

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ ПРОБ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОЦЕНКЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ НА ПРИМЕРЕ ВИСКУМИНА

Н.С. Юдина^{1*}, Я.Н. Барашикова², О.В. Владимирова², В.А. Мясников¹¹Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, 4; *e-mail: gniiivm_7@mil.ru²Научный центр «Сигнал», 115487, Москва, ул. Нагатинская, 16А

Представлены результаты сравнительного изучения способов подготовки проб сыворотки крови для оценки содержания лектина омеги *Viscum Album* – вискумина - методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения. По результатам анализа гидролизата лектина выбран специфичный пептидный фрагмент с m/z 791.388, пригодный для последующего количественного определения. Выделение вискумина от сопутствующих компонентов сыворотки проведено без использования специфических антител. В исследовании были использованы способы с применением различных спин-колонок и метод осаждения белков раствором 1% ТХУК (трихлоруксусной кислоты) в ИПС (изопропиловом спирте). Проверка способов удаления белков сыворотки крови основывалась на установлении степени извлечения лектина из модельных проб сыворотки. В результате исследований разработана методика количественного анализа вискумина в сыворотке крови с применением наиболее эффективного способа подготовки проб с применением спин-колонок ProteoMiner («Boi-Rad», США). Методика позволяет определить белок концентрацией до 5×10^{-4} мг/мл со степенью извлечения $2.7 \pm 0.6\%$.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; сыворотка; фармакокинетика; лектины; количественный анализ

DOI: 10.18097/BMCRM00152

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых лекарственных препаратов предполагает обязательные испытания безопасности и эффективности фармакотерапии. Этому способствуют результаты, полученные в процессе клинических исследований фармакокинетики, одним из этапов которых является разработка методики определения компонентов лекарственных препаратов в пробах биологического материала. Основными объектами исследования для оценки фармакокинетических процессов, таких как распределение, абсорбция, элиминация, являются пробы крови и мочи. При этом для определения содержания физиологически активных соединений белковой природы цельная кровь практически не используется, так как компоненты крови содержат большое количество сопутствующих соединений, которые влияют на чувствительность метода анализа и снижают степень извлечения целевых соединений. Клинические исследования лекарственных препаратов, содержащих в своем составе белковые соединения, как правило, предполагают анализ проб сыворотки и плазмы крови. Пробы мочи при изучении фармакокинетических параметров соединений белковой природы недостаточно информативны. В связи с этим наиболее представительными для оценки фармакокинетических параметров лекарственных соединений белковой природы являются пробы сыворотки крови [1].

В настоящее время определение белковых соединений в биологическом материале проводят в основном с применением иммунохимических методов, однако они имеют ряд ограничений. Как правило, подготовка проб

биологического материала проводится иммунохимическими методами и наборами для выделения с использованием специфических антител, которые имеют ограниченный срок хранения. Иммунохимические методы не всегда обладают необходимой специфичностью, для них характерен риск получения как ложноположительных результатов из-за перекрестных реакций при наличии родственных белков, так и ложноотрицательных при наличии сопутствующих соединений в матрице. Кроме того, существуют объективные трудности производства и очистки специфических антител в отношении всего разнообразия белковых препаратов.

На современном этапе развития аналитической химии определение экзогенных белков в сыворотке крови без использования антител возможно только при условии использования особо чувствительного метода анализа, в частности высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР). В связи с этим актуальной задачей является разработка альтернативных способов выделения экзогенных белков на этапе подготовки проб сыворотки крови.

В настоящее время перспективными и активно изучаемыми действующими компонентами антибластомных и иммуномодулирующих препаратов белковой структуры являются лектины растения омеги (*Viscum Album*), которые обладают выраженным противоопухолевым и иммуностимулирующим действием и имеют несколько большую область терапевтического применения и меньшую токсичность для клеток по сравнению с другими лектинами, например, клещевины (*Ricinus Communis*), абруса (*Abrus Precatorius*), момордики (*Momordica Balsaminum*) [2-5].



