

На правах рукописи

**МАНОЙЛОВ АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОТОПОМЕРОВ  
БЕЛКОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ**

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2012

Работа выполнена в лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института  
аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор  
**Курочкин Владимир Ефимович**, директор ИАП РАН

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор  
**Галль Николай Ростиславович** (Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Физико-Технический Институт им. А.Ф. Иоффе  
Российской академии наук)

Доктор химических наук, профессор  
**Поваров Владимир Глебович** (Федеральное государственное  
бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального  
образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,  
химический факультет)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский  
государственный политехнический университет», факультет медицинской  
физики и биоинженерии

Защита состоится 21 марта 2013 г в 15:00 на заседании диссертационного  
совета Д.212.232.37 по защите докторских и кандидатских диссертаций при  
Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-  
Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43, БХА.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Санкт-  
Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан « » декабря 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.ф.-м.н.



В.В. Панчук

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Определение концентрации пептидов и белков – целевых продуктов при производстве лекарственных препаратов, диагностических наборов, реагентов для биохимических исследований – является актуальной задачей. В последние годы для определения концентрации белков, помимо традиционных методов анализа, успешно используются масс-спектрометрия. Это произошло после внедрения в практику мягких методов ионизации электроспреей (ESI-MS) и матричной лазерной десорбционной ионизации (МЛДИ, MALDI). Сегодня по достоверности идентификации и точности определения масс масс-спектрометрии нет равных. Тем не менее, при проведении количественных измерений белков в биопробах имеются трудности. Они связаны с тем, что интенсивности сигналов могут не соответствовать даже относительным концентрациям соединений, а абсолютные интенсивности – не воспроизводиться. В то же время, интенсивности изотопных распределений воспроизводятся хорошо и, более того, соответствуют теоретически рассчитанным соотношениям.

Именно этот факт используют в количественной масс-спектрометрии. Обычно для каждого анализируемого соединения применяют его изотопно-меченый аналог, называемый изотопомером. Он идентичен анализируемому соединению по химической структуре, но отличается изотопным составом.

Существуют три группы традиционных способов получения изотопомеров: метаболический, химический и ферментативный. Первый способ подразумевает добавление в питательную среду аминокислот, меченных стабильными изотопами D,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и  $^{18}\text{O}$ . Химический способ подразумевает использование модифицированного аналога анализируемого соединения в двух формах: первую – с природным изотопным составом (аналит), вторую – химически идентичную первой, но содержащую различные изотопы, такие как дейтерий, углерод  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  или кислород  $^{18}\text{O}$ . Третьим способом подразумевает проведение ферментативного гидролиза в присутствии воды  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Таким образом получают пептидные фрагменты белка с изотопно-меченой карбоксильной группой. Их смешивают с аналогичным набором пептидных фрагментов белка с природным изотопным составом. Все перечисленные способы введения метки успешно применяют в практике, но они не свободны от различных недостатков.

А именно, метаболический способ нельзя применять для анализа биологических жидкостей (он подходит только для исследований *in vivo*).

Химический и ферментативный способы сопровождаются изменением структуры белка, что может существенно повлиять на его свойства. Кроме того, существующие коммерческие наборы, которые обеспечивают количественный масс-спектрометрический анализ, – достаточно дороги, не являются универсальными и рассчитаны лишь на ограниченный список конкретных соединений.

Таким образом, поиск способа получения изотопомеров белков без нарушения их химической структуры является актуальной задачей.

### **Цель и задачи работы**

Целью диссертационной работы была разработка способа масс-спектрометрического определения концентрации индивидуальных белков без нарушения их химической структуры.

Для достижения цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать способ получения стабильных изотопомеров белков и пептидов без нарушения их химической структуры.
2. Изучить процесс дезамидирования остатков аспарагина и глутамина в условиях изотопного обмена.
3. Разработать подходы для масс-спектрометрического определения концентрации индивидуальных белков с использованием предложенного нового способа получения изотопомеров путем проведения модельных экспериментов.
4. Разработать схемы масс-спектрометрического определения концентрации индивидуальных белков сыворотки крови: альбумина,  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина, а также – активности стрептокиназы в коммерческих лекарственных препаратах для апробации предложенного нового способа получения изотопомеров.

### **Научная новизна**

1. Предложен способ масс-спектрометрического определения концентрации индивидуальных белков с использованием стабильных изотопомеров.
2. Разработан новый способ получения стабильных изотопомеров пептидов и белков без разрушения пептидных связей, основанный на обмене кислорода  $^{16}\text{O}$  на  $^{18}\text{O}$  в карбоксильных группах этих соединений в воде  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии трифторуксусной кислоты (TFA).
3. Показано, что изотопную метку можно вводить на любой стадии пробоподготовки – как до триптического гидролиза, так и после.

### **Практическая значимость работы**

1. Предложенный способ получения изотопомеров является универсальным решением для любых пептидов, белков, а также их смесей. Аминокислотные остатки, которые подвергаются обмену (Asp и Glu), присутствуют практически во всех белках, к тому же в любых неамидированных пептидах есть С-концевая карбоксильная группа.
2. Разработаны схемы количественного определения белков сыворотки крови, а также ряда белков, содержащихся в лекарственных препаратах.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Новый способ получения стабильных изотопомеров пептидов и белков, заключающийся в обработке образца водой  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии трифторуксусной кислоты при нагревании.

2. Скорости дезамидирования остатков аспарагина и глутамина в условиях изотопного обмена.
3. Схема проведения масс-спектрометрического определения концентрации белков с помощью нового способа получения изотопомеров.
4. Схемы масс-спектрометрического определения концентрации белков альбумина,  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина в сыворотке крови, а также – активности стрептокиназы в лекарственных препаратах, содержащих стрептокиназу.

