
**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

УДК 543.51: 577.1: 66.096.3

© А. В. Протасов, Р. А. Бубляев, О. А. Миргородская, 2020

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ
В ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА И КОНТРОЛЕ ДЕЙСТВИЯ
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА "ТРИАЗАВИРИН"**

Для совершенствования методов диагностики и лечения заболевания гриппом в настоящей работе проведены количественные масс-спектрометрические исследования активности двух основных карбоксипептидаз — ангиотензинпревращающего фермента и карбоксипептидазы-N. Проведены сравнения уровней активности этих пептидаз для здоровых и инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) мышей, а также для мышей, пролеченных экспериментальным противогриппозным препаратом "Триазавирин".

Анализ, подобный продемонстрированному в данной работе, может быть с успехом использован при сравнительной оценке эффективности и других антигриппозных препаратов, а также для понимания направления их воздействия на инфицированный организм.

Кл. сл.: ангиотензин I, ангиотензинпревращающий фермент, карбоксипептидаза N, брадикинин, количественная масс-спектрометрия

ВВЕДЕНИЕ

Грипп в различных его формах в виде сезонных вспышек или пандемий остается серьезной проблемой общественного здравоохранения. Инфекция гриппа у человека может протекать по-разному: от бессимптомной инфекции до осложненных форм, включая тяжелую вирусную пневмонию и обострение имеющихся хронических заболеваний. Сезонные эпидемии гриппа ежегодно могут поражать до 15 % населения. Это указывает на важность создания новых и улучшения существующих вакцин и лекарств.

Вирус гриппа заражает в основном эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, распространяясь затем и на клетки нижних дыхательных путей. Значительное число пораженных клеток, возникающее при недостаточном иммунном ответе организма, собственно, и приводит к нарушению функции органов и систем органов, в первую очередь нервной и сердечно-сосудистой систем. Эти нарушения проявляются в общих и локальных изменениях в регуляции кровоснабжения органов и тканей.

В регуляции кровяного давления и водно-солевого баланса принимает участие ренин-ангиотензиновая система, которая является наиболее важной и достаточно хорошо изученной. Участником этой системы является ангиотензин II — конечный продукт каскада протеолитических процессов. Свое влияние ангиотензин II оказывает через ангиотензиновые рецепторы, являющиеся медиаторами основного сосудосуживающего эф-

фекта, включающего вазоконстрикцию, синтез и секрецию альдостерона, секрецию вазопрессина, запуск норадренергической активности и регуляцию синтеза ренина в почках. Рецепторы ангиотензина II обнаружены в сердце, кровеносных сосудах, почках, надпочечниках, легких и головном мозге. Ангиотензин II образуется из ангиотензина I в результате отщепления двух С-концевых аминокислот ангиотензинпревращающим ферментом (АПФ).

Помимо ангиотензина I, АПФ гидролизует и другие пептиды плазмы крови, а также инактивирует пептид, обладающий сосудорасширяющим действием, — брадикинин [1]. Брадикинин играет важную роль в регуляции кровообращения в условиях острых воспалительных реакций различного патогенеза [2]. Он является одним из самых сильных сосудорасширяющих средств в организме, повышает проницаемость капилляров и способствует выходу жидкости из кровеносного сосуда (вызывает отек). С этой точки зрения брадикинин вместе с гистамином и простагландинами относят к медиаторам воспаления.

В метаболизме брадикинина, помимо АПФ, участвуют еще по крайней мере две протеиназы — аминоксипептидаза Р и неприлизин (карбоксипептидаза N), которые отличаются продуктами гидролиза. АПФ расщепляет связь (7–8), а аминоксипептидаза и карбоксипептидаза отщепляют соответственно N и C концевые аминокислоты.

Таким образом, активность протеиназ, участвующих в метаболизме ангиотензина I и брадикинина в тканях дыхательных путей, будет отражать

развитие патологического процесса при гриппе, что и являлось предметом изучения в настоящей работе.

Оптимальным материалом для исследования можно считать бронхиальный смыв — лаваж. Традиционно активность пептидаз измеряют с использованием хромогенных или флюорогенных субстратов, а также в условиях сложных смесей в присутствии ингибиторов. Однако выбор и синтез специальных субстратов и ингибиторов сам по себе является сложной задачей [3]. Кроме того, упомянутые протеиназы относятся к металлопротеиназам, что указывает на то, что можно ожидать перекрестного действия ингибиторов. Поэтому в данной работе использовались нативные субстраты, активность во времени которых измерялась методом количественной масс-спектрометрии, ранее разработанным и опробованным авторами [4, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемые препараты

Исследуемый препарат "Триазавирин", предоставлен ООО "Завод Медсинтез".

