Разработка тест-системы для оценки антигликирующего эффекта биологически активных веществ лекарственных растений

Вашурина Н.[1]*, Дубровский Я.[2,3], Соболева А.[1,4], Фролов А.[1,4]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра Биохимии, Санкт-Петербург, Россия; [2]Санкт-Петербургский государственный университет, Институт Химии, Санкт-Петербург, Россия; [3]ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия; [4]Институт биохимии растений им. Лейбница, Департамент Биоорганической Химии, Халле, Германия;

vashurina.nat@yandex.ru

Введение

Гликирование белков, сопровождающееся образованием конечных продуктов глубокого гликирования (КПГГ), оказывает существенное влияние на развитие осложнений сахарного диабета, патогенез болезни Альцгеймера и рака. В этом контексте химические вещества, ингибирующие гликирование белков, могут являться перспективными антидиабетическими и нейропротекторными агентами. Действительно, на сегодняшний день препараты, обладающие антигликирующей активностью, такие как аминогуанидин, хорошо зарекомендовали себя при лечении осложнений диабета. Однако высокая токсичность этих веществ ограничивает их клиническое применение. Поэтому, природные соединения, выделяемые из лекарственных растений, представляют собой богатый источник новых перспективных фармацевтических срадств и пищевых добавок, способных подавлять образование КПГГ. Однако для быстрого и эффективного скрининга растительных экстрактов, фракций и отдельных соединений необходимы адекватные и воспроизводимые аналитические методы.

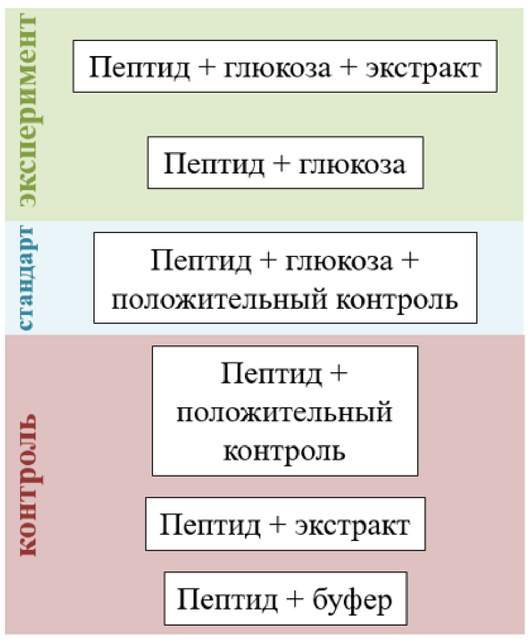
Методы

Предлагаемая тест-система будет основана на *in vitro* инкубациях (1, 3, 7, 14 и 21 день) растительных экстрактов и отдельных природных соединений в присутствии реакционных смесей Майяра. Эти смеси будут содержать 0,5 ммоль/л *D*-глюкозы в натрий-фосфатном буфере (pH 7,2) и эквимолярные количества модельных синтетических пептидов Ac-AFGSAKASGA-NH_2 и Ac-AFGSARASGA-NH_2, рутинно используемых для моделирования реакции Майяра *in vitro*.

	Моноизотопная масса	$[M+H]^+$ ион	$[M+2H]^{2+}$ ион	$[M+3H]^{3+}$ ион
Ac-AFGSAKASGA-NH_2	906.4558	907.4637	454.2357	303.1597
Ac-AFGSARASGA-NH_2	934.4620	935.4698	468.2388	312.4951

Табл.1 Характеристики используемых пептидов

Схема инкубации



Пептиды 0,75 нмоль/л
Ac-AFGSAKASGA-NH_2
Ac-AFGSARASGA-NH_2

Глюкоза 5 ммоль/л

Экстракты:
- Водный экстракт из надземных частей *Geum rivale* 33.3 мкг/мл
- Этилацетатный экстракт из надземных частей *Geum rivale* в этилацетате 33.3 мкг/мл

Стандарты (образцы сравнения):
- Аминогуанидин 5 ммоль/л
- Розмариновая кислота 0,4 мг/мл

Буфер:
$FeSO_4$ 0,18 моль/л
Na_2HPO_4-NaH_2PO_4, pH 7.0 100 ммоль/л

Каждая проба была приготовлена в четырех репликатах

Оптимизация метода ЖХ-МС

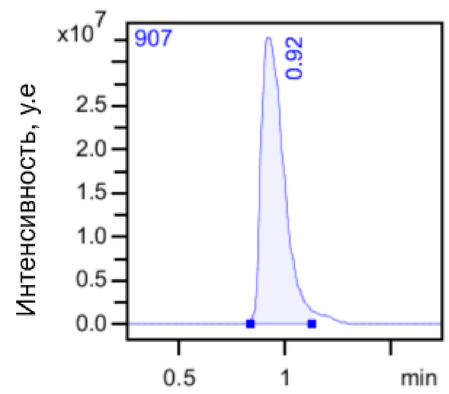
Табл. Стандартное разведение пептидов

Концентрация пептида (пкмоль/мкл)
500
250
100
50
25
10
5
2.5
1
0.5
0.25
0.1
0.05
0.025
0.01

