимости (доверительная вероятность равна 99%)
$y(x) = 0,5478 x + 43,88$	$a \in [0,4782; 0,6174], b \in [3,970; 83,80]$.

Критерий знаков регрессионных остатков Вальда-Вольфица позволяет принять гипотезу о том, что данная регрессионная кривая адекватна обрабатываемым данным при уровне значимости, равном 0,05.

Полученная зависимость и построенные доверительные интервалы позволяют полагать, что общая зависимость $y(x)$ имеет следующий вид

$$y(x) = 0,5 x + 60.$$

Значения коэффициента корреляции по всем результатам парных измерений концентрации САА, полученные сравниваемыми методами, приведены в Таблице 2.9.2.

Таблица 2.9.2 – Значения коэффициента корреляции по всем результатам парных измерений концентрации САА1, полученным с применением ИФА и масс-спектрометрического подхода.

Двусторонний доверительный интервал для коэффициента корреляции между x и y	Односторонний доверительный интервал для коэффициента корреляции между x и y (правая граница зафиксирована на значении, равном +1)
Доверительная вероятность равна $P = 0,95$	
[0,92; 0,97]	[0,93; 1,00]

Для регрессионной кривой $y(x) = 0,5 x + 60$ – была осуществлена проверка равенства средних в выборках $(0,5x+60)$ и y (критерий Стьюдента для связанных выборок). Согласно критерию нет оснований считать средние различными (значение статистики $t=0,215$, критическое значение $t_{crit}=2,004$, уровень значимости $\alpha=0,05$). При проверке равенства медиан в выборках $(0,5x+60)$ и y : $P((0,5x+60)<y)=0,5$ (критерий Уилкоксона для связанных выборок с поправкой Имана), оснований считать медианы различными найдено не было (значение статистики $T=0,684$, критическое значение $T_{crit} = 1,659$, уровень значимости $\alpha=0,05$). При проверке адекватности регрессионной кривой критерием Вальда-Вольфовица (проверка регрессионных остатков на случайный характер) не было найдено оснований считать регрессионную кривую $y(x)$ неадекватной исходным данным (значение статистики $W = 0,768$, критическое значение $W_{crit} = 1,786$, уровень значимости $\alpha=0,05$).

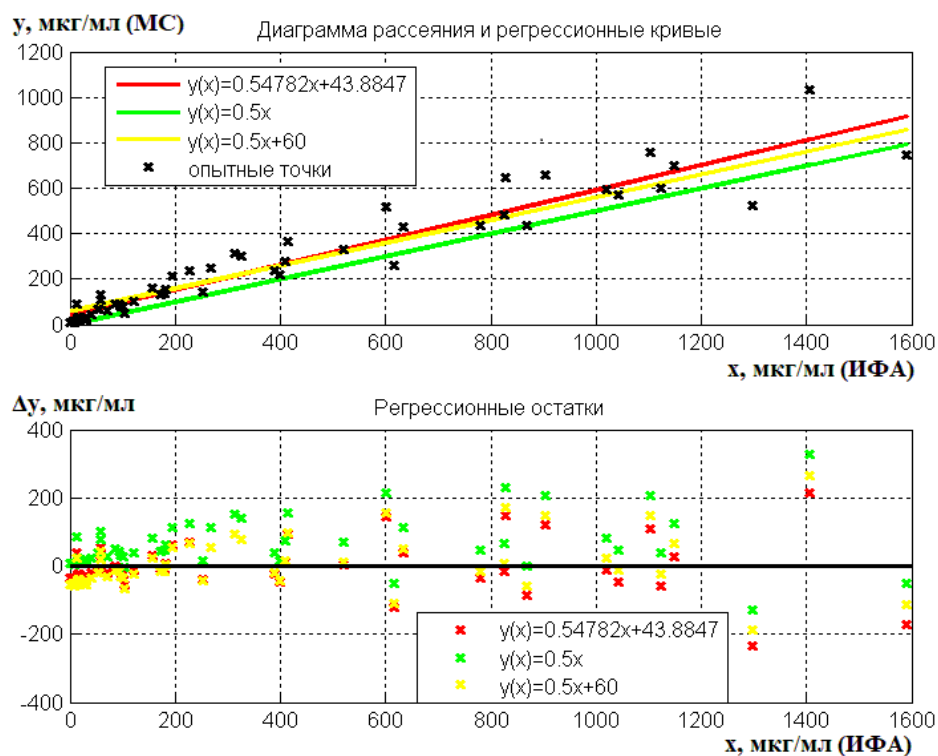


Рисунок 2.9.1 – Диаграмма рассеяния и регрессионные кривые. В качестве основной регрессионной кривой в результате статистического анализа была выбрана регрессионная кривая с уравнением $y(x) = 0,5 x + 60$. Δy - значения регрессионных остатков; x – значения концентраций, полученных с помощью иммуноферментного анализа (ИФА); y – значения, полученный с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода (МС).

