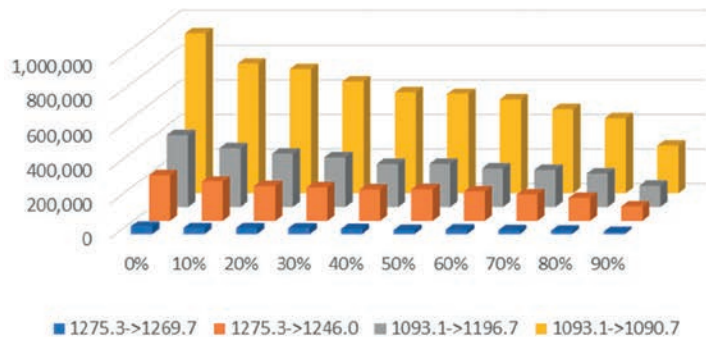


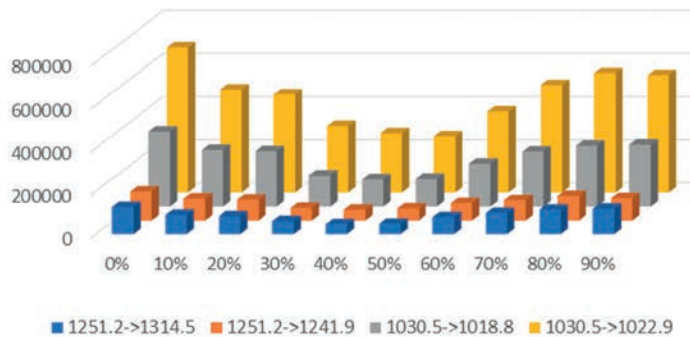
IGF-1

Peak Area vs. Human Urine %



TNF

Peak Area vs. Human Urine %



Vplyv matrice (ľudský moč) na stanovenie proteínov IGF-1 a TNF

Len ich neštiepte

Nové prístupy v analýze intaktných proteínov v komplexných biologických vzorkách

„Nie, nie a stokrát nie! Za žiadnych okolností nesmiete dovoliť, aby sa tieto proteíny pri vašej práci akokoľvek naštiepili! Musíte ich analyzovať tak, ako sú – intaktné. Iba tak získate výsledky, ktoré vám budú maximálne užitočné.“ To sa ľahko povie na prednáške, ale oveľa ťažšie sa to robí v praxi. A práve náročnosť tejto výzvy ma priviedla k základnému výskumu a vývoju vysokoúčinných separačných metód na analýzu intaktných proteínov v zložitých biologických matrikách s cieľom vyvinúť metódy, ktoré by boli vhodné na kvantitatívnu analýzu klinicky významných biomolekul.

S analýzami proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie sa začalo už niekedy

v 80. rokoch minulého storočia, keď boli vyvinuté dva ionizačné zdroje vhodné pre analýzu biomolekul: ionizácia/desorpcia laserom za účasti matrice (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) a ionizácia elektro-sprejom (ESI, *electrospray ionization*). Následne sa analýze proteínov venovalo najmä na úrovni tzv. *bottom-up* proteomiky, kedy sa proteíny štiepia na peptidy a potom analyzujú (čo je v súčasnosti stále viac prebádaný spôsob, podporovaný viacerými softvérmi, databázami atď). Postupne sa vyvíjala aj tzv. *top-down* proteomika, pri ktorej sa analyzujú proteíny bez predchádzajúceho štiepenia a stále sa zdokonaľujú separačné techniky na ich analýzu, vyvíjajú nové softvéry a databázy. Pokrok ide

stále dopredu, ale ešte sme ďaleko od nejakého bežného používania *top-down* proteomických prístupov.

Vývoj spoľahlivých analytických metód na detekciu a kvantifikáciu intaktných proteínov v rôznych biologických vzorkách predstavuje kľúčový záujem v biologických, lekárskejších a farmaceutických vedách. Premennivé zastúpenie proteínov v organizme môže poskytnúť informácie o patofyziológii rôznych ochorení a potenciál na sledovanie rozvoja ochorenia a jeho reakcie na liečbu.

Moja téma je pokračovaním výskumu prof. Kevina A. Schuga z Texaskej univerzity v Arlingtone, u ktorého som strávila dva polročné štipendijné pobyty a kde som na tejto téme začala pracovať. Prof. Schug sa spolu so svojím tímom pred niekoľkými rokmi začal intenzívnejšie venovať využitiu hmotnostnej spektrometrie na báze trojitého kvadrupólu pre kvantitatívnu analýzu intaktných proteínov. Preto aj náš tím na Farmaceutickej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave spolupracuje – zatiaľ na úrovni základného výskumu – práve s prof. K. Schugom a jeho tímom. Počas môjho štipendijného pobytu v Spojených štátoch sme spolupracovali aj s prof. Alexom J. Raiom, od ktorého sme mali niekoľko testovacích klinických vzoriek.