Данное исследование по разработке подходов к выделению экзогенных белков из сыворотки крови без использования специфических антител проводили на лектине омелы – вискумине изоформы MLI [6-7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование способов подготовки проб сыворотки крови лабораторных животных (крыс) проводили с использованием образца лектина *Viscum Album* – вискумина MLI («Sigma Aldrich», США).

Выделение вискумина из пробы сыворотки крови проводили, используя следующие способы: осаждение белков раствором трихлоруксусной кислоты в изопропанол («Sigma Aldrich», США), очистка от фракции наиболее выраженных белков с помощью колонок ProteoMiner («Bio-Rad», США), удаление альбумина с помощью набора Albumin Depletion Kit («Thermo Scientific», США) и колонок Aurum Affi-Gel Blue («Bio-Rad»).

Ферментативное расщепление белков очищенных проб осуществляли на центрифужных фильтры Amicon («Millipore», Ирландия), объемом 0.5 мл, имеющих мембрану с отсечкой по массам 10 кДа.

В процессе разработки способа подготовки проб использовали хроматографическую систему Vanquish («Thermo Scientific») с гибридным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения Q Exactive HF-X, оснащенный квадрупольным масс-фильтром заряженных частиц, высокоэффективной ячейкой соударения (HCD) и орбитальной ионной ловушкой («Thermo Scientific»). Хроматографическое разделение компонентов анализируемых образцов проводили с использованием аналитической колонки с привитой обращенной фазой C-18, Zorbax 300 SB, длиной 100 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размер частиц сорбента 3.5 мкм («Agilent», США). Градиентный режим элюции создавали, используя подвижные фазы: А – 0.1 % раствор муравьиной кислоты, и Б – ацетонитрил с 0.1 % муравьиной кислоты.

Методы анализа

Выбор методов выделения вискумина из проб сыворотки крови без применения специфических антител осуществляли на основании литературных данных [8-10], где представлены способы не иммунохимического определения белковых соединений. Модельные пробы вискумина готовили согласно методикам, представленным в статье Li и соавт. [11].

Выбор наиболее эффективного реагента для солюбилизации осажденных белков проводили с использованием следующих растворов: 0.1% раствор реагента Invitrosol (Inv), 0.1% раствор реагента ProteaseMax Surfactant (PM) («Promega», США), 0.1% раствор реагента RapiGest (RG) («Waters», США), 0.1% раствор реагента PPS Silent Surfactant (PPS) («Agilent»). Дополнительно для растворения использовали два вида буферных растворов: 0.1% раствор Твин-20 (Tw) и буферный раствор 0.1 М трис с добавлением 8 М мочевины («Panreac», Испания) в сочетании с 0.1 % раствора Твин-20 (DB). После добавления 1% раствора трихлоруксусной кислоты в аликвоты сыворотки крови, осадок, содержащий белковую фракцию, перерастворяли в указанных растворах реагентов и центрифугировали с

ускорением 12000 g и термостатированием 18°C. Супернатант подвергали ферментативному расщеплению на фильтре.

Осаждение белков 1 % раствором трихлоруксусной кислоты в изопропанол

Осаждение белков сыворотки крови провели, используя аликвоту объемом 0.2 мл с внесением вискумина в диапазоне разведений 0.5–100 мкг/мл путем добавления 2 мл 1% раствора трихлоруксусной кислоты в изопропанол (1% ТХУК/ИПС). Полученный осадок белков промывали 0.2 мл метанола с последующим удалением надосадочного слоя. Затем осадок растворяли в 0.1 мл 0.1% растворе Твин-20. Аликвоту полностью переносили на центрифужный фильтр и подвергали ферментативному расщеплению.

Удаление белков матрицы с помощью набора ProteoMiner («Bio-Rad»)

Удаление наиболее представленных белков сыворотки крови с помощью колонок ProteoMiner Large Capacity осуществляли посредством отбора по 1 мл пробы с внесением вискумина в диапазоне разведений 0.5–100 мкг/мл. Процедуру выполняли в соответствии с рекомендациями производителя колонок [12]. Очищенную фракцию переносили на фильтр и подвергали ферментативному расщеплению.