Видно, что коэффициент корреляции достаточно близок к единице, что указывает на сильную линейную составляющую в зависимости $y(x)$ при сравнении результатов, получаемых различными методами. Однако ненулевое значение свободного коэффициента данной зависимости позволяет заключить, что между результатами измерений по ИФА и МС присутствует систематическое смещение. Наличие смещения результатов друг относительно друга можно объяснить присутствием в сыворотке крови различных форм САА, концентрацию каждого из которых невозможно определить обычными иммунологическими методами. Высокая гомология острофазных белков САА может приводит к низкой специфичности используемых антител по отношению к изоформам САА. Масс-спектрометрический подход же, напротив, позволяет специфически определять лишь изоформу САА1 благодаря наличию аминокислотной замены в последовательности использованного пептида, приводящей не только к изменению массы пептида, но и появлению дополнительного сайта трипсинолиза.

2.10 Оценка возможности дифференциальной диагностики на основании измерения исследуемых маркеров воспаления

Для каждой из исследованных групп данных (сепсис, грипп, коронавирус, контроль) характерно некоторое распределение результатов измерений концентрации по каждому из исследуемых маркеров воспаления. Если сравнение данных распределений покажет, что статистически нет оснований считать их совпадающими или накладывающимися друг на друга (т.е. имеющими одинаковые центры распределений), то это дает возможность для утверждения о различии соответствующих групп.

Сравнение распределений было выполнено с применением критерия Лемана-Розенблатта (при этом, данные о концентрации различных маркеров, полученные методом ИФА и с помощью разработанного подхода, были объединены). Сравнение центров распределений (математических ожиданий или медиан – без учета связанности выполненных измерений разными методами) выполнено с применением критерия Стьюдента и U -критерия Манна-Уитни.

Статистически значимые отличия между группами наблюдались для фетуина А при сравнении группы пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, у которых наблюдалось развитие сепсиса по сравнению с контрольной группой и с группами вирусных инфекций (пациенты с гриппом и коронавирусом).