### **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Представленные в диссертационной работе результаты прямых и косвенных измерений получены с использованием независимых физико-химических методов исследования, таких как количественная высокоэффективная жидкостная хроматография, количественная масс-спектрометрия, УФ-спектроскопия. Каждое измерение повторяли от 3-х до 7-ми раз. При определении концентрации белков по триптических пептидам получалось до 20-ти триптических пептидов смеси аналита и его изотомера. На основании определения соотношения анализируемого образца и стандарта некоторого количества триптических пептидов (не менее 3-х) получался результат с достоверностью 95%.

### **Личный вклад автора**

Изначально идея введения изотопной метки с использованием трифторуксусной кислоты была высказана и опробована доктором химических наук О.А. Миргородской. Но до начала работы автора публикаций, описывающих способ введения метки, изложенный в положении 1, не было. Все эксперименты, проведенные в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии Учреждения Российской академии наук Института аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), выполнены автором лично. Полученные масс-спектрометрические данные обрабатывались автором лично. Помимо этого, проделанные эксперименты на приборе с ионизацией «электроспрей» повторены О.А. Миргородской на приборе Bruker Ultraflex с ионизацией MALDI (Институт биомедицинской химии РАМН, Москва). Также в рамках данной работы предложены и апробированы алгоритмы для расчета соотношения аналита и внутреннего стандарта на основе масс-спектра смеси. Автор алгоритмов – к.ф.-м.н. Козьмин Ю.П. Постановка задач и обсуждение результатов проводилась автором совместно с О.А. Миргородской.

### **Апробация работы**

Работа апробирована на четырех конференциях, в том числе на 18-той международной масс-спектрометрической конференции 2009 года в Г. Бремен и V-м международном научном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», в 2009-м году в Москве. Работа поддержана грантом

4/04.05/035 для студентов, аспирантов вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

### **Публикации**

Разработанный новый способ получения изотопомеров защищен патентом РФ с приоритетом от 13.02.2008. Основные результаты работы опубликованы в четырех научных статьях, в журналах, входящих в перечень ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав, раздела «Материалы и методы», заключения и списка литературы, состоящего из 89 источников. Материал содержит 116 страниц, 38 рисунков и 13 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обосновывается актуальность темы диссертационной работы, формулируется научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также приводятся основные положения, выносимые на защиту. В конце раздела формулируются цель и задачи диссертации.

### **Глава 1. Обзор литературы по теме исследования**

Обзор литературы состоит из 5-ти разделов. В первом разделе приведено описание методов ионизации в масс-спектрометрии ESI и MALDI, второй раздел посвящен обзору существующих к настоящему времени способов введения изотопной метки для масс-спектрометрического определения концентрации белков. Третий раздел посвящен описанию процесса дезамидирования остатков аспарагина и глутамина: приведены схема дезамидирования и скорости его протекания в различных средах. В четвертом разделе описано строение и свойства белков сыворотки крови, определение концентраций которых проделано в настоящей работе. В пятом разделе главы 1 сформулированы цель и перечислены задачи работы.

### **Материалы и методы**

В данном разделе охарактеризованы реактивы, использованные в работе; характеристики пептидов и белков приведены в виде таблицы. В ней отображены названия, моноизотопные молекулярные массы, первичная структура и количество карбоксильных групп. Далее приведено описание приборов, на которых проводили анализ. Описаны стандартные методики, использованные в работе.

**Глава 2. Получение изотопно-модифицированных пептидов и белков для масс-спектрометрического определения их концентрации.**

До начала настоящей работы в публикации [1] была продемонстрирована возможность получения подходящих  $^{18}\text{O}$ -меченых внутренних стандартов для

ряда аминокислот, путем обмена с водой  $H_2^{18}O$  в кислой среде. На примере аминокислот Lys, Arg, His, Phe и Tyr было показано, что при их инкубации в воде  $H_2^{18}O$  в присутствии 20% TFA при 20°C в течение 5-7 дней (или 8 часов при 100°C) в карбоксильных группах обменивалось более 75%  $^{16}O$  на  $^{18}O$ . Однако использованные в [1] процедуры оказались разрушительными для пептидов и белков. При выдерживании их в указанных выше условиях происходил разрыв пептидных связей. В то же время, получение изотопомеров белков и пептидов расширяет набор белков, концентрацию которых можно определить с помощью масс-спектрометрии.

Для экспериментальной оценки возможности введения  $^{18}O$  в карбоксильные группы был использован пептид D-Ala<sup>2</sup>,Leu<sup>5</sup>,Arg<sup>6</sup>-энкефалин (даларгин) со структурой YAGFLR. На Рисунке 1 приведен масс-спектр этого пептида до и после обмена.

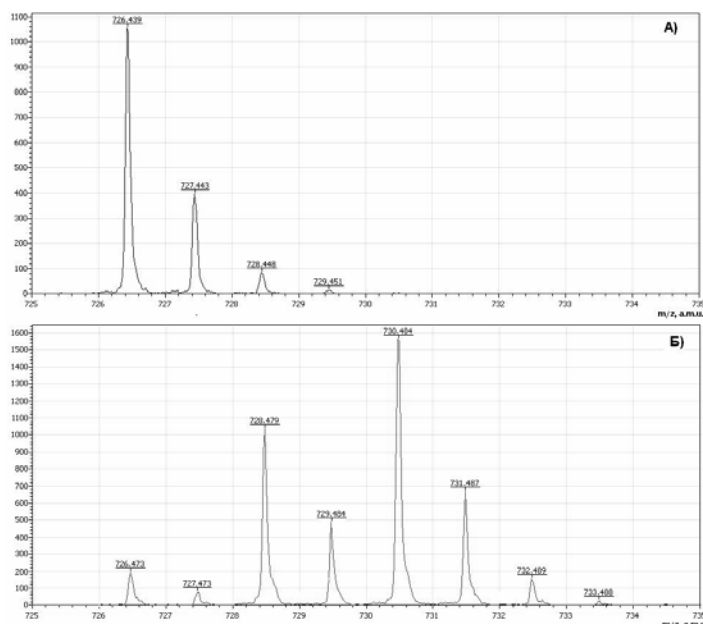


Рисунок 1. ESI-масс-спектр пептида даларгина до обмена (А) и после обмена в течение 180 мин при температуре 50°C в 8.2% TFA (Б).

