

МЕТОДЫ ПРОТЕОМИКИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ТРОПНЫХ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА

PROTEOMIC APPROACH IN THE ANALYSIS OF HUMAN TROPIC HORMONES

Д. В. Бабарико^{1,2}, А. А. Вальченко^{1,2}, Е. А. Докучаева², В. Э. Сяхович^{1,2}
D. Babaryko^{1,2}, N. Valchanka^{1,2}, Ya. Dakuchaeva², V. Syakhovich^{1,2}

¹Национальная антидопинговая лаборатория, аг. Лесной, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
sv@antidoping.by

¹National Anti-Doping Laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Тропные гормоны представляют собой подкласс гормонов передней доли гипофиза, реализующих свое физиологическое действие путем стимуляции синтеза и секреции гормонов периферических эндокринных желез либо путем специфического «тропного» воздействия на определенные органы и ткани. Некоторые тропные гормоны являются запрещенными субстанциями во всех видах спорта, в том числе, хорионический гонадотропин человека и гормон роста. В данном исследовании разработаны методические подходы для получения специфических пептидов хорионического гонадотропина человека и изоформ гормона роста с использованием «bottom-up» протеомики и их анализа методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Tropic hormones are a subclass of hormones of the adenohypophysis that realize their physiological activity by stimulating the synthesis and secretion of hormones of peripheral endocrine glands or by specific “tropic” effects on certain organs and tissues. Several tropic hormones are prohibited substances in all sports, including human chorionic gonadotropin and growth hormone. In this study, methodological approach of human chorionic gonadotropin specific peptides and isoforms of growth hormone obtaining using “bottom-up” proteomic and their detection using liquid chromatography-mass spectrometry was developed.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин человека, соматотропный гормон человека, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

Keywords: human chorionic gonadotropin, human growth hormone, high performance liquid chromatography, mass-spectrometry.

Тропные гормоны представляют собой подкласс гормонов передней доли гипофиза, реализующих свое физиологическое действие путем стимуляции синтеза и секреции гормонов периферических эндокринных желез либо путем специфического «тропного» воздействия на определенные органы и ткани. В аденогипофизе вырабатывается ряд тропных гормонов, к которым относятся: адренокортикотропный гормон, тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, хорионический гонадотропин человека, соматотропный гормон, пролактин, меланоцитстимулирующий гормон, липотропные гормоны.

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) секретируется клетками аденогипофиза, плацентарного синцитиотрофобласта, некоторыми нормальными неплацентарными тканями и трофобластическими или нетрофобластическими новообразованиями. ХГЧ по своей химической структуре является гормоном гликопротеидной природы с молекулярной массой около 36,7 кДа, состоящим из двух различных субъединиц α и β [1]. На углеводную часть, характеризующуюся значительной гетерогенностью, приходится около 30 % молекулярной массы белка. Имеются аспарагиновые N- и сериновые O-связанные углеводные цепочки. Также идентифицированы небольшие молекулярные формы ХГЧ. Среди них важное значение имеет β -коровый фрагмент ХГЧ, который состоит из двух пептидов β -субъединицы, соединенных дисульфидными мостиками [2].

Хорионический гонадотропин человека и гормон роста используются спортсменами в качестве допинга и являются запрещенными субстанциями во всех видах спорта. ХГЧ используется спортсменами-мужчинами с целью усиления секреции эндогенных стероидных гормонов при сохранении соотношения тестостерон/эпитестостерон. Гормон входит в списки запрещенных препаратов во всех видах спорта для мужчин в соревновательный и несоревновательный период (класс S2 – пептидные гормоны, ростовые факторы, сходные соединения и миметики).

При определении ХГЧ наиболее часто применяются иммуноферментные методы анализа. В моче существует множество различных видов ХГЧ, таких как интактный ХГЧ, недиссоциированный ХГЧ, свободные α - и β -субъединицы, β -коровый фрагмент и фрагмент карбоксильного концевого пептида. В связи с этим определение ХГЧ производится при использовании различных методов и антител. Всемирное антидопинговое агентство (ВАДА) рекомендует нижний предел обнаружения при анализе ХГЧ 5 МЕ/л (0,106 нг/мл) [3].