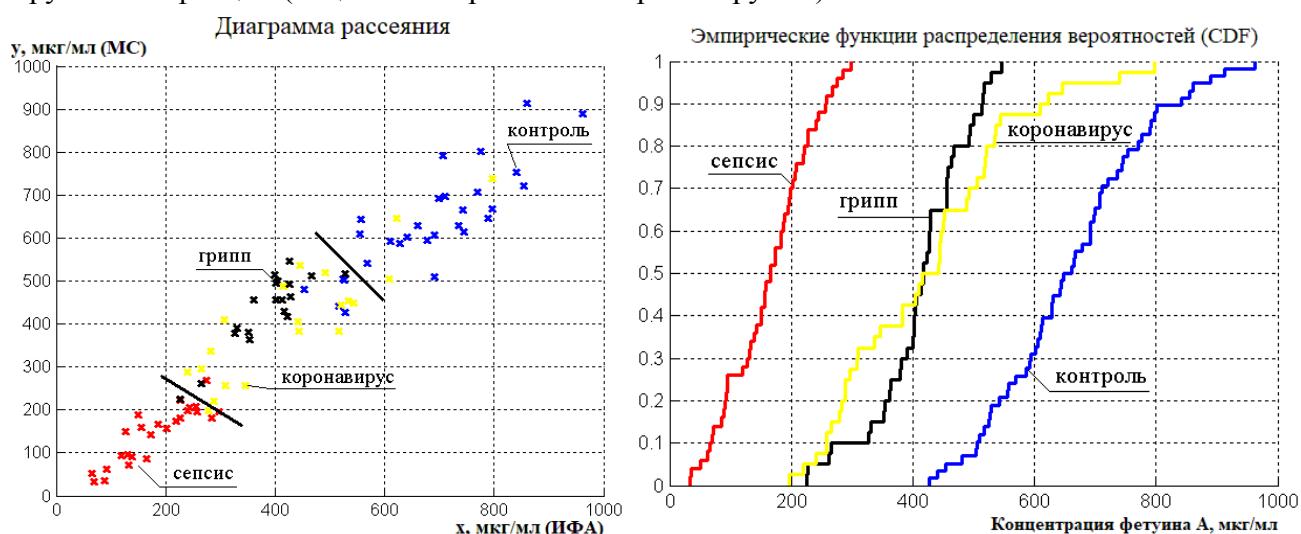


Рисунок 2.10.1 – Диаграмма рассеяния для измерений уровней фетуина А с помощью ИФА и разработанного масс-спектрометрического подхода (МС) с разбиением значений по группам (слева). x – значения концентраций, полученных с помощью иммуноферментного анализа(ИФА); y – значения, полученный с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода (МС). Эмпирические функции распределения вероятностей (CDF).

Результаты проверки гипотезы о совпадении распределений значений концентрации фетуина А для различных групп пациентов с применением критерия Лемана-Розенблатта представлены ниже. Значение статистики обозначено как ω^2 . Критическое значение статистики для критерия Лемана-Розенблатта равно $\omega_{crit}^2 = 0,461$ для уровня значимости $\alpha = 0,05$.

Значения ω^2 при сравнении различных распределений концентраций фетуина А представлены в Таблице 2.10.1 ниже. Зеленым цветом выделены пары распределений, для которых нет оснований отвергнуть гипотезу о различиях соответствующих распределений результатов измерений ($\omega^2 < \omega_{crit}^2$). Красным – пары распределений, для которых нет оснований отвергнуть гипотезу о совпадении сравниваемых распределений результатов измерений ($\omega^2 > \omega_{crit}^2$).

Таблица 2.10.1 – Значения статистики для критерия Лемана-Розенבלата.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	0,311	4,478	3,274	2,765
	Контроль	4,478	0,296	3,437	2,831
	Грипп	3,625	3,564	0,703	0,235
	Коронавирус	3,625	1,824	0,215	0,065

Сравнение центров распределений для различных групп агрегированных распределений критериями Стьюдента и U -критерия Манна-Уитни показало, что нет оснований считать совпадающими центры распределений, относящихся к пациентам с сепсисом, контрольной группе и любого инфекционного заболевания (грипп или коронавирус). При этом есть основания считать, что распределения, относящиеся к результатам измерений концентрации феутина А для пациентов с гриппом или коронавирусом, имеют одинаковые центральные значения (математические ожидания, медианы). Данные, полученные при применении метода ИФА и при помощи метода МС, были объединены (агрегированы в одно общее распределение).

Ниже в Таблице 2.10.2 и 2.10.3 приведены результаты проверки по критерию Стьюдента и по U -критерию Манна-Уитни для уровня значимости, равного 0,05 (красным отмечены значения статистики и критического значения, указывающие на различающиеся математические ожидания, а зеленым – на совпадающие математические ожидания).

Таблица 2.10.2 – Значения статистики для критерия Стьюдента.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	1,95 < 2,01	17,37 > 2,01	10,92 > 2,03	6,69 > 2,05
	Контроль	20,52 > 2,02	1,48 < 2,00	8,39 > 2,01	7,03 > 2,03
	Грипп	12,30 > 2,02	9,25 > 2,01	1,98 < 2,03	0,65 < 2,05
	Коронавирус	8,23 > 2,06	5,06 > 2,02	0,01 < 2,04	0,55 < 2,02

Таблица 2.10.3 – Результаты проверки по U -критерию Манна-Уитни для уровня значимости, равного 0,05.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	1,62 < 1,96	6,29 > 1,96	5,44 > 1,96	5,07 > 1,96
	Контроль	6,29 > 1,96	1,53 < 1,96	5,55 > 1,96	5,11 > 1,96
	Грипп	5,66 > 1,96	5,68 > 1,96	2,27 > 1,96	0,49 < 1,96
	Коронавирус	5,66 > 1,96	4,15 > 1,96	0,19 < 1,96	0,60 < 1,96

По полученным результатам измерений феутина А нет статистических оснований считать, что есть обоснованная возможность различить 3 распределения значений концентрации феутина А: при сепсисе, при инфекционных заболеваниях (грипп или коронавирус), в случае отсутствия заболеваний (контроль). При этом уровень значимости данного вывода может быть оценен лишь достаточно грубо (порядка $\alpha \leq 0,15$).