Обмен природного изотопа кислорода на кислород  $^{18}O$  происходит в трех типах карбоксильных групп – С-концевой, а также – в карбоксильных группах боковой цепи аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот. В случае если модифицируется одна карбоксильная группа, как на Рисунке 1, происходит увеличение массы соединения до 4-х Дальтон. Прежде всего, следует ввести понятие степени включения метки ( $n^{18}O$  или  $n(18)O$ ). Понятие  $n(18)O$  является суммой содержания форм с одним, двумя, тремя и так далее атомами  $^{18}O$ . Значение  $n(18)O$  может быть вычислено по формуле:

$$n^{18}O = \sum_{i=1}^n i * \frac{I_{2i+1}}{\sum_{i=0}^n I_{2i+1}}, (1)$$

где  $I$  – интенсивность сигнала, а  $i$  – номер сигнала.

В настоящей работе оценена скорость обмена в зависимости от концентрации ТФУ и температуры. Контроль за изотопным обменом осуществляли с использованием ESI-MS. В качестве модельного пептида

использовали также даларгин. Кроме этого, с помощью масс-спектрометрии контролировали наличие возможных продуктов гидролиза.

Для получения зависимости скорости изотопного обмена, как от температуры, так и от кислотности среды, величины  $n(^{18}\text{O})$  были рассчитаны для каждого образца, см. Рисунки 2 и 3.

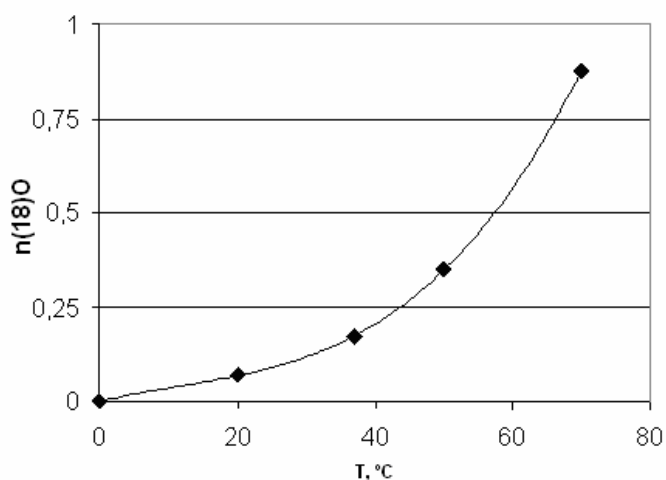


Рисунок 2. Зависимость степени включения  $^{18}\text{O}$  в даларгин за 30 мин в 8.2% ТФУ от температуры

На основании полученных данных для пептидов с С-концевыми карбоксильными группами можно выбрать подходящие условия получения стандартов с достаточной степенью обмена для проведения эксперимента. Анализируя полученные графики, можно сказать, что оптимальными условиями введения изотопа  $^{18}\text{O}$  является температура  $50^\circ\text{C}$  и  $\text{pH}$  0.5 (трифторуксусная кислота с концентрацией 8.2% или 0.74 М). При повышении температуры и концентрации кислоты скорость обмена возрастает незначительно, но при этом может происходить разрыв пептидных связей.

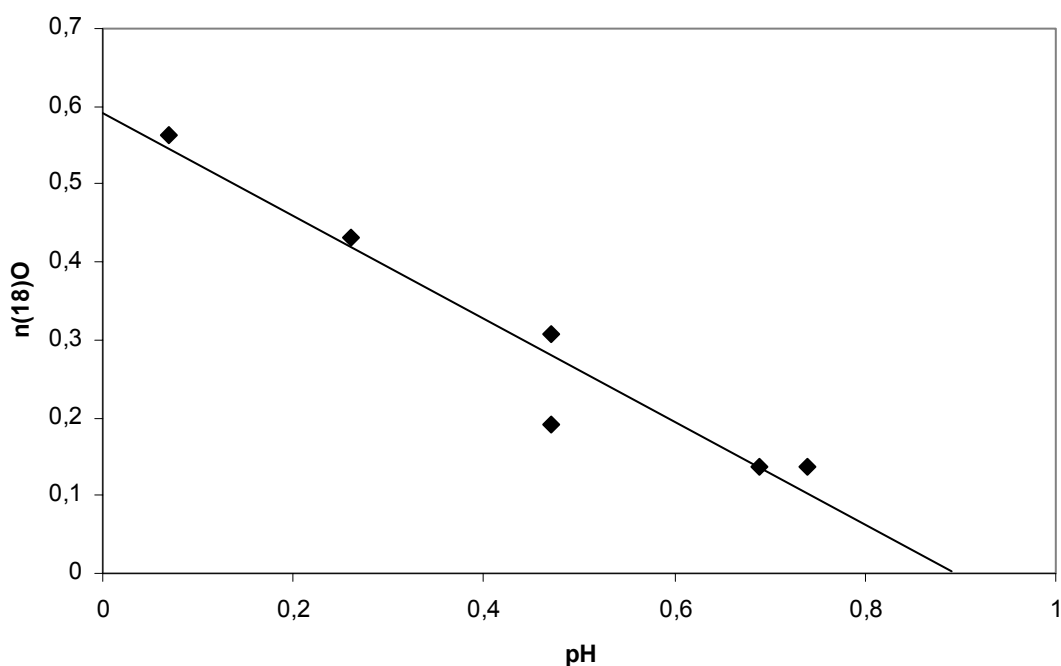


Рисунок 3. Зависимость степени включения  $^{18}\text{O}$  в даларгин от pH раствора при температуре  $50^\circ\text{C}$  за 30 мин.



