

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АДДУКТОВ
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ
СОЕДИНЕНИЯМИ С ПОМОЩЬЮ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ
ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЕЙ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

Дубровский Я.А.¹, Мурашко Е.А.¹, Бельтюков П.П.¹, Подольская Е.П.^{2,3},
Бабаков В.Н.¹

1- НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

2-Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

3- Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: babakov@rihophe.ru

Резюме: В работе предложены методы пробоподготовки и масс-спектрометрической идентификации модифицированных фосфорорганическими соединениями (на примере российского Vx) пептидов активного центра бутирилхолинэстеразы. Предлагаемые подходы позволяют определять факт контакта с веществом типа Vx в биопробах с пределом обнаружения менее 1 нг/мл в плазме крови (по аддукту с БХЭ) и при менее 5 % ингибировании БХЭ.

Ключевые слова: бутирилхолинэстераза, фосфорорганические соединения, аддукт, иммунопреципитация, VX, VR.

**MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF
BUTYRYLCHOLINESTERASE ADDUCTS WITH ORGANOPHOSPHORUS
COMPOUNDS USING IMMUNOPRECIPITATION FROM BLOOD PLASMA**

Dubrovskii Ya. A.¹, Murashko E.A.¹, Beltyukov P.P.¹, Podolskaya E.P.^{2,3}, Babakov V.N.¹

1-Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia.

2-Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg, Russia.

3-Institute of Toxicology, Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia.

E-mail: babakov@rihophe.ru

Abstract: Methods of sample preparation and mass spectrometric identification of butyrylcholinesterase (BChE) adducts with organophosphorus compounds (e.g. Russian Vx) were proposed. This approaches allow to determine the contact with Russian Vx (VR) in

biological samples with a detection limit of less than 1 ng/ml VR in plasma (for BChE adduct) and less than 5% inhibition of BChE.

Key words: butyrylcholinesterase, organophosphorus compounds, adduct, immunoprecipitation, VX, VR.

Фермент бутирилхолинэстераза (БХЭ) плазмы крови человека является чувствительной мишенью действия фосфорорганических соединений (ФОС). Классическими методами определения факта интоксикации ФОС являются биохимические методы определения степени ингибирования БХЭ. Методами масс-спектрометрии можно идентифицировать ковалентные аддукты БХЭ с фосфорорганическими соединениями у экспонированного человека [1, 2, 3]. Поиск надежных и долгоживущих маркеров интоксикации ФОС и разработка методов их детекции остаются актуальными задачами в токсикологии.

Фосфонилованный пептид, принадлежащий БХЭ и содержащий серин-226 (серин-198 в зрелом белковом продукте), может быть получен путем ферментативного гидролиза БХЭ, выделенной из плазмы крови [4], и выявлен методами хроматографии и масс-спектрометрии. Определение аддукта масс-спектрометрическими методами позволяет не только выявить факт ингибирования активного центра холинэстеразы, но и установить соединение, которым оно было вызвано. Маркером интоксикации при реализации описанного метода является модифицированный фосфонилованный пептид.

Концентрация БХЭ в плазме крови составляет 3-5 мкг/мл. Для масс-спектрометрического анализа и идентификации модифицированных пептидов активного центра БХЭ требуется выделение фермента и удаление мажорных белков плазмы крови. Широкое применение для очистки БХЭ получил метод аффинной хроматографии [5, 6]. БХЭ выделяют с использованием прокаинамидного геля, при этом было показано, что для идентификации аддуктов с ФОС достаточно 1 мл плазмы крови [7, 8]. Альтернативным подходом является использование металл-аффинной хроматографии для выделения и обогащения модифицированных ФОС пептидов из гидролизатов плазмы крови [9].

Другим подходом для выделения холинэстераз из крови является использование иммуномагнитных микросфер с привитыми антителами [10,11]. Эффективность выделения БХЭ продемонстрировали антитела к БХЭ в реакции иммунопреципитации с использованием ферромагнитных микросфер [10].