Удаление альбумина с помощью набора Albumin Depletion Kit («Thermo Scientific»)

Удаление альбумина с помощью набора Albumin Depletion Kit из сыворотки крови проводили с использованием 0.03 мл пробы с внесением вискумина в диапазоне разведений 0.5–100 мкг/мл. Очистку пробы сыворотки осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя набора [13]. Фракцию, очищенную от альбумина, переносили на центрифужный фильтр и подвергали ферментативному расщеплению.

Удаление альбумина с помощью набора Aurum Affi-Gel Blue («Bio-Rad»)

Подготовку выполняли с использованием пробы объемом 0.125 мл с внесением вискумина в диапазоне разведений 0.5–100 мкг/мл. Очистку пробы сыворотки проводили в соответствии с рекомендациями производителя колонок [14]. Фракцию, очищенную от альбумина, переносили на центрифужный фильтр и подвергали ферментативному расщеплению.

Ферментативное расщепление белков

Подготовку белков и их последующий протеолиз осуществляли методом концентрирования на фильтре (filter-aided sample preparation – FASP), который подходит для расщепления белков клеточных или тканевых лизатов, содержащих различные детергенты и широко используется в протеомных исследованиях [15-17]. Метод FASP заключается в использовании фильтра с мембраной с отсечкой по молекулярным массам в качестве «реактора», на котором модифицируют и подвергают гидролизу сложные

Таблица 1. Наиболее интенсивные характеристичные пептиды, выбранные для определения вискумина

АК-последовательность идентифицированного пептида	Масса пептида, Да	Значение m/z, Да	Заряд иона	Интенсивность хроматографического пика, отн.ед.
DYVSSGSFSNEIPLLR	1782.879	892.454	2+	8.81×10^5
		595.305	3+	8.14×10^4
VTHQTTGEEYFR	1466.679	489.904	3+	1.89×10^5
GAETHLFTGTTR	1289.636	645.824	2+	3.21×10^4
		430.889	3+	9.59×10^5
SSLPFNGSYDRLR	1580.747	791.388	2+	1.32×10^6
		528.249	3+	2.47×10^4

белковые смеси, а также эффективно удаляют детергенты и избытки реагентов, которые не рекомендуется использовать при подготовке проб для масс-спектрометрического детектирования [18, 19]. Подготовка образца, содержащего вискумин, для установления хроматомасс-спектрометрических характеристик проведена по протоколу FASP, предложенному Wiśniewski и соавт. [20] с внесением некоторых изменений с целью увеличения чувствительности и воспроизводимости метода. В частности, процедуру подготовки проб для ферментативного расщепления проводили на центрифужных фильтрах с отсечкой по массам 10 кДа. Фильтры предварительно выдерживали в течение 16 ч в 0.1 % водном растворе Твин-20 для снижения сорбции белковых соединений и пептидов на мембране фильтра. В качестве алкилирующего агента был использован более устойчивый к окислению 4-винилпиридин («Sigma Aldrich»), который образует более прочные производные с цистеином, что позволяет уменьшить количество сайтов пропусков при установлении аминокислотной последовательности (АКП) белков в ходе анализа масс-спектров пептидов. Промывку фильтра между стадиями денатурации, восстановления и алкилирования осуществляли буферным раствором, не содержащим мочевины: 0.1 М трис, pH 8.5. Замену буферного раствора перед протеолизом проводили, дважды промывая фильтр по 0.1 мл буферного раствора 0.05 М трис, pH 8.0. с последующим центрифугированием с ускорением 12000 g и термостатированием 18°C. Фильтр перемещали в новый пробоприёмник и вносили на фильтр 0.1 мл буферного раствора 0.05 М трис, pH 8.0.