Экспериментальные животные

Белые беспородные мыши предоставлены питомником Рапполово, Ленинградская область. Вес животных 16–18 г.

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с методическими документами, используемыми при работе. Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены Комиссией по биоэтике ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России на предмет соответствия регулирующим актам.

Вирусы гриппа

Для работы был использован штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированный к мышам, полученный из рабочей коллекции вирусов ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России.

Введение препарата животным

Препарат "Триазавирин" был использован в дозировке 200 мг/кг, вводился перорально в объеме 0.2 мл один раз в сутки по лечебно-профилактической схеме (за 24, за 1 ч и через 24, 48 и 72 ч после заражения).

Заражение животных и забор проб

Мышей заражали интраназально под легким эфирным наркозом вирусом в дозе 1 МЛД₅₀ на мышь в объеме 50 мкл (МЛД — мышьяная летальная доза). На 3-й день после заражения, через 2 ч после введения препарата животных подвергали

эвтаназии, забирали кровь и бронхиальный смыв (лаваж).

Получение стандарта из ангиотензина II и брадикинина

Стандарты готовились из ангиотензина II и брадикинина ("Sigma-Aldrich"). Навеску 2.1 мг пептида растворяли в 20 мкл 10 % трифторуксусной кислоты (ТФУ, "Sigma-Aldrich") в H₂¹⁸O (97 % ¹⁸O, "Cambridge Isotope Laboratories Andover", MA, USA) и инкубировали в твердотельном термостате при 70 °C в течение 90 мин для протекания изотопного обмена, после чего высушивали в вакуумном испарителе SpeedVac ("Eppendorf"). Содержимое пробирки растворяли в воде и использовали в качестве стандарта для определения концентрации пептидов.

MALDI-TOF масс-спектрометрия

Исследуемые образцы смешивали с матрицей HCCA ("Bruker", Германия), наносили на мишень GroundSteel ("Bruker", Германия) и анализировали на масс-спектрометре MALDI-TOF / TOF ultrafleXtreme ("Bruker", Германия) в режиме обнаружения положительных ионов. Для каждого спектра было суммировано 5000 лазерных импульсов. Идентификация белков проводилась с использованием MASCOT (matrixscience.com) для доступа к базе данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, www.ncbi.nlm.nih.gov), в параметрах в качестве переменных модификаций было указано окисление метионинов. Ошибка определения массы была ограничена до 50 ppm.

Условия гидролиза пептидазами

Растворы пептидов ангиотензина I и брадикинина смешивались с сывороткой (разбавление в 25 раз) и лаважем (без разбавления). Смеси инкубировались при 37 °C в течение 15, 40 и 60 мин. Реакция останавливалась добавлением аликвот в 2 % ТФУ. В анализируемые пробы вносился стандарт ожидаемого продукта гидролиза ¹⁸O-ангиотензин II для ангиотензина I или ¹⁸O-брадикинина для брадикинина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика

В настоящей работе исследовались образцы сыворотки крови и бронхиальных смывов здоровых и больных мышей. Выбор этих двух биологических сред для сравнительных исследований обусловлен тем, что они позволяют выявить изменения как в составе крови, так и в легких. В результате экспериментов на животных анализировались

изменения активности протеаз, которые характеризуют состояние животных при развитии инфекции и в процессе лечения гриппа препаратом "Триазавирин".

В данной работе для нормировки активности ферментов в бронхиальных смывах использовался альбумин, количество которого было определено по указанной методике [4, 5], а для измерения активности карбоксипептидаз использовались природные субстраты — ангиотензин I и брадикинин.

Масс-спектрометрический контроль за гидролизом ангиотензина I ангиотензинконвертирующим ферментом в сыворотке и лаваже

На рис. 1 представлены масс-спектры начального гидролиза ангиотензина I в бронхиальных смывах. Показано образование ангиотензина II ($m/z = 1046.6$) из внесенного в сыворотку ангиотензина I ($m/z = 1296.8$) под действием АПФ. Видно, что при этом в образце отсутствуют продукты гидролиза, не характерные для АПФ.