В специальных экспериментах оценена стабильность полученных изотопомеров в средах, наиболее часто используемых при работе с образцами в биохимических и других экспериментах, например при ВЭЖХ. Проведен эксперимент, в рамках которого исследовали зависимость величины  $n(^{18}\text{O})$  изотопомера пептида ангиотензина II в различных средах от времени при комнатной температуре. Результаты, а также описание сред, представлены на Рисунке 4 в виде диаграмм. Погрешность составила 5-8%, как видно из доверительных интервалов.

Из полученных данных следует, что полученные изотопомеры – достаточно стабильны в широком диапазоне pH, в том числе при типичных условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используемой для разделения пептидов и для ESI-MS при обессоливании образцов.

Для получения практически всех необходимых изотопомеров пептидов в работе использовали ТФУ с концентрацией 8.2% (0.74 М) и  $T = 50^\circ\text{C}$ , время для разных образцов выбирали экспериментально по результатам масс-спектрометрического анализа. В связи с тем, что в этих условиях хотя и сохранялись пептидные связи, можно было ожидать частичное дезамидирование.

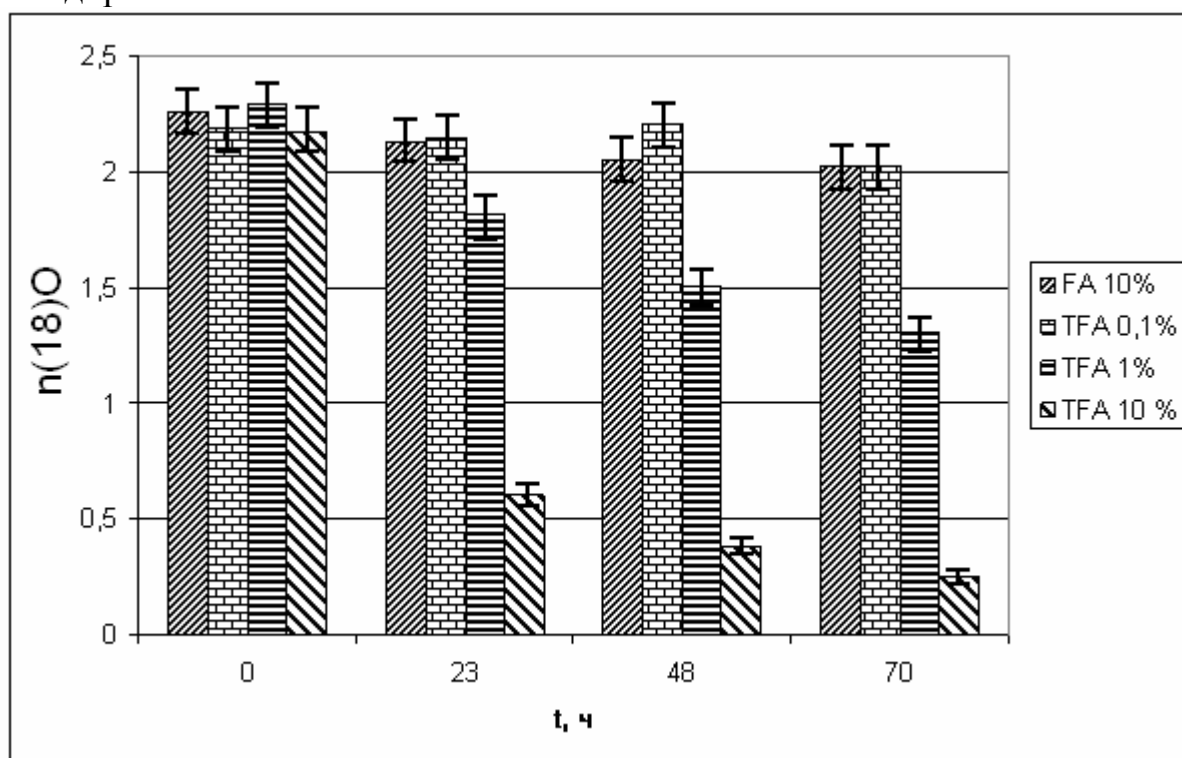


Рисунок 4. Зависимость степени включения метки  $^{18}\text{O}$  в различных средах от времени. FA – муравьиная кислота, TFA – трифторуксусная кислота,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

В работе проведено измерение скорости дезамидирования остатков аспарагина и глутамина в условиях изотопного обмена. В результате эксперимента получены константы скорости первого порядка дезамидирования

остатков аспарагина и глутамина. Константа скорости дезамидирования остатка аспарагина составила  $0.031 \pm 0.005 \text{ ч}^{-1}$ , остатка глутамина –  $0.108 \pm 0.017 \text{ ч}^{-1}$ . Эти константы скорости позволят определить степень превращения амида в кислоту во время получения изотопомера. В образующихся кислотах Asp и Glu может также проходить изотопный обмен.