Ферментативное расщепление белков, как правило, проводят трипсином, расщепляющим пептидные связи, образованные карбоксильными группами; это позволяет получить пептиды, имеющие молекулярные массы от 400 Да до 2000 Да – оптимальный диапазон масс для анализа методами масс-спектрометрии [21]. В представленном исследовании применили смесь трипсина и лизилэндопептидазы (расщепление пептидных связей после К и R, за исключением сайтов KP, RP) для получения более информативной пептидной карты. Расщепление белков осуществляли смесью ферментов трипсина и лизилэндопептидазы («Promega») в растворе 0.05 М HCl с общей концентрацией ферментов 0.2 мг/мл объемом 0.01 мл (16 ч при температуре 37°C). После протеолиза фильтр центрифугировали с ускорением 12000 g и термостатированием 18°C до полного удаления раствора с фильтра. Окончательную элюцию пептидов с фильтра

провели внесением на фильтр 0.05 мл раствора 0.1% муравьиной кислоты («Fluka», США) в смеси ацетонитрила («Sigma Aldrich») и воды в объемном соотношении 2:8 (v/v) и центрифугировали досуха: с ускорением 12000 g и термостатированием 18°C в течение 15 мин; процедуру выполняли дважды. Полученную смесь пептидов, находящуюся в пробоприёмнике, высушивали в вакуумном концентраторе при температуре 60°C до минимального объема (0.005 мл). Затем пептидный концентрат разводили в 0.05 мл 0.1 % раствора муравьиной кислоты в смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 2:98 (v/v), перемешивали на вортексе и центрифугировали. Конечный раствор пептидов переносили в выалу с силианизированной вставкой вместимостью 0.25 мл и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Условия масс-спектрометрического детектирования

Анализ пептидов, полученных в ходе ферментативного расщепления образца вискумина с концентрацией 0.01 мг/мл, проводили методом масс-спектрометрического детектирования с ионизацией пептидов методом электроспрея в режиме положительной ионизации (ESI+). Регистрацию пептидов осуществляли в двух последовательно переключающихся режимах работы масс-спектрометра:

- Full Scan MS (Full Scan) - сканирование полного ионного тока ионов-предшественников в заданном диапазоне значений m/z ;

- Data Depended MS² (dd-MS²) – сканирование полного ионного тока ионов-фрагментов, полученных при диссоциации 10 наиболее интенсивных ионов-предшественников – метод анализ-зависимого масс-спектрометрического детектирования.

Определение пептидов вискумина осуществляли путем анализа полученных масс-хроматограмм с использованием программного комплекса PeakStudio X («Bioinformatics Solutions Inc.», Канада). Параметры обработки масс-спектров включали следующие установленные ограничения: допустимая погрешность определения массы ионов-продуктов – 0.02 Да, максимально допустимое количество одновременно присутствующих пост-трансляционных модификаций (ПТМ) у пептида – 3 из 4-х возможных: карбамидометилирование (постоянная модификация), S-пиридилэтилирование (С), деамидирование (N, Q) и окисление (М) (вариативные модификации), допустимая погрешность определения массы ионов-прекурсоров – 15 ppm.

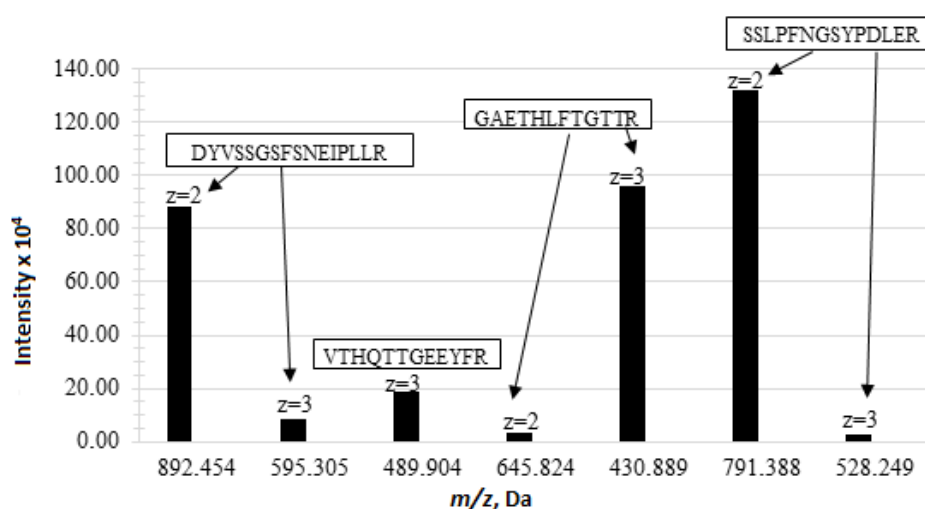


Рисунок 1. Интенсивности откликов хроматографических пиков для ионов пептидов вискумина в различных зарядовых состояниях.