Использование эпоксиактивированных функционализированных поверхностей для иммунопреципитации является активно используемым и достаточно простым подходом в протеомике [12]. В отличие от многостадийных и довольно трудоемких подходов по синтезу иммуномагнитных сорбентов, описанных выше, в настоящей работе мы предложили использование эпоксиактивируемых магнитных частиц для получения ковалентно привитых антител к БХЭ, которые были использованы для детекции БХЭ-аддуктов с фосфорорганическими соединениями в плазме крови человека на примере высокотоксичного российского Vx (VR).

Материалы и методы

Получение иммуномагнитных микросфер с привитыми антителами

Имуномагнитные микросферы ковалентно присоединяли к антителам (клон 3E8 HAN0020102, Thermo Fisher) согласно протоколу к набору Dynabeads Antibody Coupling Kit (143.11D, Invitrogen). Ферромагнитные микросферы отделяли от растворов в магнитном штативе DynaMag.

Выделение бутирилхолинэстеразы методом иммунопреципитации с использованием иммуномагнитных микросфер с привитыми антителами

Суспензию микросфер тщательно перемешивали, аликвоты объемом 50 мкл помещали в микропробирки вместимостью 1,5 мл, буферный раствор удаляли. Микросферы промывали 200 мкл 0,1М раствором фосфатно-солевого буфера (pH 7,4). Имуномагнитные микросферы инкубировали с 250 мкл образца плазмы крови при комнатной температуре в течение 2 ч при перемешивании. Затем микросферы отделяли от плазмы с использованием магнитного штатива и промывали несколько раз 200 мкл 0,1М раствором фосфатно-солевого буфера. БХЭ элюировали с микросфер 100 мкл 0,6% водного раствора муравьиной кислоты. Для проведения ферментативного гидролиза отбирали 95 мкл супернатанта.

Ферментативный гидролиз с использованием пепсина

95 мкл свежеприготовленного раствора пепсина в 0,6% муравьиной кислоте концентрацией 0,5 мг/мл добавляли в каждый образец, пробы инкубировали 2 часа при 37°C.

Подготовка образцов к анализу

Из полученного гидролизата отбирали аликвоту 45 мкл и добавляли 5 мкл раствора синтетического фосфорилированного нонапептида (100 нг/мл). Добавление стандарта позволяет контролировать правильность прохождения ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Идентификация фосфонированных модификаций бутирилхолинэстеразы методом ВЭЖХ-МС/МС

Анализ проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометрическом комплексе, хроматограф Agilent 1290 Infinity и масс-селективный детектор Bruker AmaZon ETD. Условия ионизации - согласно инструкции, прилагаемой к электроспрею: скорость потока газа-осушителя 9 л/мин; давление на распылителе 30 psi; температура газа-осушителя 280°C; напряжение на капилляре - 4000В; Детектирование осуществляли по фрагментным ионам в режиме MS/MS, тип диссоциации – CID. Параметры тандемного масс-спектрометрического анализа: мониторинг множественных реакций (MRM), ширина пика при изоляции – 4; режим сканирования UltraScan; регистрация фрагментных ионов в диапазоне m/z от 100 до 1200.

Для хроматографии использовали монолитную колонку фирмы Millipore Chromolith Performance RP-18e 100-2 мм (Millipore). Температура термостата колонки 30°C. В качестве буфера А в градиентной системе использовали смесь 98,9% H₂O, 1% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота (v/v). В качестве буфера Б для градиентной системы использовали 89,9% ацетонитрил, 10% H₂O, 0,1% муравьиная кислота (v/v).

Обработка данных

На масс-хроматограмме по масс-спектрометрическим характеристикам и временам удерживания идентифицировали нонапептид БХЭ и его модификацию (таблица), затем определяли площадь хроматографического пика.

Таблица - Масс-спектрометрические и хроматографические характеристики пептида активного центра холинэстераз с различными модификациями пептида активного центра БХЭ (переходы в режиме мониторинга множественных реакций).

