

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ЕНЗИМ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ У ПЛАЗМІ КРОВІ ДОНОРІВ ЗА УМОВИ НАЯВНОСТІ АНТИ-SARS-CoV-2 IgG

Рачковська А.М., Креницька Д.І., Калашнікова М.В.

ННЦ «Інститут біології і медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

вул. Глушкова 2, м. Київ, Україна, 02000

e-mail: tonia01128@gmail.com

Вступ. Дослідження ферментативної активності за допомогою ензим-електрофоретичних методів представляє собою неабияку цінність як для наукових, так і для біотехнологічних доробок, що є одним з важливих етапів при вдосконаленні вже існуючих та впровадженні нових біотехнологічних продуктів. В умовах сьогодення – пандемія COVID-19 – глобальною проблемою біотехнологічної галузі є швидка та ефективна розробка потенційних лікарських засобів для боротьби з вірусом SARS-CoV-2: від препаратів для захисту від інфекційного ураження – вакцини, до препаратів для лікування пост-COVID-19 патологічних станів. Зважаючи на те, що SARS-CoV-2 інфекція може призвести до порушень процесів згортання крові, особлива увага наразі зосереджується на пошуку нових терапевтичних засобів, що є перспективними для лікування коагулопатій у пост-COVID-19 періоді. Тим не менш одним із важливих аспектів для раціонального виробництва таких препаратів є дослідження активності протеолітичних ферментів у кровотоці. З економічної точки зору доцільним є попередня оптимізація методики ензим-електрофорезу для практичного використання при оцінці ферментативної активності у зразках плазми крові.

Таким чином **мета нашої роботи** – це модифікація методики ензим-електрофорезу з використанням фібриногену як субстрату для аналізу ферментативної активності у плазмі крові донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG.

Матеріали та методи. У дослідженні взяли участь здорові люди, які одужали від COVID-19 3-6 місяців тому та погодилися стати донорами плазми крові для біотехнологічних цілей компанії «БІОФАРМА-ПЛАЗМА» (Київ, Україна). Плазму крові було перевірено низкою стандартних скринінгових тестів для виключення патологічних станів. Нам було передано плазму крові донорів з визначеними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG для наукових досліджень. З плазми крові донорів було отримано еуглобулінові фракції двома способами: перший – без додавання стрептокінази; другий – зі стрептокіназою, необхідної для активації плазіногену. Стандартний буфер для приготування електрофоретичних зразків об'ємом 50 мкл було додано до отриманих еуглобулінових фракцій. Ензим-електрофорез проводили згідно з методикою [1] з відповідними модифікаціями.

Результати та обговорення. У ході оптимізації методики ензим-електрофорезу для вивчення ферментативної активності у плазмі крові донорів було досліджено та модифіковано такі параметри – концентрація електрофоретичних зразків, концентрація фібриногену як субстрату,

концентрація розділяючого гелю, тривалість електрофоретичного розділення, час інкубації гелю для проявлення ферментативної активності.

Перш за все необхідно було визначити концентрація фібриногену як субстрату для цільових протеолітичних ферментів, що потенційно присутні у плазмі крові досліджуваних груп. Встановлено, що оптимальна концентрація фібриногену складає 1 мг/мл. Експериментальним шляхом з'ясовано, що найбільш доцільно використовувати концентрацію розділяючого гелю 12 % з метою запобігання міграції фібриногену як субстрату крізь гель. Для ензим-електрофоретичного дослідження еуглобулінових фракцій без додавання стрептокінази найбільш ефективно розведення електрофоретичних зразків становить у співвідношенні 1:8, за якого спостерігали найефективніше проявлення ферментативної активності. Тоді ж для еуглобулінових фракцій зі стрептокіназою – 1:16.

Окрім наведеного вище, також було з'ясовано, що оптимальна тривалість електрофоретичного розділення після виходу лінії бромфенолового синього за межі гелю становить 10 хвилин. Для ліквідації залишків додецилсульфату-натрію отримані гелі інкубували у розчині 2,5 % Тритон X-100 протягом години. Подальша інкубація у Трис-НСІ буфері (рН 7,4) відбувалася при 37 °С упродовж 12 годин для проявлення ферментативної активності. Фіксацію та фарбування гелів здійснювали згідно з стандартним протоколом [2]. Оптимізація методики ензим-електрофорезу з використанням фібриногену як субстрату забезпечує проведення дослідження протеолітичної активності ферментів у плазмі крові за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG. Отримані результати наведені на Рис. 1-2.