ЖХ метод
- Колонка: Acquity UPLC CSH 130 C18 1.7 мкм 1.0x50 мм (# 186006933) “Waters”
- Температура колонки: 45°C
- Объем инжекции: 50 мкл
- Растворители: A: 0.1% (v/v) муравьиная кислота
  B: ацетонитлрил, 0.1% (v/v) муравьиная кислота
- Скорость потока: 0,300 мл/мин

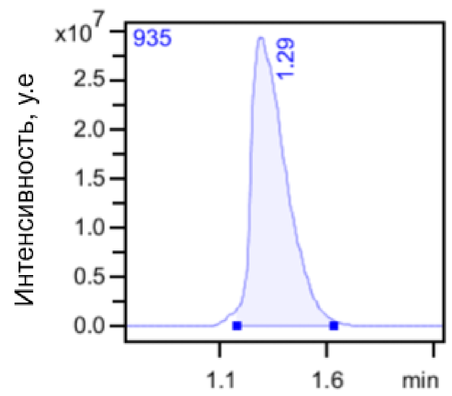
Каждая проба была приготовлена в трех репликатах

МС анализ проводился в режиме регистрации положительных ионов (positive mode)
Спектры были получены в диапазоне *m/z* 350–1300



Время удерживания, мин

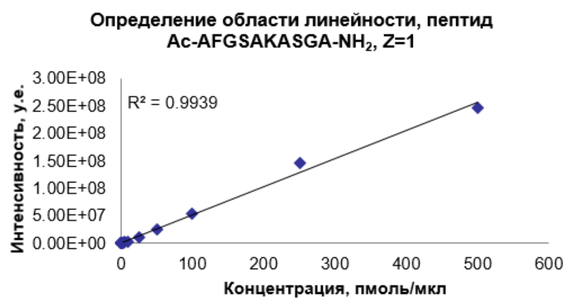
Экстрагированная ионная хроматограмма при *m/z* = 907 ± 0.02, соответствующая $[M + H]^{1+}$ иону пептида Ac-AFGSAKASGA-NH_2

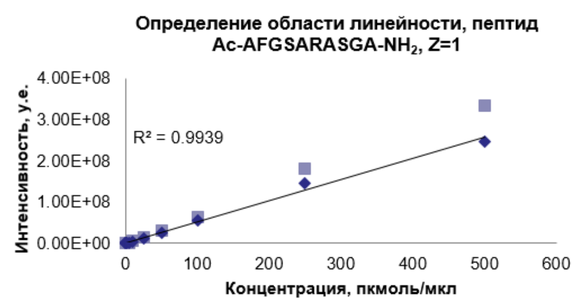


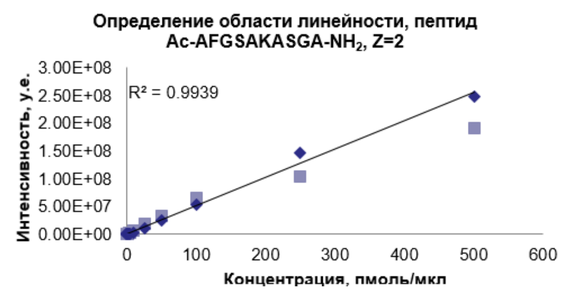
Время удерживания, мин

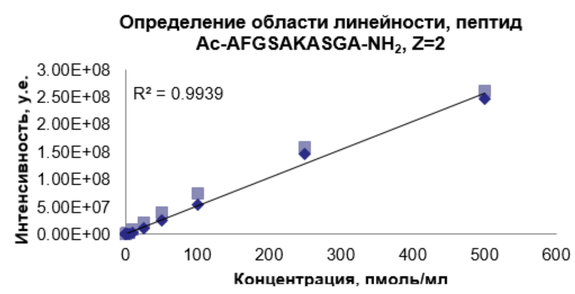
Экстрагированная ионная хроматограмма при *m/z* = 935 ± 0.02, соответствующая $[M + H]^{1+}$ иону пептида Ac-AFGSARASGA-NH_2

***ЖХ-МС – жидкостная хроматография, масс-спектрометрия**









По результатам эксперимента, максимальное значение количества вещества (500 пкмоль), находящееся в области линейности, было выбрано для последующего масс-спектрометрического анализа. Разведение пептида с концентрацией 0.01-0.1 пкмоль лежит в области линейности, следовательно, не были достигнуты пределы обнаружения (LOD) и пределы количественного определения (LOQ), что связано высокой чувствительностью прибора

Результаты и обсуждения

На следующем этапе будет протестирован набор лекарственных растений. Для этого будут рассмотрены 22 вида астрагалов, собранных в разных регионах Узбекистана. Метанольные экстракты будут приготовлены и проанализированы с помощью UHPLC-QqTOF-MS параллельно со скринингом на антигликирующие эффекты. Перед исследованием свойств максимальная концентрация нетоксичного экстракта будет определена в тестах жизнеспособности клеток (MTT-тест) с SH -SY5Y клетки нейробластомы человека с использованием установленных методов.