Совокупность полученных данных позволяют предложить следующий механизм обмена (Рисунок 5):

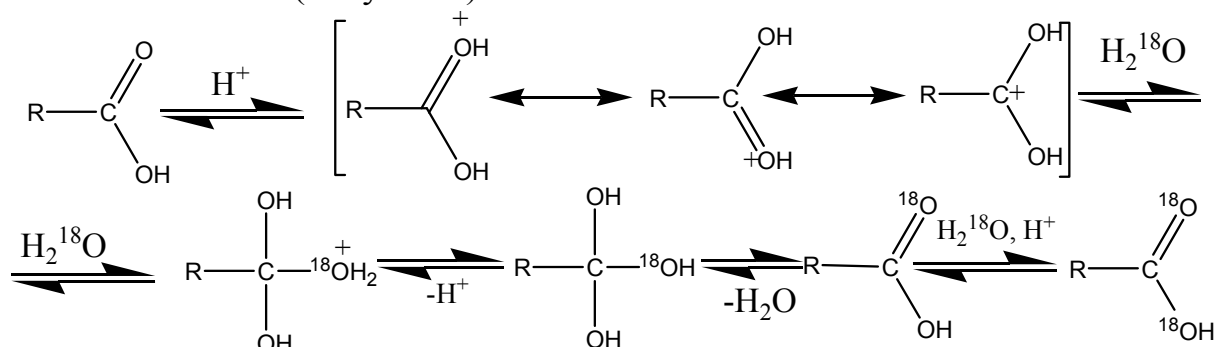


Рисунок 5. Предполагаемый механизм изотопного обмена.

Сначала происходит протонирование карбоксильной группы, после чего образуется ковалентная связь C-<sup>18</sup>O и уход группы OH. Присоединение второго атома кислорода <sup>18</sup>O происходит аналогичным образом. Следует также сказать, что все процессы, протекающие при обмене, являются обратимыми.

При повышении кислотности среды скорость изотопного обмена, как прямого, так и обратного, возрастает. Отсюда следует, что лимитирующей стадией изотопного обмена является протонирование карбоксильной группы.

Таким образом, разработан новый способ введения стабильной изотопной метки в белки и пептиды для определения их концентрации в биологических объектах. Это является решением задачи № 1. Главными достоинствами предлагаемого способа являются:

- а) метод прост в осуществлении и требует 0.5–4 часа времени. Степень введения метки можно легко контролировать масс-спектрометрическим анализом (отобрать аликвоту из реакционной среды и провести масс-спектрометрический анализ). При необходимости процесс может быть остановлен разбавлением с последующим испарением летучих компонентов;
- б) этот метод не требует химической модификации анализируемого образца и не загрязняет пробу посторонними примесями (тяжелая вода и TFA легко удаляются испарением). Это позволяет получать количественные данные, не нарушая протекания процессов, характерных для немодифицированного образца, в том числе не изменяется их хроматографическая и электрофоретическая подвижность;
- в) метка стабильна в водных растворах при широком диапазоне pH и достаточно устойчива в биологических тканях, этот способ введения метки может быть использован для изучения кинетики метаболизма и ферментативной активности *in vivo*;
- г) карбоксильные группы, по которым идет обмен, достаточно часто встречаются в природных белках. По этой причине этот метод определения

концентрации белков применим к любым карбоксилсодержащим соединениям.

Для определения концентрации белка аналит (биопробу) смешивают с его изотопомером (стандартом). Возникает вопрос, при каком их соотношении целесообразно проводить анализ. Для этого провели специальный эксперимент. Пептид ангиотензин II (DRVYIHPF) смешивали с его изотопомером в разных соотношениях. Содержание стандарта составляло от 0 до 100% с шагом 10% (помимо этого добавлены точки с содержанием стандарта 5 и 95%). После чего с помощью масс-спектрометрии определяли реальное содержание стандарта в полученных смесях. Далее строили зависимость содержания стандарта, вычисленного в результате эксперимента, от заданного. Получилась прямая вида  $y = ax + b$  с определенным разбросом. Отклонение коэффициента  $a$  от единицы, а  $b$  от нуля свидетельствует о погрешности результатов проведенного эксперимента. В результате обработки экспериментальных данных получены коэффициенты  $a$  и  $b$ .

Коэффициенты  $a$  и  $b$  определяли на основании формул 2–4:

$$Z = n\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2, (2)$$

$$a = (\sum y_i \sum x_i^2 - \sum y_i x_i \sum x_i) / Z, (3)$$

$$b = (n\sum y_i x_i - \sum y_i \sum x_i) / Z. (4)$$

В результате расчетов определены коэффициенты  $a$  и  $b$ :  $a = 1.02 \pm 0.02$ ,  $b = 0.06 \pm 1.70$ .

Полученную прямую (Рисунок 6) разделили на 3 участка по содержанию стандарта: 1. от 0 до 20%; 2. от 30 до 70%; 3. от 80 до 100%. Среднеквадратичное отклонение на каждом участке (СКО) вычисляли по формуле (5):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n(n-1)}}, (5)$$

где  $y_i$  – вычисленное значение константы скорости,  $\bar{y}_i$  – среднее значение константы скорости,  $n$  – количество экспериментов.

В результате расчета СКО на каждом из участков графика оказалось, что при соотношении аналита и стандарта 1:1 ошибка составляет 1.8%, при содержании аналита 30% относительная ошибка определения составляет 3.0%, а при содержании аналита 10% относительная ошибка определения равна 16.2%; 5% – 32.4%. Таким образом, при содержании аналита в смеси со стандартом от 30 до 70% относительная ошибка определения не превышает 5%, что допустимо при проведении биохимических экспериментов.