Примерные границы отсека одного физиологического состояния от другого приведены в Таблице 2.10.4.

Таблица 2.10.4 – Примерные границы отсеечения одного физиологического состояния от другого.

Группа	Границы значений концентрации Фетуина А
Сепсис	до 260мкг/мл
Инфекционные заболевания (грипп+коронавирус)	от 260 мкг/мл и до 520 мкг/мл
Контроль	свыше 520 мкг/мл

Для сывороточного амилоида А1 аналогичным способом были установлены статистически значимые отличия между контрольной и опытными группами. Для других маркеров и при сравнении других групп достоверных различий обнаружено не было.

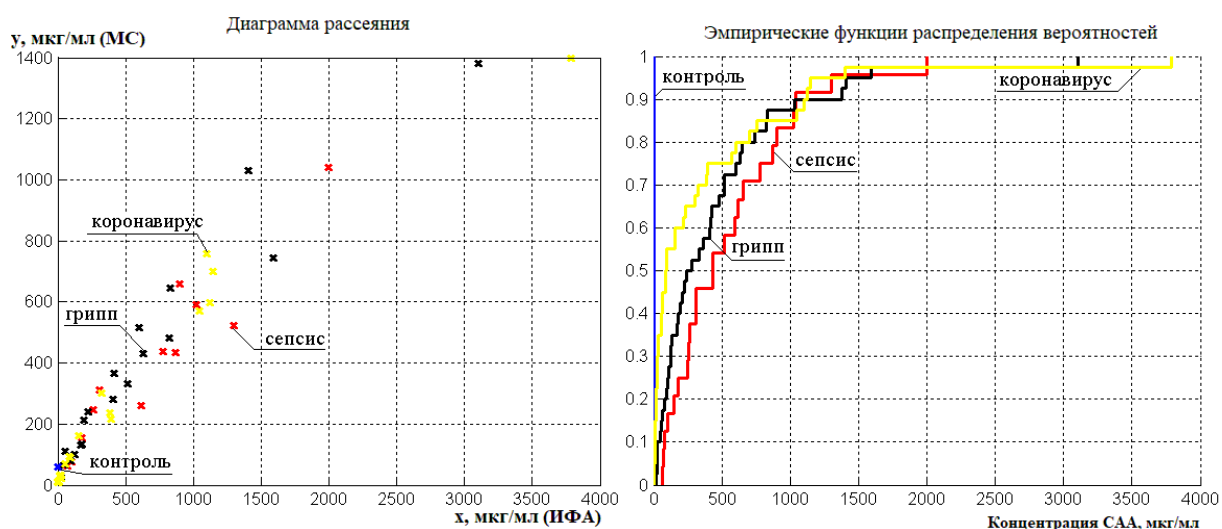


Рисунок 2.10.2 – Диаграмма рассеяния для измерений уровней САА с помощью ИФА и разработанного масс-спектрометрического подхода (МС) с разбиением значений по группам (слева). x – значения концентраций, полученных с помощью иммуноферментного анализа (ИФА); y – значения, полученный с помощью разработанного масс-спектрометрического подхода (МС). Эмпирические функции распределения вероятностей (CDF).

Результаты проверки гипотезы о совпадении распределений значений концентрации САА для различных групп пациентов с применением критерия Лемана-Розенблатта представлены в Таблице 2.10.5.

Таблица 2.10.5 – Значения статистики для критерия Лемана-Розенблатта.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	0,250	–	0,331	0,838
	Контроль	2,714	–	3,772	3,772
	Грипп	0,106	–	0,073	0,360
	Коронавирус	0,432	–	0,328	0,060

Сравнение центров распределений для различных групп агрегированных распределений критериями Стьюдента и *U*-критерия Манна-Уитни показало, что нет оснований считать совпадающими центры распределений, относящихся к пациентам в контрольной группе и пациентам с любым из рассмотренных заболеваний (сепсис, грипп или коронавирус). При этом есть основания считать, что распределения, относящиеся к результатам измерений концентрации САА для пациентов с сепсисом, гриппом или коронавирусом имеют одинаковые

центральные значения. Данные, полученные при применении метода ИФА и при применении масс-спектрометрического подхода, были объединены (агрегированы в одно общее распределение).

В Таблице 2.10.6 и 2.10.7 приведены результаты проверки по критерию Стьюдента и по U-критерию Манна-Уитни для уровня значимости, равного 0,05 (красным отмечены значения статистики и критического значения, указывающие на различающиеся математические ожидания, а зеленым – на совпадающие математические ожидания).