Таблица 2. Результаты определения степени извлечения вискумина при оценке растворения осажденных белков ($p < 0.05$, $n = 6$)

Степень извлечения вискумина, %					
Inv	PM	PPS	RG	DB	Tw
7.8 ± 1.4	6.2 ± 1.1	1.2 ± 0.2	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.3	8.2 ± 2.2

Дальнейший целевой анализ методом ВЭЖХ-МС/МС с детектированием в двух последовательно переключающихся режимах работы масс-спектрометра: Full Scan и в режиме мониторинга параллельных реакций – Parallel Reaction Monitoring (PRM). Режим PRM характеризуется более высокой чувствительностью по сравнению с dd-MS² за счет выделения в первом квадруполе указанных в параметрах метода целевых ионов пептидов, их дальнейшей фрагментации в ячейке соударения и детектирования ионов-продуктов в масс-анализаторе Orbitrap. Идентификацию белка проводили по выбранным четырем пептидам вискумина. Количественную оценку содержания лектина в модельных пробах сыворотки крови проводили по одному наиболее интенсивному пептидному иону.

Условия хроматографического разделения пептидов при анализе методом анализ-зависимого масс-спектрометрического сканирования (dd-MS²)

Хроматографическое разделение смеси пептидов проводили в режиме градиентного элюирования: от 0 до 2 мин 2% подвижной фазы Б, от 2 мин до 38 мин линейный градиент до 45% подвижной фазы Б, от 38 мин до 39 мин линейный градиент до 95% подвижной фазы Б, от 39 мин до 44 мин 95% подвижной фазы Б, от 44 мин до 45 мин линейный градиент до 2% подвижной фазы Б, до 50 мин 2% подвижной фазы Б.

Условия хроматографического разделения пептидов при анализе методом мониторинга параллельных реакций (PRM)

Градиентное элюирование пептидов проводили следующим образом: от 0 до 1 мин 2% подвижной фазы Б, от 1 мин до 12 мин линейный градиент до 40% подвижной фазы

Б, от 12 мин до 13 мин линейный градиент до 95% подвижной фазы Б, от 13 мин до 16 мин 95% подвижной фазы Б, от 16 мин до 16.01 мин линейный градиент до 2% подвижной фазы Б, 2% подвижной фазы Б до 35 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе разработки способа подготовки проб сыворотки крови и определения содержания вискумина нами были проведены исследования по выбору характеристичных пептидов лектина, т.е. присутствующих только в составе целевого соединения.

По результатам анализа образца пептидного лизата вискумина с концентрацией 0.01 мг/мл, проведенного методом анализ-зависимого масс-спектрометрического сканирования, были идентифицированы пептиды лектина и выбраны наиболее интенсивные характеристичные пептиды: двух- или трехзарядные молекулярные ионы с наибольшей интенсивностью сигнала на масс-хроматограмме, не имеющие модифицированных аминокислотных остатков (табл. 1).

Анализ полученных данных позволил выявить следующие наиболее интенсивные ионы пептидов: DYVSSGSFSNEIPLLR (m/z 892.454, $z=2+$), GAETHLFTGTTR (m/z 430.889, $z=3+$) и SSLPFNNGSYDRLR (m/z 791.388, $z=2+$). В качестве иона пептида для количественной оценки был выбран пептид SSLPFNNGSYDRLR (m/z 791.388, $z=2+$), имеющий максимальную интенсивность и отвечающий всем требованиям, предъявляемым к характеристичным пептидам (рис. 1).

Выбранные пептиды использовали при создании метода PRM, позволяющего сократить время анализа и повысить чувствительность при определении вискумина.