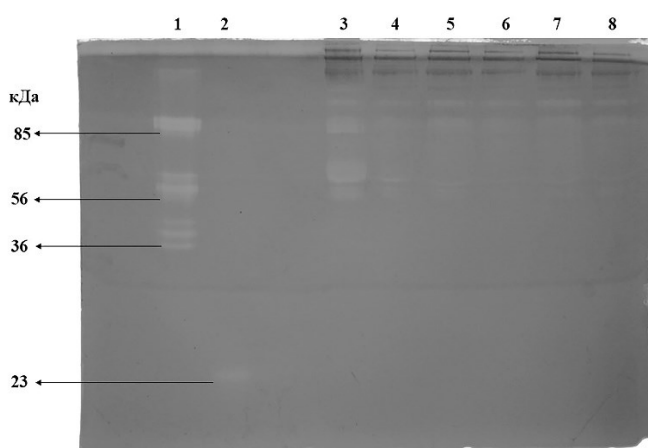


Рис. 1. Типова ензим-електрофореграма еуглобулінових фракцій, отриманих з плазми крові донорів, без стрептокінази: 1, 2 – маркери; 3-8 – дослідні зразки

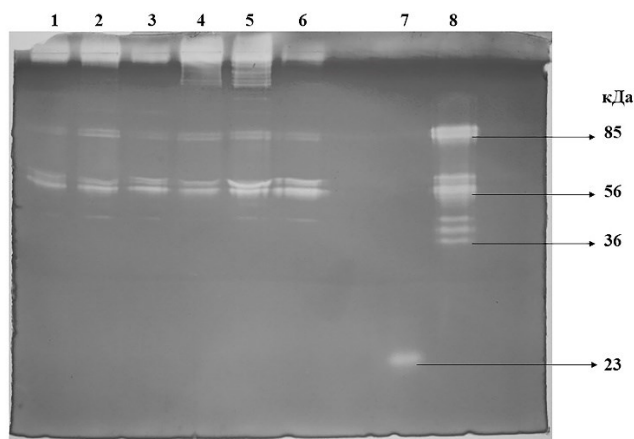


Рис. 2. Типова ензим-електрофореграма еуглобулінових фракцій, отриманих з плазми крові донорів, зі стрептокіназою: 1-6 – дослідні зразки; 7, 8 - маркери

Відповідно до результатів дослідження, у плазмі крові донорів присутні білкові фракції з ферментативною активністю у різному діапазоні молекулярних мас, серед яких найбільшу протеолітичну активність виявляють молекули плазмінового пулу (36-85 кДа), Рис. 1. Більше того, на Рис. 2 за умови додавання стрептокінази у плазму крові для потенційної активації у повній мірі молекул

плазмінового походження показано зростання ферментативної активності порівняно з Рис. 1. Крім того, отримані результати свідчать про появу протеолітичної активності у складі білкових фракцій з молекулярною масою > 85 кДа, що можуть бути комплексними сполуками, утвореними молекулами плазмінового походження, та представляють окремий інтерес у подальших дослідженнях.

Обрахунок ензим-електрофореграм дозволяє нам проаналізувати та порівняти отримані результати ферментативної активності серед різних груп донорів. У Табл. 1 представлено узагальнюючі результати порівняння груп донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 0 та $\geq 10 \pm 3$ Index (S/C).

Таблиця 1. Відсоткове співвідношення білків різної молекулярної маси, що виявляють ферментативну активність у зразках плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG

| Група | Зразки без стрептокінази | | | Зразки зі стрептокіназою | | |
|---|--------------------------|-----------|----------|--------------------------|-----------|----------|
| | > 85 кДа | 85-36 кДа | < 36 кДа | > 85 кДа | 85-36 кДа | < 36 кДа |
| Донори з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Index (S/C) | 36,7 % | 63,3 % | 0 % | 31,3 % | 68,7 % | 0 % |
| Донори з титром анти-SARS-CoV-2 IgG $\geq 10 \pm 3$ Index (S/C) | 18,0 % | 55,6 % | 26,4 % | 71,4 % | 28,6 % | 0 % |

Отож правильний підбір методики ензим-електрофорезу з метою аналізу активності протеолітичних ферментів у плазмі крові є важливим етапом для діагностики порушень процесів згортання крові у людей, які одужали від COVID-19. Також що є не мало важливим – цей метод може знайти застосування на різних етапах біотехнологічних розробок за участі білкових молекул, що володію ферментативною активністю.

Висновки. Такий підхід постановки та проведення ензим-електрофорезу з використанням фібриногену як субстрату є ефективним за необхідності дослідження ферментативної активності цільових білкових молекул у плазмі крові донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG. Модифікована нами методика ензим-електрофорезу забезпечує можливість детекції ферментативної активності переважно молекул плазміноген/плазміну та їх аномальних форм, що може стати перспективним у дизайні нових біотехнологічних препаратів.

Список використаної літератури:

1. Ostapchenko, L., Savchuk, O., Burlova-Vasilieva, N. (2011). Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2 (1), pp. 20-26.
2. Protein Electrophoresis. (1999). Technical manual, Amersham Biosciences Inc.