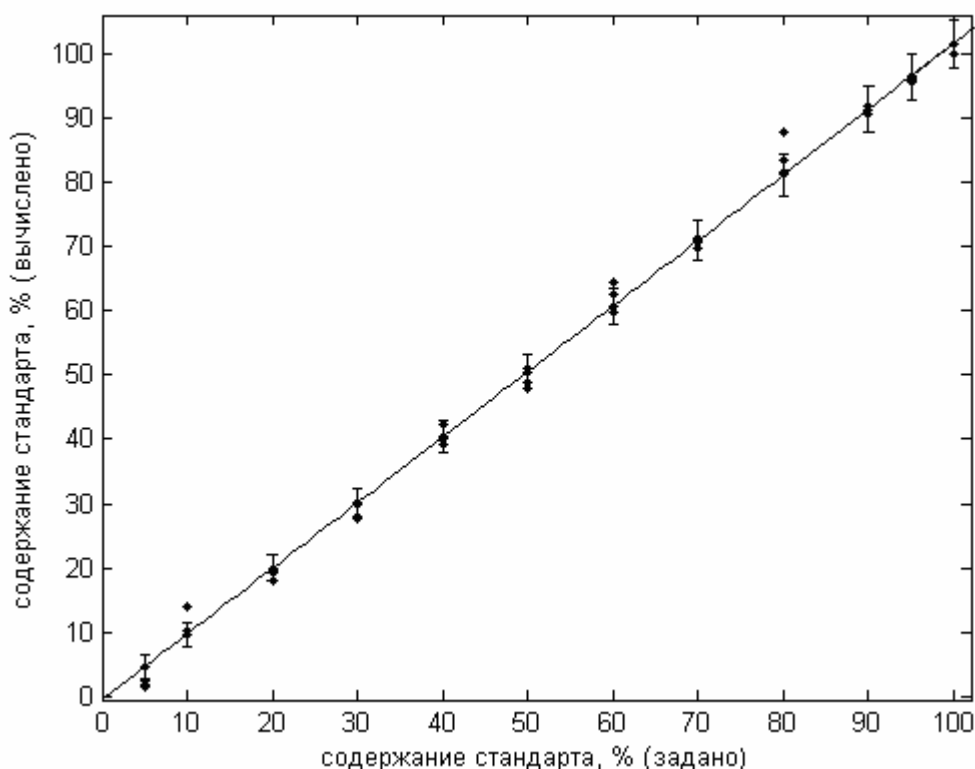


Рисунок 6. Зависимость содержания изотомера, вычисленного в результате эксперимента, от заданного в смеси природного пептида ангиотензина II (DRVYIHPF) и его изотомера при разных соотношениях.

### Глава 3. Практическое использование изотопомеров

#### 3.1. Схемы масс-спектрометрического определения концентрации белков

Помимо простых пептидов, изотопная метка может быть успешно введена и в высокомолекулярные соединения, такие как полипептиды и белки. Введение изотопа  $^{18}\text{O}$  в полипептиды и белки не имеет принципиальных отличий от введения их в пептиды. Однако в связи с высокими значениями молекулярных масс полипептидов и белков и их широким изотопным распределением, вводится дополнительная стадия ферментативного гидролиза (обычно, трипсинолиза). Это обеспечивает достаточное разрешение и точность измерения  $m/z$  для сигналов, относящихся к анализируемому соединению и внутреннему стандарту. Кроме того, знание значений  $m/z$  продуктов трипсинолиза обеспечивают дополнительный контроль при идентификации, необходимый для анализа интересующего объекта в смесях. Разнообразие продуктов трипсинолиза позволяет также выбирать среди них продукты с большим числом карбоксильных групп, которые более удобны для высокоточного определения концентрации цельных белков в биологических образцах.

В работе рассмотрены два альтернативных пути введения изотопной метки при определении концентрации белков, отличающиеся порядком проведения стадий обмена и гидролиза.

В первом случае обмену с водой  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  подвергают продукты триптического гидролиза, в то время как сам гидролиз проводят отдельно для анализируемой пробы и внутреннего стандарта образца. При этом введение

метки происходит во все пептиды гидролизата – не только по карбоксилсодержащим аминокислотам, но и по С-концевым карбоксильным группам.

Во втором случае обмену с  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  подвергают индивидуальные белки или их природную смесь, а затем полученное изотопно-меченое соединение смешивают с анализируемой пробой. Все последующие стадии обработки, включая трипсинолиз, проба и внутренний стандарт проводят совместно в виде одной смеси. При этом мечеными окажутся не все пептиды гидролизата, а только те из них, которые содержат в своем составе остатки карбоксилсодержащих аминокислот (Asp и Glu). Однако это ограничение не принципиально, поскольку почти всегда среди продуктов гидролиза удастся найти пептид, подходящий для определения концентрации цельного белка.

Каждый из этих путей имеет свои достоинства и недостатки, что порождает проблему выбора в зависимости от конкретной задачи. Введение метки непосредственно в анализируемые белки обладает тем преимуществом, что обеспечивает полную идентичность протекания трипсинолиза для каждого компонента пары. При определении концентрации белков в биопробах, в случае, когда необходимо проходить стадии разделения и очистки (например, электрофореза или хроматографии), сопровождающихся неминуемыми количественными потерями, этот путь становится фактически безальтернативным.

Схема определения концентрации белков и полипептидов, базирующаяся на прямом введении в них изотопной метки, сводится к осуществлению следующих стадий:

1. получение внутреннего стандарта с помощью обмена с  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в кислой среде;
2. предобработка анализируемой пробы в аналогичных условиях, но в присутствии обычной воды;
3. объединение внутреннего стандарта и обработанного таким же образом образца для обеспечения идентичности протекания всех последующих стадий обработки. Для повышения точности определения концентрации белков желательно приготовить такие смеси в разных соотношениях, чтобы в анализируемой пробе интенсивности сигналов вещества и внутреннего стандарта были соизмеримыми;
4. трипсинолиз смеси;
5. фракционирование смеси пептидов с помощью ВЭЖХ (при использовании масс-спектрометра с ионизацией «электроспрей»);
6. масс-спектрометрический анализ гидролизатов;
7. обработка результатов с помощью специальной компьютерной программы, разработанной в рамках данной работы.