Определяемое соединение	MRM переход	Время удерживания, мин
Нонапептид (нативная форма) FGESAGAAS	796,3→778,4; 673,3; 602,3	3,8
Деалкилированный нонапептид, модифицированный по серину метилфосфоновой кислотой FGES(MPA)AGAAS	874,2→778,4; 673,3; 602,3	5,7
Нонапептид, модифицированный по серину остатком фосфорной к-ты FGES(PA)AGAAS	876,2→778,4; 673,3; 602,3	4,9
Нонапептид, модифицированный по серину остатком VR FGES(IsobuthylMPA)AGAAS	930,4→778,4; 673,3; 602,3	7,6

Результаты и обсуждение

В результате ферментативного гидролиза БХЭ в присутствии пепсина образуется нонапептид FGESAGAAS, содержащий серин активного центра холинэстеразы. Следует отметить, что данный участок белка является консервативным у человека и лошади, а также общим для БХЭ плазмы крови и ацетилхолинэстеразы эритроцитов. Для отработки ферментативного гидролиза и определения времени удерживания нативного и модифицированного пептидов использовали коммерчески-доступную БХЭ лошади.

В образцах донорской плазмы крови человека, инкубированной с веществом типа Vx (VR), выявляется полноразмерный аддукт БХЭ с этим соединением. Следует отметить, нонапептид БХЭ с VR обладает хорошей способностью к ионизации, уже при конечной концентрации 1 нг/мл площадь хроматографического пика аддукта с VR и немодифицированного нонапептида практически соизмеримы. Линейный участок зависимости увеличения площади аддукта VR и уменьшения площади нативного нонапептида наблюдается при внесении VR в диапазоне концентраций от 1 до 15 нг/мл (рисунок). Подобные концентрации в плазме крови человека характеризуются отсутствием холинэргических симптомов или свидетельствуют о легкой степени интоксикации.

В отличие от аддуктов БХЭ с заринном или зоманом (данные не представлены) аддукт с VR практически не подвергается спонтанному деалкилированию или «старению», аддукт с остатком метилфосфоновой кислоты не был идентифицирован и после нескольких дней инкубации с VR. Так как практически не формируется состарившийся аддукт, соотношение площадей пиков модифицированного и максимально модифицированного пептида БХЭ может коррелировать со степенью ингибирования БХЭ. Следует отметить, что детекция только модифицированного пептида БХЭ и отсутствие немодифицированного в масс-хроматограмме наблюдается на уровне 80% ингибирования БХЭ, определенное методом Элмана. Таким образом, вклад в общую ферментативную активность БХЭ вносят и другие ферменты плазмы крови.

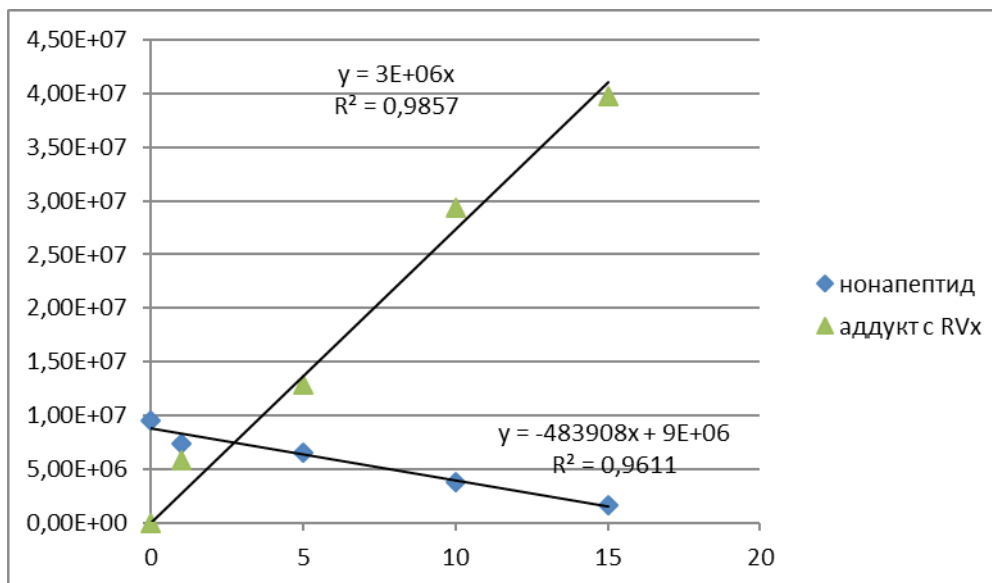


Рисунок – График зависимости площади хроматографического пика модифицированного и нативного нонапептидов БХЭ от концентрации (нг/мл) вещества типа Vx (RVx) в донорской плазме крови человека

Аддукты белков крови с ФОВ являются долгоживущими маркерами отравления, бутирилхолинэстераза человека имеет время полужизни 11 суток и использование предлагаемых методов позволит значительно усилить доказательную базу и надежность ретроспективного химико-токсикологического анализа.