Таблица 2.10.6 – Значения статистики для критерия Стьюдента.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	1,65 < 2,12	–	1,84 < 2,12	2,35 > 2,12
	Контроль	4,95 > 2,20	–	4,57 > 2,09	3,34 > 2,09
	Грипп	0,95 < 2,05	–	1,13 < 2,05	1,65 < 2,05
	Коронавирус	0,44 < 2,06	–	0,60 < 2,06	1,05 < 2,06

Таблица 2.10.7 – Результаты проверки по U-критерию Манна-Уитни для уровня значимости, равного 0,05.

		МС			
		Сепсис	Контроль	Грипп	Коронавирус
ИФА	Сепсис	1,33 < 1,96	–	1,71 < 1,96	2,84 > 1,96
	Контроль	4,90 > 1,96	–	5,76 > 1,96	5,76 > 1,96
	Грипп	0,23 < 1,96	–	0,54 < 1,96	1,89 < 1,96
	Коронавирус	1,36 < 1,96	–	1,16 < 1,96	0,08 < 1,96

По полученным результатам измерений САА есть статистические оснований считать, что имеет место обоснованная возможность различить 2 распределения значений концентрации САА: при контроле и при любом из рассмотренных заболеваний (сепсис, грипп или коронавирус). При этом уровень значимости данного вывода может быть оценен лишь достаточно грубо (порядка $\alpha \leq 0,15$). Примерные границы отсечения одного физиологического состояния от другого представлены в Таблице 2.10.8.

Таблица 2.10.8 – Примерные границы отсечения одного физиологического состояния от другого.

Группа	Границы значений концентрации САА, измеренные с применением ИФА (x) или масс-спектрометрического подхода (y)	
Сепсис и вирусные инфекции	$x > 10$ мкг/мл	$y > 10$ мкг/мл
Контроль	$x < 2,0$ мкг/мл	

Отсутствие значений концентрации для САА1 группы здоровых доноров (контроль) обусловлено недостаточной чувствительностью масс-спектрометрического подхода для таких низких значений. Аналитическая чувствительность метода позволяет определять САА1 в пределах концентраций от 5 мкг/мл и выше.

Таким образом, значения концентраций фетуина А позволяет отличать группы с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей (концентрация фетуина А до 260 мкг/мл) от группы пациентов с вирусными инфекциями (концентрация фетуина А от 260 мкг/мл до 520 мкг/мл) на фоне повышенных значений сывороточного амилоида А (от 10 мкг/мл и более).

Заключение

В результате масс-спектрометрического анализа подвергнутых ферментативному гидролизу трипсином сывороток крови были идентифицированы пептиды, относящиеся к таким маркерам воспаления, как альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А. Для каждого изучаемого пептида были получены изотопно-меченые стандарты путем прямого введения изотопов ^{18}O в состав аналогичных синтезированных пептидов. В ходе предварительных экспериментов были установлены особенности протекания реакции взаимодействия трипсина с основными ингибиторами протеаз в сыворотке крови и оценена возможность дальнейшей разработки подходов количественного анализа. Для каждого из исследуемых маркеров было установлено оптимальное время ферментативного гидролиза трипсином. Мультиплексность метода достигалась путем измерения всех заявленных маркеров воспаления в одном образце с добавлением смеси стандартов в известной концентрации, однако реакцию ферментативного гидролиза необходимо было останавливать через 15 минут для измерения уровней альфа-2-макроглобулина и через 120 минут для измерения уровней фетуина А и сывороточного амилоида А. Разработанная методика масс-спектрометрической количественной оценки уровней альфа-2-макроглобулина, фетуина А и сывороточного амилоида А была верифицирована с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа, путем установления наличия регрессионной зависимости между получаемыми результатами. С помощью методов описательной статистики были определены достоверные различия в значениях измеряемых концентраций маркеров между группами пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, пациентов с гриппом и коронавирусной инфекцией и здоровыми донорами для уровней фетуина А и между контрольной и остальными группами для уровней сывороточного амилоида А.