В связи с существованием нескольких изоформ ХГЧ выявляемая в составе гормона гетерогенность в значительной мере зависит от особенностей используемого в исследовании метода иммуноанализа. Определение

содержания ХГЧ в моче вызывает трудности связи с более широким спектром изоформ и продуктов распада по сравнению с сывороткой крови.

Соматотропный гормон (соматотропин, гормон роста) является регуляторным белком, имеющим молекулярную массу около 22,11 кДа. Соматотропин построен из одной полипептидной цепи. Кровь человека может содержать порядка 100 разнообразных форм соматотропного гормона. Появление группы вариантов СТГ обусловлено способностью его изоформ с молекулярной массой 20 и 22 кДа образовывать гомо- и гетеродимеры, а также полимеры, включающие до пяти мономерных молекул белка [4].

В роли анаболического агента гормон роста употребляется спортсменами с 1970 г. и входит в список запрещенных субстанций во всех видах спорта.

В настоящей работе разработаны методические подходы для получения специфических пептидов хорионического гонадотропина человека и соматотропина с использованием «bottom-up» протеомики и их анализа методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Гидролиз хорионического гонадотропина проводился с использованием трипсина Proteomics Grade, а гормона роста – комбинациями ферментов трипсин/AspN и трипсин/GluC. Проводили предварительное денатурирование белков с использованием реагента – смесь мочевины, тиомочевины, солей и детергента. Восстановление и алкилирование белков осуществляли набором Proteo Prep Reduction and Alkylation Kit фирмы «Sigma» (США).

Разделение полученных в результате ферментативного гидролиза пептидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенно-фазной микроколонке BioBasic C8 фирмы «Thermo» с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity LC System.

Масс-спектрометрическая детекция осуществлялась на высокочувствительном масс-спектрометре Agilent 6550 iFunnel Q-TOF. Ионизацию образца проводили электрораспылением с использованием источника Dual AJS ESI.

В связи с коммерческой доступностью только основной изоформы гормона роста человека (изоформы 1) разработку подходов к хромато-масс-спектрометрическому определению данного гормона проводили с использованием стандарта этой изоформы.

Проводилось моделирование расщепления хорионического гонадотропина человека для масс-спектрометрического выявления трипсином. Моделирование расщепления гормона роста проводилось следующими ферментами и их комбинациями: трипсин, эндопротеиназа GluC, трипсин и эндопротеиназа AspN, трипсин и эндопротеиназа GluC. С использованием программного обеспечения Protein Calculator («Thermo») были рассчитаны теоретические значения m/z для всех пептидов хорионического гонадотропина человека и соматотропина при степенях протонирования +1, +2, +3, +4. Расчет молекулярных масс пептидов производили с учётом модификации цистеинов данного белка йодацетамидом.

На масс-спектрометрический анализ влияет размер фрагмента пептида и наличие сайтов гликозилирования. Наиболее оптимальными являются пептиды размером от 5 до 15 аминокислот. Пептиды более 15 аминокислот затрудняют масс-спектрометрическое определение, а пептиды менее 5 аминокислот близки по массе к малым органическим молекулам и являются сравнительно неспецифическими.

При идентификации полученных пептидов хорионического гонадотропина человека внимание уделялось специфичности для β -субъединицы и β -корового фрагмента. Основным направлением при определении гормона роста является выявление пептидов, специфических для его изоформ и их соотношения.

Оценка эффективности определения гормона роста с использованием различных ферментов показала, что степень раскрытия аминокислотной последовательности белка составляет при гидролизе трипсином 73 %, при использовании комбинации трипсин/AspN – 57 % и 50 % для комбинации ферментов трипсин/GluC. На рис. 1 изображена хроматограмма и масс-спектр пептида гормона роста, образующегося при гидролизе белка трипсином.