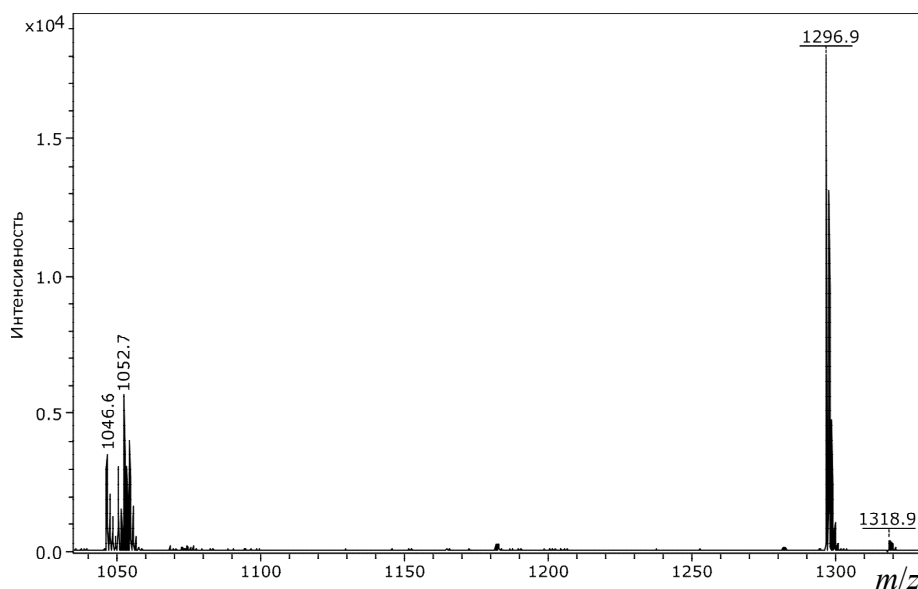


Рис. 1. MALDI-MS ангиотензина I ($m/z = 1296.8$) через 40 мин гидролиза пептидазами в лаваже мыши при 37 °C в присутствии стандарта ($m/z = 1052.7$) к ангиотензину II ($m/z = 1046.6$)

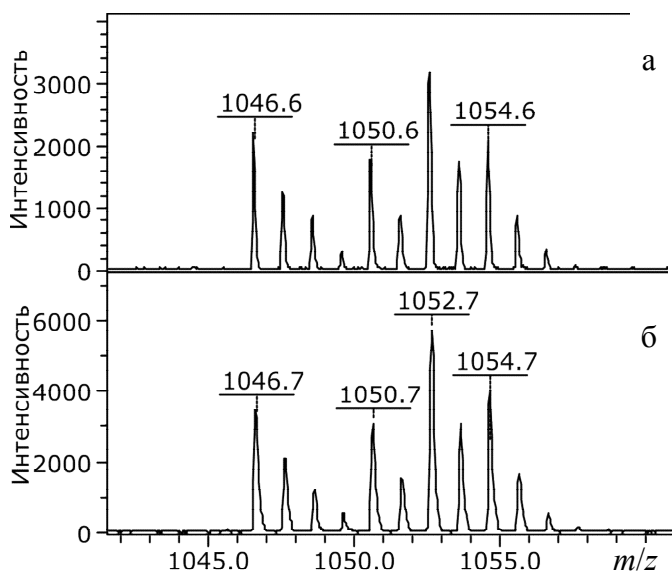


Рис. 2. Фрагменты масс-спектров для ангиотензина II и его стандарта в биологических средах.
а — в сыворотках, б — в бронхиальных смывах