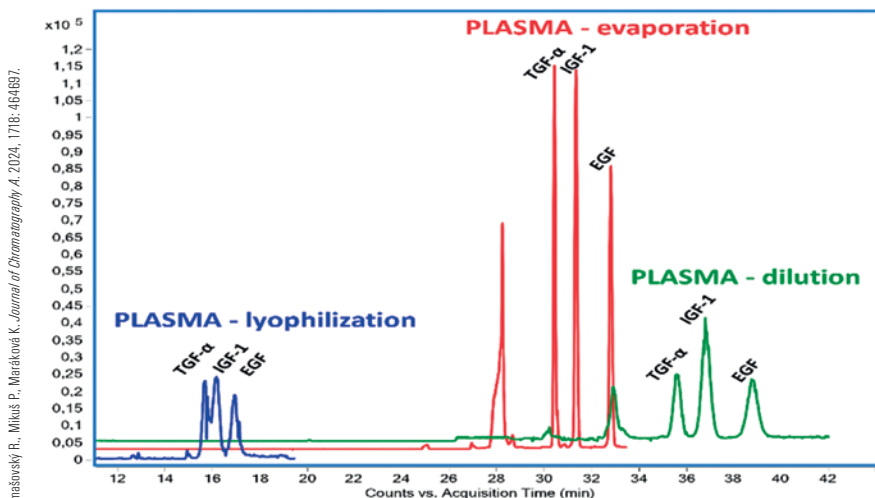
Nový prístup je práve vo využití jedného hmotnostnej spektrometrie na úrovni trojitého kvadrupólu, čo nie je pre proteomiku veľmi bežné. Väčšinou je požiadavka používať tzv. vysokorozlišovacie hmotnostné spektrometre, tie sú však náročnejšie aj z hľadiska financií aj ovládania, takže trojitý kvadrupól by

Autorka:

PharmDr. Katarína Maráková, PhD.,

Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie

Farmaceutická fakulta UK v Bratislave



Rastové faktory vo vzorke plazmy pri rôznej úprave vzoriek. Analýza pomocou kapilárnej elektroforézy

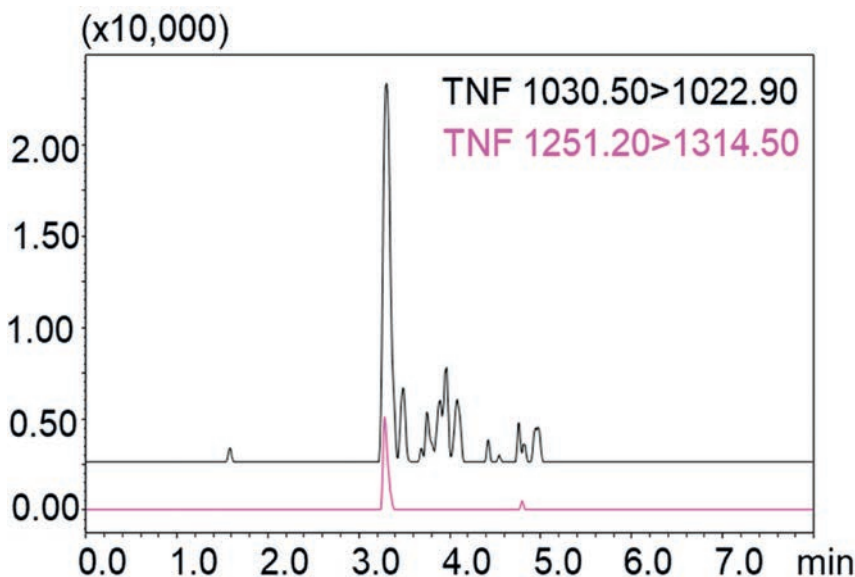
Opatová M., Tomášovský R., Mikuš P., Maráková K., *Journal of Chromatography A*, 2024, 1718: 464687.

mohli byť uplatniteľné viac do praxe. A ďalej je to využívanie neimunoafinitných prístupov na extrakciu a zakonzentrovanie intaktných proteínov aj v komplexných biologických matrikách s cieľom vývoja univerzálnejších prístupov pre širšiu skupinu proteínov s rôznymi charakteristikami v rámci jednej analýzy.

Používame elektroforetické a chromatografické separačné metódy spolu s detekciou na báze hmotnostnej spektrometrie. Netradičné je stále používanie trojitého kvadrupólu a režimu sledovania viacerých reakcií (MRM, *multiple reaction monitoring*) pre intaktné proteíny, keďže jeho použitie pre biomolekuly má stále viacero úskalí. K dispozícii máme aj vysokorozlišovacie hmotnostné spektrometre na báze Q-TOF (*quadrupole time-of-flight*, kvadrupól – analyzátor doby letu).