Было идентифицировано более 90 % пептидов альфа- и бета- субъединицы ХГЧ. При анализе пептидов, полученных после триптического гидролиза было установлено, что 4 пептида, полученных при расщеплении β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, соответствуют пептидам, которые образуются при гидролизе бета-корового фрагмента – конечного продукта деградации белка.

Разработанный подход определения хорионического гонадотропина человека был апробирован на образцах мочи с внесенным ХГЧ в различных концентрациях. Очистку и концентрирование образцов проводили методом ультрафильтрации.

Была изучена чувствительность метода и роль матрицы на процесс ферментативного гидролиза и последующий инструментальный анализ, а также необходимость и влияние различных видов денатурации белка (тепловая, химическая и их комбинация) на выход пептидов и гликопептидов. Анализ данных показал присутствие всех пептидов ХГЧ в образцах мочи.

Для предварительного определения предела обнаружения белка при использовании времяпролетного масс-спектрометра были проанализированы пробы с концентрациями белка 0,5, 1 и 5 мкг/мл в моче.

Особое внимание в рамках настоящего исследования было уделено определению и характеристике гликопептидов хорионического гонадотропина человека. Белок имеет в своей структуре 8 сайтов гликозилирования – 4 сайта N-гликозилирования и 4 сайта O-гликозилирования.

В ходе анализа хромато-масс-спектрометрических данных были найдены ионы, массы которых не совпадают с массами немодифицированных пептидов данного белка, в 2–3 раза превышая их значения, и представляют собой гликопептиды хорионического гонадотропина человека.

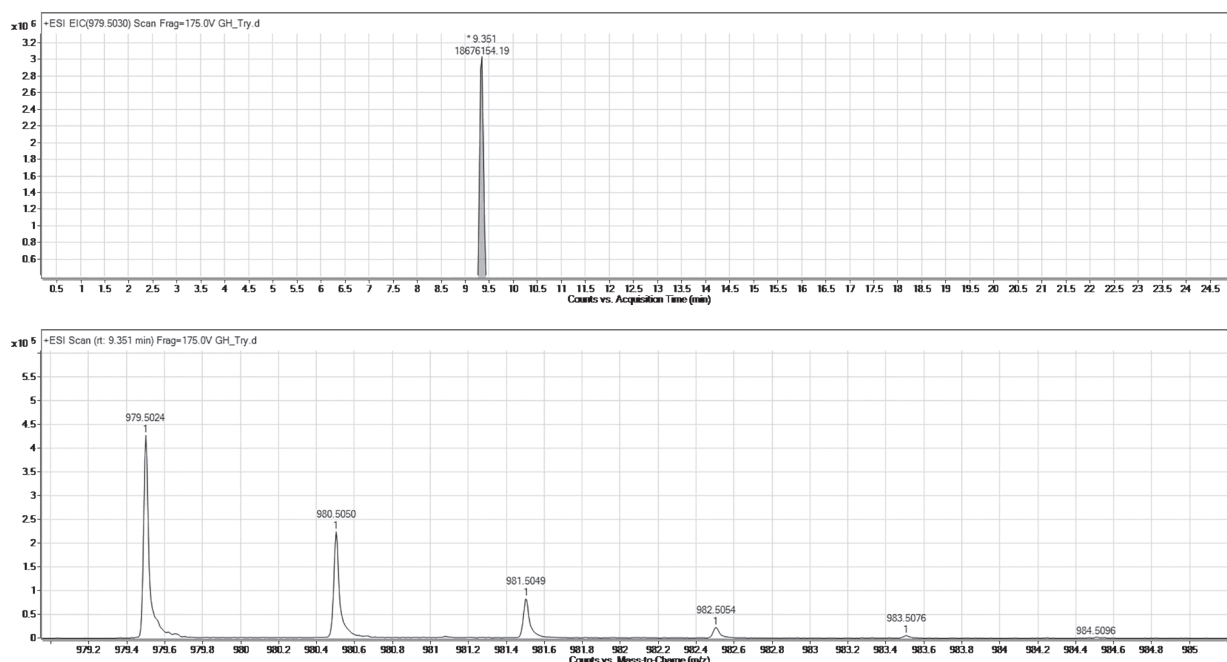


Рисунок 1 – Хроматограмма и масс-спектр пептида соматотропина человека LFDNAMLRL с m/z 979,0296 при степени протонирования +1