На Рисунке 7 приведен пример количественного масс-спектрометрического анализа белков по их триптическим пептидам с использованием приведенной выше схемы на примере альбумина в сыворотке крови человека.

Среди ряда методов, применяемых для анализа, масс-спектрометрия с использованием изотопомеров обладает важным преимуществом, поскольку не требует предварительного фракционирования и при этом обеспечивает определение концентрации именно этого белка, т.к. анализ осуществляется по триптическим пептидам, исключительно относящихся к альбумину. Кроме того, каждое измерение концентрации белка с использованием его изотопомера повышает точность измерения по мере увеличения количества повторов эксперимента.

С использованием предложенного способа получения изотопомеров проведено определение концентрации альбумина человека в сыворотке крови для десяти образцов сыворотки крови. В результате оказалось, что образцы сыворотки крови с диагностированной патологией рака яичника имеют пониженную концентрацию альбумина по сравнению с нормой. Это соответствует выводам работы [2]. Действительно при некоторых видах рака концентрация альбумина понижена по сравнению с нормой.

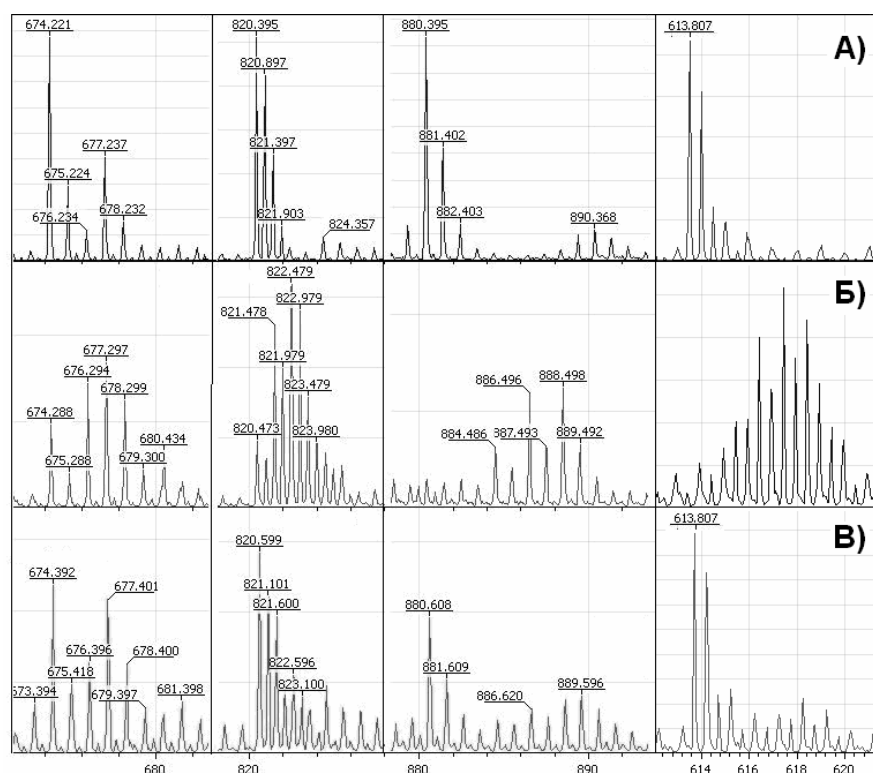


Рисунок 7. Масс-спектры триптических пептидов альбумина. А) Исходный образец. Б) Полученный изотопомер, В) Их эквимоллярная смесь. Слева направо: TPVSDR ( $MH^+ = 673.2$ ), KVPQVSTPTLVEVSR ( $MH^+ = 1639.9$ ), AEFAEVSK ( $MH^+ = 880.4$ ), FKDLGEENFK ( $MH^+ = 1226.6$ ).

В данном примере практического применения изотопомеров следует отметить продемонстрированные две новые возможности. Во-первых, возможность осуществлять анализ без фракционирования в такой многокомпонентной среде как сыворотка крови. Во-вторых, большие перспективы использования изотопомеров для анализа функциональных белков, регулирующих протеолиз. Для стрептокиназы это – способность

активировать плазминоген, которую определяли внесением изотопомера в качестве продукта, образующегося при определении эстеразной активности комплекса. Этот же подход успешно использован и для определения концентрации других функциональных белков в сыворотке крови человека –  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ -АИ) и  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ М). С использованием изотопомера N-(тозил)-аргинина (ТА) из определения эстеразной активности этих белков, являющиеся маркерами при диагностике ряда патологий, были измерены концентрации этих двух белков в 20 образцах сыворотки крови. В качестве субстрата использовали метиловый эфир N-(тозил)-аргинина (ТАМЕ). Все указанные возможности обеспечиваются тем, что полученные изотопомеры – достаточно устойчивы в биологических средах.

### **3.2. Определение активности стрептокиназы**

В работе продемонстрированы возможности использования масс-спектрометрии для сравнительного анализа лекарственных препаратов содержащих белковый активатор плазминогена – стрептокиназу от разных производителей: Стрептокиназа “Белмедпрепараты”, Беларусь (Стр-Бел); Стрептокиназа “KabiVitrum”, Швеция (Стр-К) и Стрептокиназа “Behring Werke”, Германия (Стр-BW). Для всех препаратов определена их функциональная активность. Она определена на основе их способности активировать плазминоген при воздействии на сыворотку крови человека и появлению способности активированного стрептокиназой в эквимольных соотношениях плазминогена гидролизовать субстрат ТАМЕ. Начальная скорость гидролиза этого субстрата также оценивалась масс-спектрометрически по образованию продукта реакции ТА, изотопомер которого был получен также путем изотопного обмена в  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  в присутствии ТФА. Результаты анализа представлены в таблице 1.