Поскольку осаждение органическими растворителями ведёт к денатурации белковых молекул, вследствие

Таблица 3. Сравнение степени извлечения и минимальной определяемой концентрации вискумина в модельных пробах сыворотки крови ($p < 0.05$, $n=6$) при подготовке различными способами.

Способ подготовки проб	Минимальная определяемая концентрация, мкг/мл	Степень извлечения, %
1 % ТХУК/ИПС	5	6.9 ± 1.6
ProteoMiner	0.5	2.7 ± 0.6
Albumin Depletion Kit	1	3.2 ± 0.4
Aurum Affi-Gel Blue	5	3.8 ± 0.8

Таблица 4. Сравнительная характеристика результатов извлечения вискумина из проб сыворотки крови, подготовленных способами осаждения и очистки на колонках «ProteoMiner» и осаждением в 1 % ТХУК/ИПС ($p < 0.05$, $n=6$)

Объем исходной пробы, мл	Степень извлечения вискумина, %							
	Колонки ProteoMiner				Осаждение в 1 % ТХУК/ИПС			
	10 мкг/мл	5 мкг/мл	1 мкг/мл	0.5 мкг/мл	10 мкг/мл	5 мкг/мл	1 мкг/мл	0.5 мкг/мл
0.2	6.9±1.3	7.0±0.5	7.2±0.4	6.8±1.7	7.5±1.9	6.9±1.6	-	-
0.5	5.1±0.6	5.4±0.8	5.0±0.7	4.8±1.2	3.9±0.9	2.5±0.7	1.8±0.4	-
1	4.1±0.9	4.7±1.1	3.8±0.8	2.7±0.6	2.5±0.6	2.2±0.5	1.5±0.4	-

чего ухудшается их растворимость, при использовании осаждения белков 1% ТХУК/ИПС дополнительно была проведена оценка растворимости осажденных белков в растворах различных видов сурфактантов. По результатам исследования был выбран 0.1% раствор Твин-20 (табл. 2) с наибольшей степенью извлечения вискумина из сыворотки крови – $8.2 \pm 2.2\%$.

Результаты определения содержания вискумина в модельных пробах сыворотки крови с внесением лектина в диапазоне концентраций 0.5–100 мкг/мл, подготовленных различными способами, представлены таблице 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка результатов проведенного исследования была проведена по показателю степени извлечения вискумина из проб сыворотки (см. дополнительные материалы). Среди использованных способов подготовки проб наиболее чувствительным оказался способ с применением колонок ProteoMiner, позволяющий количественно определить лектин в сыворотке на уровне 0.5 мкг/мл со степенью извлечения $2.7 \pm 0.6\%$. При этом наибольшая степень извлечения лектина ($6.9 \pm 1.6\%$) была достигнута при использовании метода осаждения белков раствором 1% ТХУК/ИПС, однако со сравнительно низкой чувствительностью 5 мкг/мл. Использование колонок ProteoMiner для деплеции белков сыворотки позволило выделить целевой белок в наименьшей концентрации, что объясняется принципом действия колонок, который основан на разнице в сродстве компонентов сыворотки крови к лигандам, привитым к сорбенту колонок. Тем не менее, несмотря на эффективность применения различных способов подготовки проб сыворотки крови для определения вискумина, все они показали довольно низкую степень извлечения целевого белка. Такой результат может быть обусловлен матричным эффектом, создаваемым высокой концентрацией глобулярных белков в сыворотке крови.

Подготовка проб описанными способами была проведена для разных исходных объемов проб сыворотки, что не учитывали в вышеизложенном исследовании. По этой причине целесообразно сравнить эффективность выбранных на первом этапе подходов для равных объемов исходной пробы.

Сравнительное исследование методов подготовки сыворотки крови проводили, используя для очистки модельных проб различные исходные объемы: 0.2 мл, 0.5 мл, 1.0 мл с внесением следующих концентраций вискумина: 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл. Пробы подготавливали с применением наиболее эффективных способов: удаление альбумина осаждением в 1% растворе ТХУК/ИПС и очистки на колонках ProteoMiner.

