

Подсекция 3.1 | Теоретические и прикладные аспекты фармации и биотехнологии

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЭНДОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ОРГАНИЗМА И КСЕНОБИОТИКОВ

К. А. Леонов^{1,2}, Д. А. Вишенкова³, И. В. Золкина¹

¹ООО «ХромсистемсЛаб»

117246, Россия, г. Москва, Научный проезд 20, строение 2

²ООО «Инновационные фармакологические разработки»
634021, Россия, г. Томск, ул. Елизаровых 79/4

³ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина 30

В течение последних 10–12 лет в лабораториях чрезвычайно возросло использование масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии (ХМС). Это связано с основными преимуществами методов: сверхвысокая чувствительность, точность количественного определения, уникальная специфичность, высокая скорость анализа. Основная доля ХМС в медицине приходится на определение биологически значимых соединений, отражающих физиологические состояния человека и наличие или возможности появления тех или иных заболеваний, характеризующих особенности их протекания. Современные клинические лаборатории решают с помощью ХМС не только рутинные задачи в диагностике, но и исследовательские, например, обнаружение новых биомаркеров.

Кровь, ее фракции (плазма, сыворотка) и моча выступают в роли основных биологических объектов в клиническом анализе.

Часто исследуют и другие физиологические жидкости – желчь, слюну, сперму. В определении микроэлементов используют волосы, ногти, фекалии.

В настоящей работе показано применение ВЭЖХ/МС для скрининга врожденных ошибок метаболизма у новорожденных путем анализа 48 аминокислот и ацилкарнитинов в крови, плазме и моче, позволяющего диагностировать более 30 различных заболеваний, включая аце-

демии, аминокислотопатии, дефекты окисления жирных кислот.

Важнейшим медицинским показателем для людей обоих полов является стероидный профиль. Описаны современные приемы хромато-масс-спектрометрии и способы пробоподготовки, позволяющие достоверно определить более 20 стероидных гормонов и их метаболитов в сыворотке крови и слюне для ранней диагностики бесплодий, дисфункций коры надпочечников, задержек или ускорений полового развития, миом, эндометриоза, остеопороза и др. Анализ мочи и определение в ней эстрогенов и их метаболитов позволяет судить о бесплодии, гипогонадизме, некоторых онкозаболеваниях половых систем.

Для диагностики нейробластомы, ганглионевромы, феохромоцитомы и других опухолевых нейропатологий продемонстрирован высокочувствительный анализ плазмы крови и мочи на содержание катехоламинов и их метаболитов.

Представлен газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием для определения более 40 органических кислот и их метаболитов в моче, с помощью которого оцениваются углеводный метаболизм, функции митохондрий и выявляются соответствующие заболевания – фибромиалгии, гипотонии, кардиомиопатии, нейтропении, анемии и др.

Детальный анализ (до 100 компонентов в одном анализе и до десятка диагностируемых заболеваний в одном образце) позволяет полностью избежать или снизить количество применяемых радиационных методов диагностики.

Невозможно обойтись без ХМС и в разработке новых лекарственных средств. На этапах доклинических и клинических испытаний она позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определять ксенобиотики и их метаболиты в сложных биоматрицах лабораторных животных и человека для решения вопросов фармакокинетики, фармакодинамики, био-

доступности. На примере отражено ВЭЖХ/МС определение нового лекарственного средства для лечения болезни Паркинсона и нового препарата антиагреганта, а также идентификация и количественная оценка их метаболитов в плазме крови и моче.

Высокоспецифичный, точный и быстрый ХМС анализ большого количества образцов с высокой достоверностью и отсутствием помех от сопутствующих веществ делает метод незаменимым в ряде определений метаболитов эндогенных веществ организма и ксенобиотиков.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ГЛАРГИН-ИНСУЛИНА ИЗ КУЛЬТУРЫ *Escherichia coli*

В. Д. Аликова^{1,2}, Т. С. Герасимова², Д. А. Гусаров, А. П. Чернова¹
Научные руководители – к.х.н. Д. А. Гусаров; к.х.н., доцент А. П. Чернова

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, дом 30, alikova@tpu.ru

²Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева
125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, дом 9

Биосинтез рекомбинантного белка в культуре *Escherichia coli* часто связан с образованием белковых агрегатов *in vivo* в виде телец включения (ТВ) [1]. Образование телец включения внутри клетки защищает терапевтический белок от протеаз. Однако дальнейший процессинг, включающий солюбилизацию и рефолдинг белка из ТВ, может быть лимитирующей стадией эффективного производства биоактивного белка с использованием технологии рекомбинантных ДНК [2]. Как правило, тельца включения солюбилизируются при использовании высоких концентраций денатурантов, таких как мочевины или гидрохлорид гуанидина, вместе с восстановителем, таким как ДТТ или β-меркаптоэтанол [3]. Солюбилизация телец включения с использованием высоких концентраций хаотропов приводит к полному нарушению третичной структуры белка. Это в ряде случаев способствует мисфолдингу и агрегации целевых молекул. Потеря третичной структуры при солюбилизации и взаимодействие между денатурированными белковыми молекулами, приводящее к их агрегации, считаются основными причинами плохого извлечения биоактивных белков из телец включения [4].

Цель данной работы – исследование оптимальных условий солюбилизации гибридного белка гларгин-инсулина из культуры *Escherichia coli*.

Для работы был использован штамм инсулина на основе непатогенной *E. coli* BL21. В качестве хаотропного агента использовали мочевины в концентрации от 2 до 8 М, в качестве восстановителя дисульфидных связей – дитиотреитрол (ДТТ) с концентрацией от 0,1 до 10 мМ.

Чтобы найти оптимальные для солюбилизации концентрацию хаотропного агента и диапазон рН, тельца включения суспендировали в водном буфере при различных значениях рН в присутствии возрастающих концентраций мочевины.

Тельца включения пасты гибридного белка (ГБ) с содержанием основного компонента 15 мг/мл суспендировали при значениях рН от 7 до 12 в воде очищенной. Растворимость (%) рассчитывали путем измерения концентрации солюбилизованного белка по методу Брэдфорда [5].

Для определения оптимального количества восстанавливающего агента тела включения растворяли в денатурирующем буфере с разным