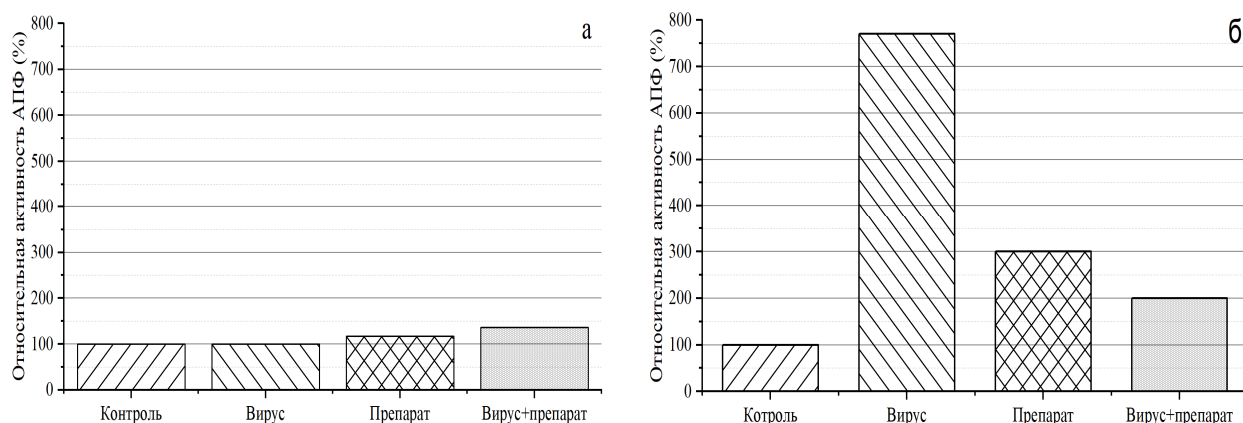


Рис. 3. Активность АПФ в сыворотках (а) и бронхиальных смывах (б) мышей. За 100 % взята активность АПФ у здоровых мышей

На рис. 2 представлены фрагменты масс-спектров гидролизатов для сыворотки (а) и лаважа (б), из которых было рассчитано количество образующегося ангиотензина II, согласно описанной в работе [5] методике.

Полученные данные использовались для вычисления относительной активности АПФ. Результаты этих вычислений представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что разница в активности АПФ в сыворотке не столь существенна (разница между здоровой и зараженной особью не превысила 20 %) в отличие от результатов, наблюдаемых на бронхиальных смывах (увеличение активности АПФ в 8 раз у инфицированных мышей и существенное снижение при приеме препарата практически до нормальных значений).

Масс-спектрометрический контроль за гидролизом брадикинина в сыворотке и лаваже

Количественный масс-спектрометрический контроль за концентрацией брадикинина, привнесенного в сыворотку крови и в лаваж, позволил оценить изменение протеолитической активности при вирусной инфекции по сравнению с контролем.

Аналогично описанному выше исследованию по ангиотензину I проведены исследования активности пептидаз в отношении брадикинина. На рис. 4 и 5 представлены результаты исследований гидролиза брадикинина (продукты гидролиза представлены в таблице) в сыворотке и в лаваже.

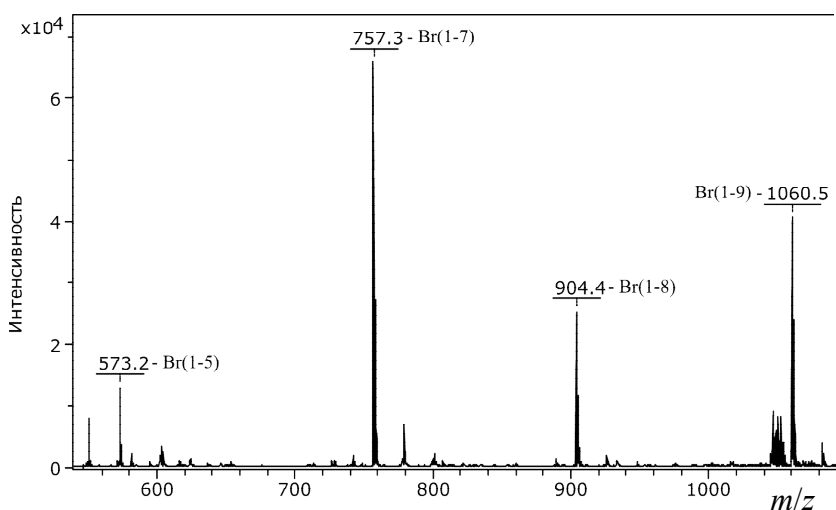


Рис. 4. MALDI-MS брадикинина через 15 мин гидролиза пептидазами в сыворотке крови при 37 °C