С использованием программного обеспечения GlycanMass и Glycomod («ExPASy») были моделированы структуры, соответствующие этим пептидам. С точностью в пределах одного ppm были выявлены пептиды, подвергшиеся модификации, а также проведен анализ качественного состава гликанов.

На рис. 2 изображен масс-спектр и структура олигосахаридной цепи одной из изоформ пептида EGCPVCIT-VNTTICAGYCPTMTR β -субъединицы. Гликопептид имеет трех-антенную структуру, содержащую по 3 остатка N-ацетилглюкозамина, галактозы и 1 остаток N-ацетилнейраминовой кислоты. Одновременно, выявлена вторая изоформа вышеописанного гликопептида. Моделирование олигосахарида на основе данных масс-спектрометрии свидетельствует о наличии фукозилированной коровой части с двух-антенной структурой, содержащей по 2 остатка N-ацетилглюкозамина, галактозы и N-ацетилнейраминовой кислоты.

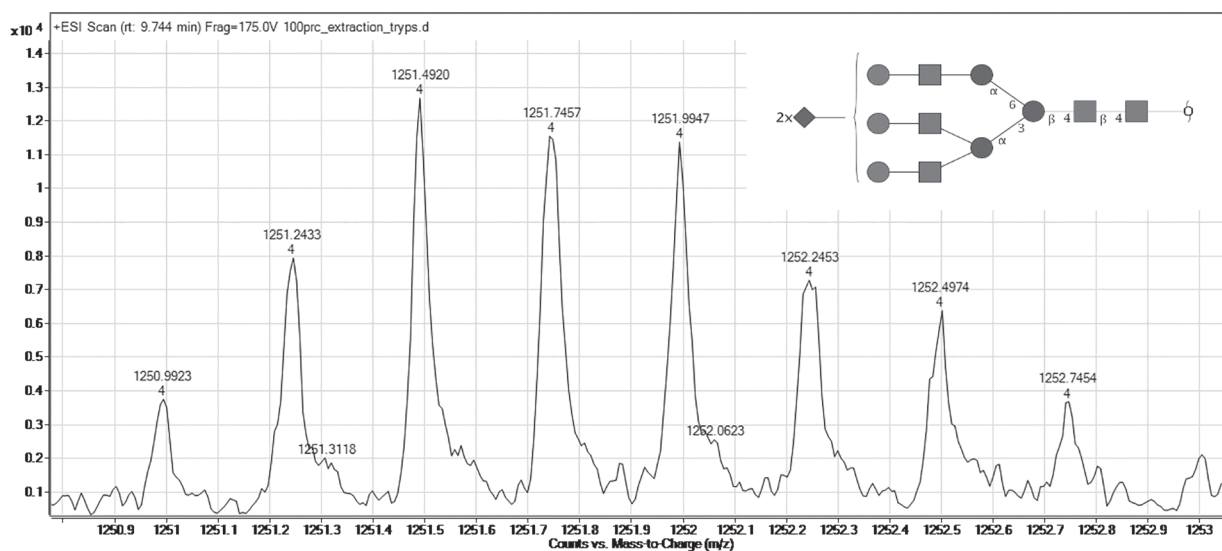


Рисунок 2 – Масс-спектр одной из изоформ гликопептида хорионического гонадотропина человека EGCPVCIT-VNTTICAGYCPTMTR с m/z 1250,9923 при степени протонирования +4 и структура олигосахаридной цепи