Результаты исследования, представленные в таблице 4, показали, что увеличение объема пробы не привело к повышению степени извлечения вискумина из сыворотки крови. Использование колонок ProteoMiner и способа удаления альбумина осаждением в 1% растворе ТХУК/ИПС характеризуются равноценным уровнем выделения вискумина со степенью извлечения в пределах 7% в объеме пробы, не превышающей 0.2 мл. Тем не менее, предел обнаружения лектина при использовании способа удаления альбумина 1% раствором ТХУК/ИПС значительно снижается при снижении его концентрации в сыворотке. Таким образом, по результатам проведенного исследования установлено, что при использовании колонок ProteoMiner чувствительность способа подготовки сыворотки крови методом удаления мажорных белков превосходит 0.5 мкг/мл, что значительно выше, чем при использовании метода осаждения 1% раствором ТХУК/ИПС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенных исследований установлено, что подходы без применения специфических антител можно использовать как альтернативные иммунохимическим способам подготовки проб сыворотки крови для выделения и количественной оценки содержания белковых компонентов

лекарственных средств. На примере компонента лекарственного средства лектина растения *Viscum Album* - вискумине MLI - установлены пределы его определения в сыворотке. В результате сравнительной оценки выбран оптимальный способ подготовки проб сыворотки крови с применением колонок ProteoMiner. Предложенный способ совместно с методом ВЭЖХ-МСВР рекомендуется использовать для количественной оценки содержания целевых компонентов при проведении фармакокинетических исследований лекарственных препаратов в тех случаях, когда использование специфических антител по тем или иным причинам не представляется возможным.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей в качестве объектов исследования. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководству Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины за возможность проведения исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено по теме научно-исследовательской работы в рамках выполнения Государственного оборонного заказа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

К данной статье приложены дополнительные материалы, свободно доступные в электронной версии (<http://dx.doi.org/10.18097/BMCR00152>) на сайте журнала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Luzhnikov, E.A., Clinical toxicology. 2nd Ed., 1994, Medicine: Moscow, 256 p.
2. Park, R., Kim, M.S., So H.S. et al. (2000) Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **60**(11), 1685–1691. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00482-2
3. Moisenovich, M., Tonevitsky, A., Agapov, I. et al. (2002) Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **81**, 529–538. DOI: 10.1078/0171-9335-00263

