

СИНТЕЗ ХРОМОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРА VIII

Грибовская О.В.¹, Мартинович В.П.¹, Голубович В.П.¹, Расюк Е.Д.²

*Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии
НАН Беларуси», Минск*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск*

Фактор VIII (FVIII) – плазменный гликопротеин, один из важнейших элементов системы гемостаза [1], выполняющий роль кофактора, ускоряющего коагуляционные превращения по внутреннему пути. Фактор VIII циркулирует в крови в виде нековалентно связанного с фактором Виллебранда комплекса, в котором доля фактора VIII составляет 2% от общей массы структуры. Фактор VIII, являясь кофактором внутреннего пути коагуляционных превращений, ускоряет активацию фактора X (FX). Плазменный фактор Виллебранда выполняет роль транспортного белка, способствуя сохранению и стабилизации фактора VIII.

Фактор VIII (FVIII) измеряется в плазме в случае необходимости диагностики и лечения врожденных и приобретенных гемофилий, в особенности гемофилии А, врожденных пороков фон Виллебранда, для оценки риска тромбофилии и в других случаях. Его специфическая активность направлена на протеолиз фактора X и протекает при обязательном участии фактора IX. Измерение концентрации фактора VIII в плазме крови проводят двумя основными методами: клоттинговым и хромогенным. FVIII представляет собой сериновую протеазу, пептидные субстраты для него имитируют сайты расщепления природных белковых субстратов.

Одностадийный клоттинговый анализ FVIII на основе образования фибринового сгустка является наиболее применяемым в клинических лабораториях [2, 3]. Он основан на измерении способности образца плазмы пациента сокращать активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) FVIII-дефицитной плазмы. Для проведения анализа исследуемый образец предварительно инкубируют с реагентом АЧТВ, который содержит контактный активатор (например, эллагиновую кислоту, каолин, диоксид кремния, клетчатку) и фосфолипид, затем добавляют хлорид кальция для стимулирования образования сгустка фибрина. Концентрация FVIII в образце пациента считается детерминантой, определяющей скорость времени свертывания крови. Результат сравнивается со стандартом – графиком, полученным из образцов, содержащих известные активности FVIII (например, серийные разведения стандартной эталонной плазмы). Разработан двухстадийный клоттинговый анализ активности FVIII с генерацией фактора Ха на первой стадии и добавлением фибриногена и протромбина на второй [4]. Однако точность всех вариантов клоттингового метода невысока.

Хромогенный анализ активности FVIII основан на аналогичных биохимических превращениях, за исключением последней стадии. На первом этапе анализа (с неизвестным количеством функционального FVIII) в реакционной смеси, состоящей из тромбина или протромбина, FIXa, FX, кальция и фосфолипида образуется FVIIIa, который совместно с FIXa активирует FX. Предполагается, что количество образующегося FXa пропорционально количеству функционального FVIII, присутствующего в образце [2, 5, 6]. Второй этап анализа состоит в определении FXa посредством расщепления FXa-специфичного пептидного п-нитроанилидного субстрата. Высвобождается п-нитроанилин, давая окрашивание, интенсивность которого можно измерить фотометрически по абсорбции при 405 нм. Полученное значение абсорбции прямо пропорционально количеству функционального FVIII, присутствующего в образце, которое определяют на основе калибровочного графика. Таким образом, используемый субстрат должен быть специфичен относительно FXa.

В настоящее время при определении FVIII в основном используются 2 высокоспецифичных хромогенных субстрата: S 2765 Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA и S 2222 Bzl-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA [6, 7]. Возможно проведение хромогенного метода двумя способами: по кинетике образования хромогена под действием активированного фактора или по конечной точке накопления хромогена за определенное время инкубации.

Методики определения фактора VIII, включающие несколько стадий, принадлежат к числу сложнейших [3, 4]. Синтез субстрата S2765, используемого для определения FVIII, также представляет сложную проблему, так как наличие в структуре двух гуанидиновых групп может служить источником различных побочных реакций.

С целью создания количественного метода определения FVIII в плазме крови разработаны методы синтеза его хромогенных пептидных субстратов: Z-DArg-Gly-Arg-pNA, известного как S-2765 и его оригинального тетрапептидного субстрата Z-Gly-DArg-Gly-Arg-pNA. Модификация проведена с целью повышения субстратной специфичности и усовершенствования технологии синтеза субстратов за счет использования более доступного и дешевого исходного соединения – Z-Gly-OH.