В данной исследовательской работе были разработаны методические подходы для определения хорионического гонадотропина и соматотропина человека методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с использованием «bottom-up» протеомики. Была проведена апробация методики определения ХГЧ на образцах мочи, содержащих известную концентрацию целевого гормона. С использованием методов гликомики проведен анализ структуры гликопептидов ХГЧ, детектированных при «bottom-up» исследовании. На примере основной изоформы гормона роста разработан подход к ферментативному гидролизу и хромато-масс-спектрометрическому анали-

зу данного белка. Полученные результаты будут использованы при разработке метода количественного определения тропных гормонов в моче человека для лабораторного этапа допинг-контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peptide structure of the α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma / M. M. Elliott [et al.] // Carbohydrate and Endocrine. – 1997. – № 7. – P. 15–32.
2. Medeiro, S. F. Human chorionic gonadotropin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights / S. F. Medeiro, R. J. Norman // Human Reproduction Updates. – 2009. – № 15. – P. 69–95.
3. The 2018 prohibited list. International standard : World Anti-Doping Agency, 2018. – 3 p.
4. Baumann, G. Growth Hormone Binding Protein 2001 / G. Baumann // Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism. – 2001. – V. 14. – P. 355–375.

ОЦЕНКА АДАПТАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ДЕТЕЙ С НИЗКОРОСЛОСТЬЮ, ИМЕЮЩИХ ОГРАНИЧЕНИЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

ASSESSMENT OF ADAPTIVE ABILITIES OF CHILDREN WITH SHORT STATURE AND ALIMITATION OF LIFE ACTIVITY

В. В. Голикова^{1,2}, И. Т. Дорошенко³

V. Golikova^{1,2}, I. Doroshenko³

¹Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь
tori.golikova@inbox.ru

³РНПЦ медицинской экспертизы и реабилитации, г. Минск, Республика Беларусь
irinadoroshenko@gmail.com

¹Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

³National Science and Practice Centre of Medical Assessment and Rehabilitation, Minsk, Republic of Belarus

Длительное влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на здоровье ребенка истощают его адаптационные механизмы, ухудшают функциональное состояние органов и систем и ведут к прогрессированию различных заболеваний. Оценка адаптационных возможностей является одним из методов изучения структурно-функциональной стабильности организма ребенка. Целью исследования было изучение адаптационных возможностей детей, имеющих ограничение жизнедеятельности вследствие синдромов и заболеваний, проявляющихся низкорослостью. В ходе исследования установлено, что у детей с низкорослостью, имеющих ограничение жизнедеятельности вследствие низкого роста, резервы адаптационных возможностей значительно снижены, а нагрузки, связанные с ведущей возрастной деятельностью присущей ребенку, могут восприниматься как равные стресс-нагрузкам их здоровых сверстников.

Long-term effects of unfriendly environmental factors on the health of the child deplete its adaptation mechanisms, impair functional status and lead to the progression of various diseases. Assessment of adaptive abilities is one of the methods for studying the structural and functional stability of the child's body. The aim of the study was to study the adaptive abilities of children with disabilities due to the syndromes and diseases manifested by short stature. The study found that children with short stature with limited life due to low growth, the reserves of adaptive abilities are significantly reduced, and the load associated with the leading age activity inherent in the child, can be perceived as equal to the stress loads of their healthy peers.

Ключевые слова: адаптационные возможности, адаптация, низкорослость, ограничение жизнедеятельности.

Keywords: adaptive abilities, adaptation, short stature, limitation of life activity.

Одним из приоритетных направлений государственной политики Республики Беларусь является охрана окружающей среды. Сбережение экологически благоприятной среды обитания является неотъемлемой частью общего социально-экономического процесса улучшения качества жизни населения [1], особенно детского возраста.

Общеизвестно, что длительное воздействие неблагоприятных экологических факторов может привести к истощению адаптационных механизмов организма и является более опасным, чем бедствия, которые сопровождаются одноразовым стрессовым воздействием. Так, например, у детей старшего школьного возраста, проживающих на экологически загрязненных территориях, имеются признаки высокого и выше среднего уровня экологических стрессов [2; 3].