4. Moisenovich, M., Tonevitsky, A., Maljuchenko, N. et al. (2004) Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem. Cell Biol.* **121**(6), 429–439. DOI 10.1007/s00418-004-0652-6
5. Grossarth-Maticsek, R., Ziegler, R. (2007) Prospective controlled studies on long-term therapy of ovarian cancer patient with mistletoe (*Viscum album* L.) extracts. *Arzneimittel-forschung*, **57**(10), 665–678. DOI: 10.1055/s-0031-1296666
6. Leusova, N.Yu., Katola, V.M., Krylov, A.V. (2008) Phytochemistry of *Viscum plants* (*Viscum* L.) and their medical properties. *Bulletin of respiratory physiology and pathology*, **28**, 69–73.
7. Nasirahmadi, S., Zargan, J., Nasirahmadi, S. et al. (2020) Research Paper: Bioinformatics Analysis of linear B-cell Viscumin toxin epitope with potential use in molecularly imprinted polymer biosensors. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*, **10**(1), 26172. DOI: 10.32598/ijmtfm.v9i4.26172.
8. Lebedev, A.T., Artemenko, K.A., Samgina, T.Yu. (2012) Principles of proteins and peptides mass-spectrometry, Technosfera: Moscow. 176 p.
9. Chromy, B.A., Gonzales, A.D., Perkins, J. et al. (2004) Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J. Proteome Research*, **3**, 1120–1127. DOI: 10.1021/pr049921p
10. Bjorhall, K., Milioti, S. T., Davidsson, P. (2005) Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *K Proteomics*, **5**, 307–317. DOI: 10.1002/pmic.200400900.
11. Liu, G., Zhao, Y., Angeles, A. et al. (2014). A novel and cost-effective method of removing excess albumin from plasma/serum samples and its impacts on LC-MS/MS bioanalysis of therapeutic proteins. *Anal. Chem.*, **86**, 8336–8343. DOI: 10.1021/ac501837t
12. Bio-Rad. ProteoMiner Protein Enrichment Kits. Instruction Manual. Retrieved January 28, 2019, from: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/10010636D.PDF>
13. Thermo Scientific. Instructions. Pierce Albumin Depletion Kit. Retrieved January 28, 2019, from: https://assets.thermo.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011862_Pierce_Albumin_Depletion_UG.pdf
14. Bio-Rad. Instructions. Aurore Affi-Gel Blue Mini Kits and Columns. Retrieved January 29, 2019, from: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsl/literature/10010636D.PDF>
15. Nagaraj, N., Wisniewski, J.R., Geiger, T. et al. (2011) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol.*, **7**, 548. DOI: 10.1038/msb.2011.81
16. Welberry Smith, M.P., Zougman, A., Cairns, D.A., Wilson, M. et al. (2013) Serum aminoacylase-1 is a novel biomarker with potential prognostic utility for long-term outcome in patients with delayed graft function following renal transplantation. *Kidney Int.*, **84**(6), 1214–1225. DOI: 10.1038/ki.2013.200.
17. Kachuk, C., Stephen, K., Doucette, A. (2015) Comparison of sodium dodecyl sulfate depletion techniques for proteome analysis by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1418**, 158–166. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.042.
18. Nagaraj, N., Lu, A., Mann, M. et al. (2008) Detergent-based but gel-free method allows identification of several hundred membrane proteins in single LC-MS runs. *J. Proteome Res.*, **7**(11), 5028–5032. DOI: 10.1021/pr800412j
19. Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. et al. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, **6**(5), 359–362. DOI 10.1038/nmeth.1322.
20. Wisniewski, J.R., Zielinska, D.F., Mann M. (2011) Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Anal. Biochem.*, **410**(2), 307–309. DOI: 10.1016/j.ab.2010.12.004
21. Wilffert, D. (2016) Antibody-free LC-MS/MS protein analysis of TRAIL. University of Groningen. 39 p.

Поступила: 20.06.2021
 После доработки: 18.07.2021
 Принята к публикации: 19.07.2021

METHODS FOR THE PREPARATION OF BLOOD SERUM SAMPLES IN THE ASSESSMENT OF THE PHARMACOKINETICS OF PROTEIN DRUGS BY THE EXAMPLE OF VISCUMIN

N.S. Yudina^{1}, Ya.N. Barashkova², O.V. Vladimirova², V.A. Myasnikov¹*

¹State Research and Testing Institute of Military Medicine,
4 Lesoparkovaya str., Saint-Petersburg, 195043 Russia; *e-mail: gniiivm_7@mil.ru

²Scientific Center "Signal", 16A Nagatinskaya str., Moscow, 115487 Russia

A comparative evaluation of methods for preparing blood serum samples for determination of the lectin content of the mistletoe *Viscum Album*, viscumin, by high-performance liquid chromatography in combination with high-resolution mass-spectrometry detection has been carried out. Based on the results of the analysis of the lectin hydrolyzate, a specific peptide fragment with m/z 791.388 suitable for subsequent quantitative determination was selected. Isolation of viscumin from serum components was carried out without the use of specific antibodies. The study used methods employing various spin columns and the method of protein precipitation with 1% TCA (trichloroacetic acid) in IPA (isopropyl alcohol). Testing the methods of depletion of blood serum proteins was based on the determination of the degree of extraction of lectin from model serum samples. As a result of our research, we have developed a technique for the quantitative analysis of viscumin in blood serum by the most efficient method of sample preparation using the ProteoMiner spin columns. The technique allows to determine the protein concentration up to $5 \cdot 10^{-4}$ mg/ml with the extraction degree (2.7 ± 0.6) %.

Key words: mass-spectrometry; serum; pharmacokinetics; lectins; quantitative analysis

FUNDING

The study was carried out on the topic of research work in the framework of the implementation of the State Defense Order.

Received: 20.06.2021, revised: 18.07.2021, accepted: 19.07.2021