Предлагаемые подходы могут быть использованы для разработки методов подтверждения клинических случаев острого и хронического отравления, контакта с различными ФОС; проведения экспертизы.

Работа выполнена при поддержке ФМБА России (контракт № 25.441.14.0).

Литература

1. Kim J.H., Stevens R.C., MacCoss M.J., Goodlett D.R., Scherl A., Richer R.J., Suzuki S.M., Furlong C.E. Identification and characterization of biomarkers of organophosphorous exposures in humans. // *Adv Exp Med Biol.* – 2010. – V. 660. – P. 61-71.
2. Read R.W., Riches J.R., Stevens J.A., Stubbs S.J., Black R.M. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphylated butyrylcholinesterase and phosphylated albumin after oxime therapy.// *Arch.Toxicol.* – 2010. – V.84. – P. 25-36.
3. Marsillach J., Richer R.J., Kim J.H.,Stevens R.C., MacCoss M.J., Tomazela D., Suzuki S.M., Schopfer L.M., Lockridge O., Furlong C.E. Biomarkers of organophosphorous exposures in humans // *Neurotoxicology.* – 2011. – V.32 (5). – P. 656-660.
4. Li H., L.M. Schopfer, F. Nachon, M.T. Froment, P. Masson, O. Lockridge Aging pathways for organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase, including novel pathways for isomalathion, resolved by mass spectrometry // [Toxicological Sciences](#). – 2007. – V. 100. – P. 136–145.
5. Gomez J.L., Nieto-Ceron S., Campoy F.J., Mundoz-Delgado E., Vidal C.J. Purification and properties of hydrophilic dimers of acetylcholinesterase from mouse erythrocytes. // *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* – 2003. – V.35. – P. 1109-1118.
6. Lockridge O., Schopfer L. M., Winger G., Woods J. H. Large scale purification of butyrylcholinesterse from human plasma suitable for injection into monkeys; a potential new therapeutic for protection against cocain and nerve agent toxicity // *J. Med.Chem. Boil. Radiol Def.* – 2005. – 3 nihms5095 – PMID: 16788731 – PMCID: PMC1480358.
7. Li H., Tong L., Schopfer L.M., Masson P., Lockridge O. Fast affinity purification coupled with mass spectrometryr for identification organophosphate labeled plasma butyrylcholinesterse // *Chem. Biol. Interact.* – 2008. – V. 175. – P. 68-72.
8. Li B., I. Ricodel, L.M. Schopfer, F. Baud, B. Megarbane, P. Masson, O. Lockridge. Dichlorvos, chlorpyrifos oxon, aldicarb adducts of butyrylcholiesterase, detected by mass spectrometry, in human plasma following deliberate overdose. // *J. Appl Toxicol.* – 2010. – V.30. – №6. – P. 559-565.

9. Мурашко Е.А., Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Идентификация аддуктов фосфорорганических отравляющих веществ методами фосфопротеомики // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12. – № 3. – С. 77-79.

10. Sporty J.L.S., S.W. Lemire, E.M. Jakubovski, J.A. Renner, R.A. Evans, R.F. Williams, J.G. Schmidt, M.J. vander Schans, D. Noort, R.C. Johnson. Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum. // *Anal.Chem.* – 2010. – V.82. – P. 6593-6600.

11. Marsillach J., Costa L.G., Furlong C.E. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. // *Toxicology.* – 2013. – V. 307. – P. 46-54.

12. Domanski M, Molloy K, Jiang H, Chait BT, Rout MP, Jensen TH, LaCava J. Improved methodology for the affinity isolation of human protein complexes expressed at near endogenous levels. // *Biotechniques.* – 2012 – P.1-6. – doi:10.2144/000113864. – PubMed PMID: 22668517.