Выводы

1. В подвергнутых ферментативному гидролизу трипсином образцах сывороток пациентов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии были достоверно идентифицированы пептиды, относящиеся к маркерам воспаления, в частности альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А.
2. Для альфа-2-макроглобулина, фетуина А и сывороточного амилоида А были отобраны пептиды VGFYESDVMGR ($MH^+=1259,6$), HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR ($MH^+=2081,0$) и FFGHGAEDSLADQAANEWGR ($MH^+=2178,0$) соответственно. Стандарты, полученные путем прямого введения изотопов ^{18}O в состав синтетических аналогов пептидов, применимы для количественной оценки концентраций исследуемых соединений.
3. В результате изучения процессов взаимодействия трипсина с основными ингибиторами сыворотки крови был установлена возможность применения особенностей протекания ограниченного протеолиза для количественной оценки уровней альфа-2-макроглобулина, фетуина А, а также уровней сывороточного амилоида А методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

4. Оптимальное время гидролиза для количественного измерения альфа-2-макроглобулина составило 15 минут, для измерения фетуина А и сывороточного амилоида А – 120 минут.
5. Разработан и верифицирован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, с применением изотопно-меченых внутренних стандартов, позволяющий количественно оценивать уровень таких биомаркеров воспаления, как альфа-2-макроглобулин, фетуин А и сывороточный амилоид А в цельной сыворотке крови без необходимости предварительного фракционирования. Продемонстрирована возможность измерения заявленных маркеров воспаления в ходе одного анализа, что обеспечивает мультиплексную количественную идентификацию с помощью разработанного подхода.
6. Совокупность маркеров воспаления, использованная в данной работе, позволяет статистически достоверно отличать группу пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей в анамнезе от группы пациентов с установленным наличием вирусных инфекций (грипп и коронавирус), а также от контрольной группы.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК

1. Протасов А.В., Тараскин А.С., Забродская Я.А., Бубляев Р.А., Новикова Л.Н., Миргородская О.А. Количественное определение ряда маркеров сыворотки крови без ее предварительного фракционирования с использованием особенностей взаимодействия трипсина с альфа-2-макроглобулином человека методом MALDI-MS // Научное Приборостроение – 2019. – Т. 29 – № 2 – С.30–43. Импакт-фактор (РИНЦ): 0,288
2. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Lebedev K.I., Lozhkov A.A., Taraskin A.S., Gyulikhandanova N.E., Ramsay E., Vasin A.V. Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens // Journal of Immunological Methods. – 2020. – Т. 478. – С. 112712. Impact Factor: 1.910

Тезисы международных и всероссийских конференций

1. Тараскин А.С., Протасов А.В., Клотченко С.А., Миргородская О.А.. Приложение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для количественной оценки маркеров системного воспаления и сепсиса в сыворотках крови человека // Площадка открытых коммуникаций “Open Bio”. Сборник тезисов. 23.10.2018 – 25.10.2018, с. 382-386.
2. Klotchenko S., Plotnikova M., Lebedev K., Taraskin A., Vasin A. Development of new multiplex diagnostic methods for sepsis // International conference “Trends in influenza research 2017”. Abstract book. 18.09.2020 – 20.09.2020, p.67-68.
3. Тараскин А. С., А.В. Протасов, О.А. Миргородская. Мультиплексный анализ факторов воспаления в сыворотке крови с применением метода MALDI-TOF масс-спектрометрии // Тезисы докладов молодежной конференции XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, 24 февраля-29 февраля 2020, с. 244-245.

Список литературы

1. Pierrakos C. Sepsis biomarkers: a review / Pierrakos C., Vincent J.-L. // Critical care – 2010. – Т. 14 – № 1 – С. R15.
2. Mancini N. Sepsis diagnostic Methods and Protocols: Method & Molecular Microbiology / N. Mancini – , 2015.– 17–31с.
3. Козьмин Ю.П. Прямое введение изотопов 18 в пептиды и белки для количественного анализа методом

масс-спектрометрии / Козьмин Ю.П., Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Миргородская О.А. // Биоорганическая химия – 2011. – Т. 37 – № 6 – С.793–806.

4. Миргородская О.А. Клиническая протеомика: новые диагностические возможности масс-спектрометрии / Миргородская О.А., Манойлов А.В., Торопыгин И.Ю., Козьмин Ю.П., Краснов Н.В., Самус Н.Л., Новиков А.В., Бубляев Р.А. // Научное приборостроение – 2008. – Т. 18 – № 4.

5. Лебедев А.Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов / Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. // М., Техносфера – 2012.