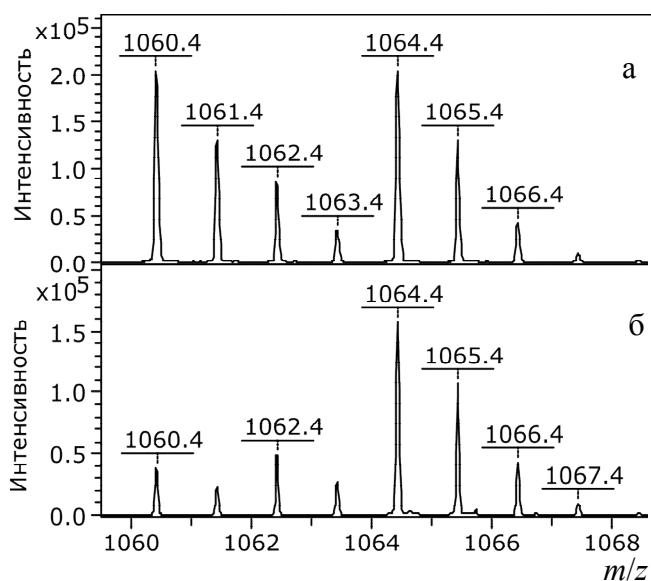


Рис. 5. Фрагменты масс-спектров для брадикинина и его стандарта в биологических средах.
а — в сыворотках, б — в бронхиальных смывах

Аминокислотные последовательности продуктов гидролиза брадикинина

Пептид	Аминокислотная последовательность
Br(1–9) — брадикинин	Арг-Про-Про-Гли-Фен-Сер-Про-Фен-Арг
Br(1–8)	Арг-Про-Про-Гли-Фен-Сер-Про-Фен
Br(1–7)	Арг-Про-Про-Гли-Фен-Сер-Про
Br(1–5)	Арг-Про-Про-Гли-Фен

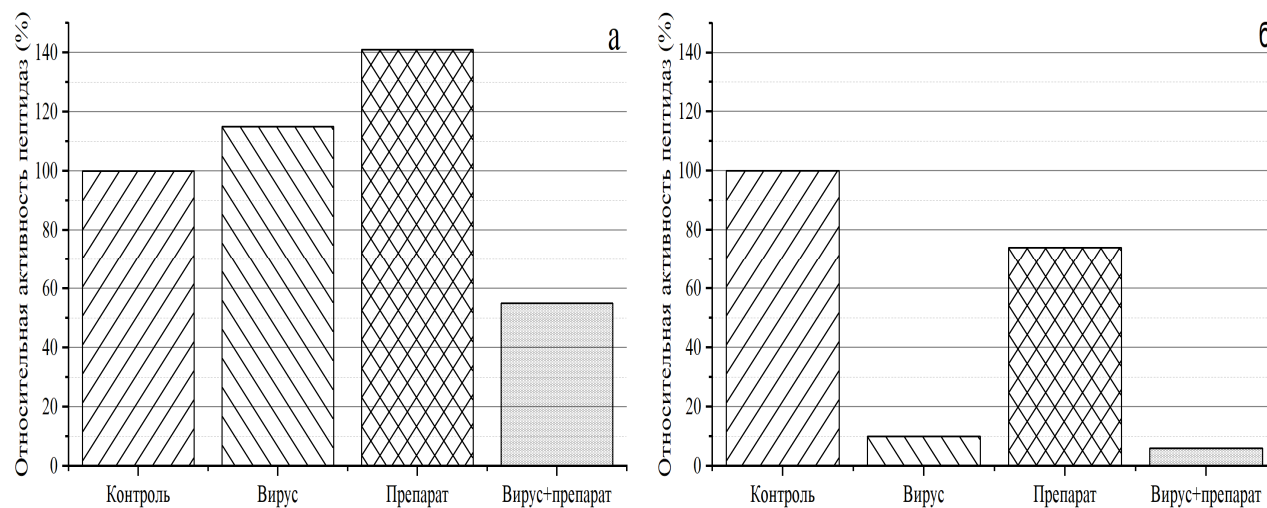


Рис. 6. Активность пептидаз в сыворотках (а) и бронхиальных смывах (б).
За 100 % взята активность пептидаз у здоровых мышей

Из данных экспериментов прежде всего следует, что при гидролизе брадикинина (Br(1–9)) образуется несколько продуктов. Пептид Br(1–8) может быть образован исключительно под воздействием карбоксипептидазы N. В то же время пептиды Br(1–7) и Br(1–5) могут быть продуктами гид-

ролиза брадикинина ангиотензинпревращающим ферментом.

Относительная активность пептидаз по отношению к брадикинину представлена на рис. 6. Концентрация брадикинина оценивалась с использованием в качестве стандарта ^{18}O -брадикинина.

ВЫВОДЫ

Наиболее значимые изменения активности пептидаз происходят в бронхиальных смывах, нежели в сыворотках крови больных животных.

Введение препарата здоровому животному приводит к увеличению активности АПФ, но в значительно меньшей степени по сравнению с инфицированными животными.