Из полученных данных следует, что наименьшей активностью обладает препарат Стр-Бел, хотя по данным, указанным на флаконе, она – максимальная из трех. Этот результат соответствует выводам работы [3], в которой отмечались значительные различия активности препаратов стрептокиназы от декларируемой, что может быть связано с ее лабильностью, как в процессе получения, так и хранения, и необходимостью контроля ее активности перед использованием.

Удельная активность препаратов стрептокиназы

№	Препарат	D280*, О. Е.		Активность стрептокиназы, у.е.**, n=4
		измерен.	вычисл.	
1	Стр-Бел	0.27±0.04	0.27±0.04	0.010±0.001
2	Стр ВW	0.14±0.02	0.14±0.02	0.11±0.01
3	Стр-К	0.22±0.03	0.22±0.03	0.15±0.02

\*В растворе концентрацией 1 мг/мл

\*\* 1 у.е. = 1 мкмоль ТАМЕ/(1 мг препарата\*1 мин)

В разделе **заключение** приведено резюме всей работы, выявлены аспекты по практической значимости работы.

### Основные результаты и выводы

1. Предложен способ введения изотопной метки, позволяющий в лабораторных условиях получать изотопомеры любых белков и пептидов без нарушения их химической структуры. Он заключается в обработке образца водой  $H_2^{18}O$  в присутствии трифторуксусной кислоты при нагревании.
2. Определены скорости дезамидирования остатков аспарагина и глутамина. Константа скорости дезамидирования остатка аспарагина составила  $0.031 \pm 0.005 \text{ ч}^{-1}$ , остатка глутамина –  $0.108 \pm 0.017 \text{ ч}^{-1}$ . Эти константы скорости позволят определить степень превращения амида в кислоту во время получения изотопомера. В образующихся кислотах Asp и Glu может также проходить изотопный обмен.
3. Разработаны методические подходы для масс-спектрометрического определения концентрации белков в биологических объектах. Таким образом, расширен класс анализируемых белков. Показано, что изотопную метку можно вводить на любой стадии пробоподготовки – как до триптического гидролиза, так и после.
4. Разработаны новые схемы масс-спектрометрического определения концентрации белков сыворотки крови: альбумина,  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина, а также – активности стрептокиназы в лекарственных препаратах, содержащих стрептокиназу.

### Список публикаций по теме диссертации

- 1 Бубляев Р.А., Козьмин Ю.П., Краснов Н.В., Манойлов А.В., Миргородская О.А., Новиков А.В. Способ получения изотопно-модифицированных пептидов и белков // Патент РФ. RU № 2399627, с приоритетом от 13.02.2008.



2 Манойлов А.В., Новиков А.В., Бубляев Р.А., Серебрякова М.В., Козьмин Ю.П., Краснов Н.В., Миргородская О.А. Особенности включения стабильного изотопа  $^{18}\text{O}$  в сильноокислой среде в карбоксильные группы пептидов // Научное приборостроение, 2008, Т. 18, № 4, С. 61–72.

3 Манойлов А.В., Торопыгин И.Ю., Козьмин Ю.П., Краснов Н.В., Самус Н.Л., Новиков А.В., Бубляев Р.А., Миргородская О.А. Клиническая протеомика: новые диагностические возможности масс-спектрометрии // Научное приборостроение, 2008, Т. 18, №4, С. 16–23.

4 Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Козьмин Ю.П., Миргородская О.А. Новая технология введения изотопной метки  $^{18}\text{O}$  в карбоксилсодержащие соединения, включая пептиды и белки // V международный научный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва. 2009, Сборник тезисов, часть 1, С. 49–50.

5 Манойлов А.В., Миргородская О.А. Количественный масс-спектрометрический анализ функциональных белков плазмы крови без фракционирования // V международный научный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2009, Сборник тезисов, часть 1, С. 173.

6 Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Козьмин Ю.П., Миргородская О.А. Прямое введение изотопа  $^{18}\text{O}$  в пептиды и белки для получения изотопомеров // Политехнический Симпозиум «Молодые ученые промышленности Северо-Западного региона». 2009, Сборник тезисов, С. 174–175.

7 Manoylov A.V., Serebryakova M.V., Kozmin Yu. P, Mirgorodskaya O.A. Direct Incorporation of the  $^{18}\text{O}$  Isotope into Peptides and Proteins for Quantitative Analysis // 18th International Mass Spectrometry Conference, Bremen. 2009, Abstract LS/SIT – 03.

8 Манойлов А.В., Торопыгин И.Ю., Козьмин Ю.П., Новиков А.В., Бубляев Р.А., Миргородская О.А. Комплексный анализ лекарственных препаратов содержащих стрептокиназу с использованием масс-спектрометрии // Научное приборостроение, 2010, Т. 20, №4, С. 120–128.

9 Козьмин Ю.П., Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Миргородская О.А. Прямое введение изотопов  $^{18}\text{O}$  в пептиды и белки для количественного анализа // Биоорганическая химия, 2011, Т. 37, № 6, С. 793–806.

### **Список цитируемой литературы:**

[1] Новиков А.В., Савельева Н.В., Краснов Н.В. [и др]. Использование ESI-MS и изотопно-меченых аминокислотных стандартов для определения концентрации белков // Научное приборостроение. Т. 12, № 4. 2002. С. 70–80.

[2] Rasouli M., Okhovatian A., Enderami A. Serum proteins profile as an indicator of malignancy: multivariate logistic regression and ROC analyses // Clin. Chem. Lab. Med. Vol. 43. N. 9. 2005. P. 913–918.

[3] Hermentin P., Cuesta-Linker T., Weisse J. [et al.]. Comparative analysis of the activity and content of different streptokinase preparations // Eur. Heart J. Vol. 26. N. 9. 2005. P. 933–940.