Výzvy sa riešia postupne, krok za krokom. Úplne sa problém vyriešiť ešte nepodarilo, kvantitatívna analýza intaktných proteínov je stále ešte na začiatku a potrebujeme k tomu nielen vývoj metodík, ale aj vývoj v oblasti analytickej inštrumentácie, softvérov a databáz.

Čo je teda cieľom nášho úsilia? Vývoj jed-



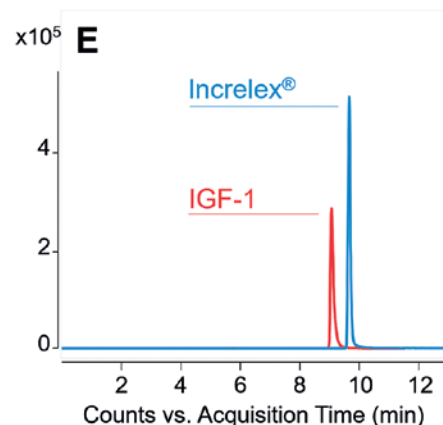
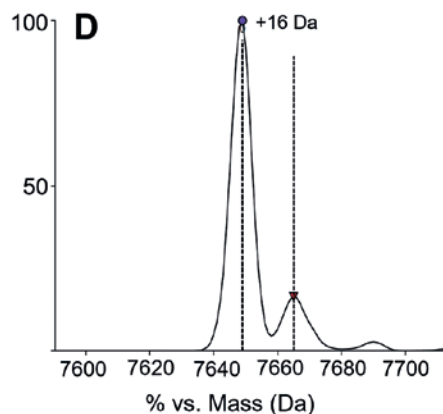
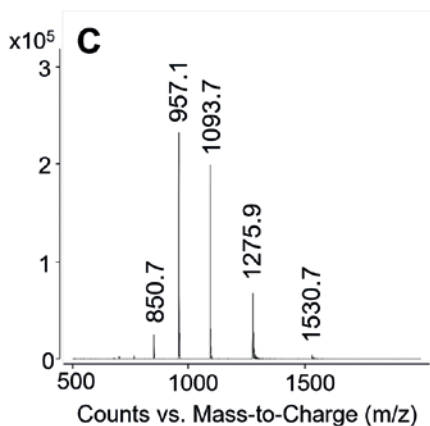
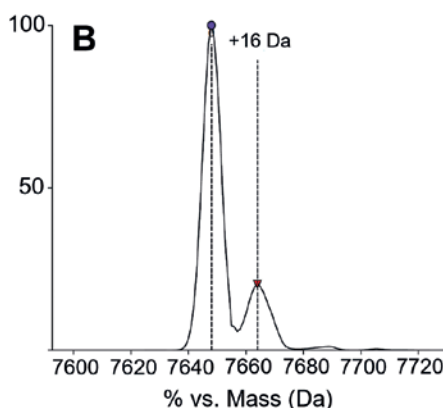
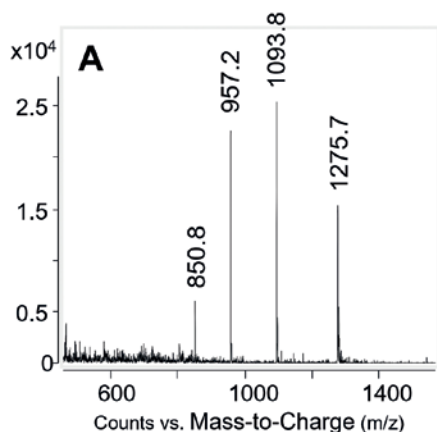
Záznamy z LC-MS analýzy proteínu TNF (tumor nekrotizujúci faktor) v sére

Záznam z analýzy TNF a iných ohľadnúc (e-mail: gary@marakov.k.rui.ai, Schug U.A. J Sep Sci. 2020; 43:1653–1677.

nouchších metodík, ktoré by boli vhodnejšie na použitie v klinickej praxi, keďže prístroje sú lacnejšie a aj procesy predúpravy sú na báze jednoduchších automatizovateľných postupov, ktoré by mali byť viac reprodukovateľné aj z hľadiska porovnávania medzi jednotlivými laboratóriami. Zároveň treba ale dodať, že metodiky nebudú asi

úplne univerzálne, ale skôr na niektoré špecifické aplikácie.

Vývoj nových metód by mal napomôcť k zjednodušeniu celkového procesu analýzy. Zároveň nové poznatky napomáhajú ďalšiemu vývoju a zlepšovaniu. Pevne verím, že sa podarí vyvinúť aj metodiky, ktoré budú úspešne aplikované aj na reálne klinické vzorky.



MS spektrá štandardu IGF-1 (A) a injekčného roztoku Incretelex® (C), spektrá po dekonvolúcii, ktoré poukazujú na prítomnosť oxidácie (B, D) a porovnanie elektroforeogramu štandardu a liekovej formy