При введении препарата больным животным происходит заметное снижение активности АПФ до уровня, соответствующего здоровым животным. Это говорит об избирательности воздействия препарата на ренин-ангиотензиновую систему.

По результатам работы можно сделать общий вывод о том, что подобный скрининг может быть с успехом использован при сравнительной оценке эффективности и других антигриппозных препаратов, а также для понимания направления их воздействия на инфицированный организм.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов, в том числе и финансовых.

Данная работа частично выполнена в рамках НИР 0074-2019-0009, входящей в состав гос. задания № 075-00780-19-02 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ИАП РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pellacani A., Brunner H.R., Nussberger J. Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects // Clin Sci. 1994. Vol. 87, no. 5. P. 567–574. DOI: 10.1042/cs0870567
2. Chandrasoma P., Taylor C.R. Concise Pathology. 3rd ed. Appleton & Lange, 1997. 990 p.

3. Гуреева Т.А., Кугаевская Е.В., Позднев В.Ф., Прозоровский В.Н., Елисеева Ю.Е., Соловьева Н.И. Исследование специфичности нового пептидного субстрата эндотелин-превращающего фермента // Биомедицинская химия. 2007. Т. 53, № 2. С. 172–180.
4. 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 № 2399627. 2008.
5. Козьмин Ю.П., Манойлов А.В., Серебрякова М.В., Миргородская О.А. Прямое введение изотопов ¹⁸O в пептиды и белки для количественного анализа методом масс-спектрометрии // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37, № 6. С. 793–806.

Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург (Протасов А.В., Миргородская О.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Бубляев Р.А.)

Контакты: Бубляев Ростислав Анатольевич,
Bub-slava@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 12.02.2020

QUANTITATIVE MASS SPECTROMETRY IN DIAGNOSTICS OF INFLUENZA AND CONTROL OF ACTION OF THE MEDICINAL PRODUCT "TRIAZAVIRINE"

A. V. Protasov¹, R. A. Bublyayev², O. A. Mirgorodskaya¹

¹*Smorodintsev Research Institute of Influenza of Ministry of Health of the Russian Federation,
Saint Petersburg, Russia*

²*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

To improve the methods for diagnosing and treating influenza, we performed quantitative mass spectrometric studies of the activity of two main carboxypeptidases — angiotensin-converting enzyme and carboxypeptidase-N. The comparison of activity levels of these peptidases was carried out for mice both healthy and influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) virus infected, as well as for treated with the experimental triazavirin anti-influenza drug. An analysis similar to the fulfilled in this work can be successfully used in a comparative assessment of the effectiveness of other anti-influenza drugs, as well as to understand the direction of their effect on the infected organism.

Keywords: angiotensin I, angiotensin converting enzyme, carboxypeptidase-N, bradykinin, quantitative mass spectrometry

REFERENCES

1. Pellacani A., Brunner H.R., Nussberger J. Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects. *Clin Sci.*, 1994, vol. 87, no. 5, pp. 567–574. DOI: 10.1042/cs0870567
2. Chandrasoma P., Taylor C.R. *Concise Pathology*. 3rd ed. Appleton & Lange, 1997. 990 p.
3. Gureeva T.A., Kugaevskaya E.V., Pozdnev V.F., Prozorovskij V.N., Eliseeva Yu.E., Solov'eva N.I. [The study of substrate specificity of a new peptide substrate of endothelin-converting enzyme]. *Biomedicinskaya himiya* [Biomedical chemistry], 2007, vol. 53, no. 2, pp. 172–180. DOI: 10.1134/S1990750807030055
4. Bublyayev R.A., Koz'min Yu.P., Krasnov N.V., Manojlov A.V., Mirgorodskaya O.A., Novikov A.V. *Sposob polucheniya izotopno-modifizirovannykh peptidov i belkov* [A method of producing isotopically modified peptides and proteins]. Patent of RF № 2399627. 2008. (In Russ.).
5. Koz'min Yu.P., Manojlov A.V., Serebryakova M.V., Mirgorodskaya O.A. [Direct introduction of ¹⁸O isotopes into peptides and proteins for quantitative analysis by mass spectrometry]. *Bioorganicheskaya himiya* [Bioorganic chemistry], 2011, vol. 37, no. 6, pp. 793–806. (In Russ.).

Contacts: Bublyayev Rostislav Anatol'evich,
bub-slava@yandex.ru

Article received by the editorial office on 12.02.2020