6. Toropygin I.Y. Controlled trypsinolysis of human cancer and non-cancer sera for direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / Toropygin I.Y., Mirgorodskaya O.A., Moshkovskii S.A., Serebryakova M. V., Archakov A.I. // International Journal of Mass Spectrometry – 2012. – Т. 325–327 – С.121–129.

7. Perkins D.N. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data / Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S. // ELECTROPHORESIS: An International Journal – 1999. – Т. 20 – № 18 – С.3551–3567.

8. Gettins P.G.W. Serpin structure, mechanism, and function / Gettins P.G.W. // Chemical Reviews – 2002. – Т. 102 – № 12 – С.4751–4803.

9. Blaurock N. C-terminal alpha-1 antitrypsin peptide: A new sepsis biomarker with immunomodulatory function / Blaurock N., Schmerler D., Hünninger K., Kurzai O., Ludwig K., Baier M., Brunkhorst F.M., Imhof D., Kiehntopf M. // Mediators of Inflammation – 2016. – Т. 2016.

10. Howel J.B. Interaction of α 2-macroglobulin with trypsin, chymotrypsin, plasmin, and papain / Howel J.B., Beck T., Bates B., Hunter M.J. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 1983. – Т. 221 – № 1 – С.261–270.

11. Rehman A.A. alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian / Rehman A.A., Ahsan H., Khan F.H. // Journal of cellular physiology – 2013. – Т. 228 – № 8 – С.1665–1675.

12. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии / Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. // К.: Здоров'я – 1988. – Т. 198.

13. База медицинских знаний Хеликс: Альфа-1-антитрипсин [Электронный ресурс]. URL: <https://helix.ru/kb/item/06-078>.

14. База медицинских знаний Хеликс: Альфа-2-макроглобулин [Электронный ресурс]. URL: <https://helix.ru/kb/item/06-256>.

15. THOMSEN N.K. Interaction between bovine trypsin and a synthetic peptide containing 28 residues of the bait region of human α 2-macroglobulin / THOMSEN N.K., CHRISTENSEN U., MADSEN K., SOTTRUP-JENSEN L. // European Journal of Biochemistry – 1992. – Т. 209 – № 1 – С.409–414.

16. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. / Sottrup-Jensen L. // Journal of Biological Chemistry – 1989. – Т. 264 – № 20 – С.11539–11542.

17. Протасов А.В. Количественное определение ряда маркеров сыворотки крови без ее предварительного фракционирования с использованием особенностей взаимодействия трипсина с альфа-2-макроглобулином человека методом MALDI-MS / Протасов А.В., Тараскин А.С., Забродская Я.А., Бубляев Р.А., Новикова Л.Н., Миргородская О.А. // Научное Приборостроение – 2019. – Т. 29 – № 2 – С.30–43.

18. Komsa-Penkova R.S. Fetuin-A – Alpha2-Heremans-Schmid Glycoprotein: From Structure to a Novel Marker of Chronic Diseases Part 2. Fetuin-A – A Marker of Insulin Resistance and Related Chronic Diseases / Komsa-Penkova R.S., Kovacheva K.S., Golemanov G.M., Penkov V.P., Radionova Z. V., Georgieva-Alexandrova G.B., Izmajlov A. V. // Journal of Biomedical and Clinical Research – 2020. – Т. 11 – № 1 – С.7–15.

19. Nawratil P. Limited Proteolysis of Human α 2 -HS Glycoprotein/Fetuin / Nawratil P., Lenzen S., Kellermann J., Haupt H., Schinke T., Müller-Esterl W., Jahnen-Dechent W. // Journal of Biological Chemistry – 1996. – Т. 271 – № 49 – С.31735–31741.

20. Gejyo F. Purification and characterization of the two forms of human plasma α 2HS-glycoprotein / Gejyo F., Schmid K. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure – 1981. – Т. 671 – № 1 – С.78–84.

21. Buck M. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults / Buck M., Gouwy M., Wang J., Snick J., Opdenakker G., Struyf S., Damme J. // Current Medicinal Chemistry – 2016. – Т. 23 – № 17 – С.1725–1755.

22. Jumeau C. Expression of SAA1, SAA2 and SAA4 genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages / Jumeau C., Awad F., Assrawi E., Cobret L., Duquesnoy P., Giurgea I., Valeyre D., Grateau G., Amselem S., Bernaudin J.F., Karabina S.A. // PLoS ONE – 2019. – Т. 14 – № 5 – С.1–19.

Аспирант _____ Тараскин Александр Сергеевич