

ТРУДЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
« ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ НАУКИ – МЕДИЦИНЕ »

В. Э. СЯХОВИЧ¹, О. В. ДАНИЛЕНКО¹, А. М. ШИНГЕЛЬ¹, Ю. С. БАКАКИНА¹, А. В. ЖИЛКЕВИЧ², Т. Э. ВЛАДИМИРСКАЯ², И. Э. АДЗЕРИХО², Ю. Г. ПОХОДНЯ¹

СЕЛЕКТИВНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА
ТЕНЕКТЕПЛАЗЫ В КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДХОДА «ВОТТОМ-UP»

¹ Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,
аг. Лесной, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Тканевые активаторы плазминогена (ТАП) занимают важное место в лечении неотложных состояний, вызванных тромбообразованием. По данным ВОЗ, заболевания, связанные с патологическим тромбообразованием (инфаркт миокарда, ишемический инсульт, легочная тромбоэмболия) являются одной из ведущих причин смерти. Для тромболизиса применяют как нативный человеческий ТАП, так и его мутантные варианты с измененной активностью и временем жизни в организме: теноктеплазу и ретеплазу. Разработка новых препаратов этой группы, а также новых лекарственных форм уже имеющихся, в частности, липосомальных, требует наличия в аналитической лаборатории методик специфического определения данных белков в плазме крови.

Цель. Разработать методику селективной количественной идентификации теноктеплазы в крови крыс методом протеомного анализа с использованием подхода «bottom-up».

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явился рекомбинантный фибрин-специфический активатор плазминогена Теноктеплаза. Компьютерное моделирование пептидов теноктеплазы проводили с использованием программного обеспечения Protein calculator (Thermo Scientific, США). В качестве холостых образцов использовалась плазма крови крыс. Калибровочные образцы и образцы положительного контроля качества готовились путём внесения теноктеплазы до конечного содержания 0,2-25 мкг/мл. Восстановление и алкилирование проводили с использованием набора для восстановления и алкилирования белков (Sigma, США). Ферментативный гидролиз осуществляли с помощью эндопротеазы трипсин (Sigma, США). Анализ гидролизатов теноктеплазы и биобразцов проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 (2,1×150 мм, размер частиц 5 мкм) (Thermo Scientific, США).

Результаты. В ходе выполнения исследовательской работы проведено моделирование пептидов теноктеплазы, образующихся в результате протеолиза трипсином. Осуществлена оптимизация подготовки образцов к ферментативному гидролизу, а также процедуры гидролиза. Изучено влияние матрицы на степень гидролиза и масс-спектрометрическую детекцию пептидов целевого белка, а также влияние детергента на прохождение триптического гидролиза и воспроизводимость результатов количественного определения теноктеплазы.

Проведен анализ спайковых образцов с различной концентрацией теноктеплазы с целевым MS/MS-распадом выбранных специфических пептидов белка (SYQVICR и QYSQPQFR). Выбраны пары ионов, которые в дальнейшем будут использованы для детекции теноктеплазы в образцах плазмы крови: m/z 527,2592 (+2) → m/z 547,29870, m/z 463,2316 (+2) → m/z 547,30208. Осуществлен подбор оптимальных хроматографических и масс-спектрометрических параметров идентификации теноктеплазы в плазме крови крыс. Построены калибровочные кривые и подобран способ обсчета данных, полученных при определении ТАП в крови (квадратичная зависимость с весовыми коэффициентами $1/x^2$).

Оценены основные аналитические характеристики количественного определения ТАП в крови: избирательность (специфичность), рабочий диапазон, предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность, наличие переноса аналита, робастность. Подтверждено, что методика воспроизводима в условиях лаборатории и результаты испытаний с ее использованием достоверны.

Заключение. Проведенные исследования с использованием подхода протеомики «bottom-up» позволили разработать методику селективной количественной идентификации тканевого активатора плазминогена Теноктеплаза в крови крыс, которая в дальнейшем будет использована для изучения параметров фармакокинетики локальной системы доставки ТАП при лечении острого венозного тромбоза в эксперименте.