Разработанная схема синтеза субстратов включает (рисунок) присоединение 4-нитроанилида к дипептидному фрагменту Boc-Gly-Arg-OH и присоединение Z-Gly-DArg-OH или Z-DArg-OH на заключительной стадии. Защита гуанидиновой группы аргинина на всех стадиях синтеза осуществлялась протонированием. При получении дипептида Boc-Gly-Arg-OH протонирование проходило за счет образования внутренней соли между карбоксилем и гуанидиновой группой аргинина, при синтезе Z-DArg-Gly-Arg-pNA и его тетрапептидного аналога исходные компоненты конденсации Z-Gly-DArg-OH или Z-DArg-OH и H-Gly-Arg-pNA·2HCl перемешивали в

диметилформамиде в течение 30 минут для перехода протона с аминогруппы $\text{H-Gly-Arg-pNA}\cdot 2\text{HCl}$ на гуанидиновую группу остатка *D*-аргинина. В качестве основного конденсирующего агента использовали дициклогексилкарбодиимид (DCC) с добавлением 1-оксибензотриазола (HOBT) как противорацемической добавки. *C*-концевой дипептид Boc-Gly-Arg-OH получали методом активированных эфиров, с использованием сукцинимидного эфира Boc-Gly-OH , который вводили в реакцию с аргинином без выделения. Идентификацию целевых соединений выполняли методом масс-спектрометрии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

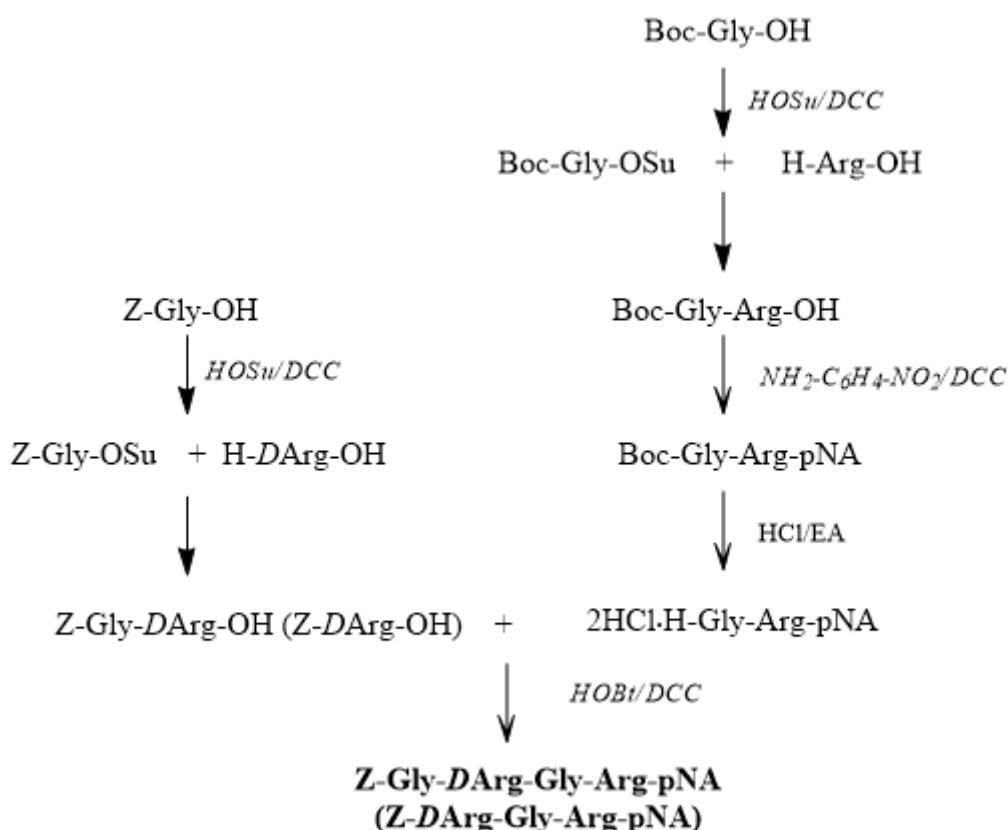


Рисунок – Схема синтеза субстратов $\text{Z-DArg-Gly-Arg-pNA}$ и $\text{Z-Gly-DArg-Gly-Arg-pNA}$.

Полученные соединения будут использованы при разработке диагностических наборов для количественного определения FVIII.

Литература

1. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation // *Thromb. Haemost.* 1999. Vol. 82. P. 165–174.
2. Damgaard M., Hillarp A., Potgieter J.J. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A // *Eur J Haematol.* 2015. Vol. 94. P. 38–44.

3. Barrowcliffe T.W., Hubbard A.R., Raut S., Sands D. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: general aspects, standardization, and recommendations // *Semin. Thromb. Hemost.* 2002. Vol. 28(3). P. 247–256.
4. Funk D. M., Moser K.A. Chromogenic factor VIII activity assay // *American Journal of Hematology.* 2014. Vol. 89. P. 781–784.
5. Kershaw G., Kitchen S., Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX – chromogenic and one-stage assays issues // *Haemophilia.* 2016. Suppl 5. P. 72–77.
6. Kingdon H.S., Lundblad R.L., Mann K.G., White G.C. Issues with the assay of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates // *Thromb Haemost.* 2000. Vol.84. P. 942–948.
7. Gosselin R., Kitchen S., Tiefenbacher S. Factor Activity Assays for Monitoring Extended Half-Life FVIII and Factor IX Replacement Therapies // *Semin. Thromb. Hemostasis.* 2017. Vol. 43(3). P. 331–337.